الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية الجمهورية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار-عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : BIOLOGIE VÉGÉTALE

Intitulé

Etude phytochimique et activité biologique de quelques Plantes Médicinales de l'Est algérien

Présentée par : CHEKROUD-SADOU Nina

Membres de jury :

TAHAR Ali	(Pr.)	Président	Université de Annaba
SERIDI Ratiba	(Pr.)	Directrice de thèse	Université de Annaba
BOUGHANDJIOUA Nadia	(Pr.)	Examinatrice	Université de Annaba
BENKHALED Mohammed	(Pr.)	Examinateur	Université de Batna
ARAB Karim	(Pr.)	Examinateur	Université de Boumerdès
KHENNOUF Seddik	(Pr.)	Examinateur	Université de Sétif

Année universitaire : 2015/2016

Avant-propos

Notre étude a été menée grâce à la contribution de six laboratoires; Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement; Laboratoire de Microbiologie Appliquée; Laboratoire de Microbiologie Médicale et Laboratoire de Biocatalyse de Université Badji Mokhtar-Annaba; Laboratoire de Chimie générale, organique et biomédical. Université de Mons Belgique. Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques (*CRAPC*) Alger.

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Mme **Seridi Ratiba**, Professeur de l'université de Annnaba, Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné dans ce travail, ainsi que pour sa disponibilité et pour la grande autonomie qu'elle m'a accordée. Elle a su me transmettre avec beaucoup de passion et de rigueur tout l'amour qu'elle porte à la science et à la recherche.*

*J'exprime toute ma gratitude à Mr **Tahar Ali**, Professeur de l'université de Annaba qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Je le remercie pour son aide concernant l'étude statistique dans ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont à Mme **Boughandjioua Nadia**, Professeur de l'université de Annaba, à Mr **Benkhaled Mohammed**, Professeur de l'Université de Batna, à Mr **Khennouf Seddik**, Professeur de l'Université de Sétif et à Mr **Arab Karim** Professeur de l'Université de Boumerdès, qui m'ont fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteurs.*

*Mes remerciements vont à Mr **Djilani Abdelouaheb**, Professeur de l'université de Annaba, qui a été pour moi une source d'inspiration. Je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir accompagnée dans la première étape de ce travail, et d'avoir fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à tout moment.*

*Je tiens à remercier également Mme **Vander Elst Luce** Professeur au Laboratoire de Chimie Général et de biomolécule (Université de Mons-Belgique) de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail au sein de son laboratoire. Un grand merci pour votre accueil et votre sympathie. Je remercie également Loïc, Chella et Sophie pour leur aide efficace.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Mrs les Professeurs **Hadef Youcef**, **Djahoudi Abdelghani** et **Halaimia Fawzi**, de même à Mmes les Professeurs **Berdjam Malika**, **Nedjai Sabrina ;** sans oublier Dr. **Boughendjioua Hichem**, Dr. **Hamel Tarek**, Dr. **Khadri Sihem** et Dr. **Ghorab Achouag** qui m'ont été d'une aide précieuse lors de la réalisation de la partie expérimentale.*

Je voudrais également adresser mes remerciements à tous les membres du Département, mes enseignants, mes amies et les ingénieurs des laboratoires pédagogiques. Je ne saurais oublier l'équipe de notre laboratoire « Plante Médicinale » qui ont contribué à créer un cadre de travail agréable et chaleureux.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement ma Mère, qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'a encouragé toujours à aller de l'avant. Sans toi je ne serais pas arrivé jusque- là. Je tiens aussi à remercier tous les membres de ma famille (mon mari, ma tente, mes sœurs, mes frères, mon père, mon beau père, ma belle-famille, mes cousines) pour leur soutien physique et moral tout au long de ce parcours semé d'embûches.
Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci

Dédicaces

A mes petits Anès et M^ed Hocine

A la mémoire de ma grand-mère

A toute ma famille

Je dédie cette thèse

Sommaire

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Résumés

Introduction

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre 1. Les principes actifs des Plantes Médicinales

1.1. Plantes Médicinales……..…… 4
1.2. Classification des métabolites secondaires ……....…….……... 4
1.2.1. Polyphénols ……...……..... 6
1.2.2. Alcaloïdes …….. 12
1.2.3. Terpènes et leurs dérivés……...……. 13
1.2.4. Propriétés biologiques……..….. 16
1.3. Huiles Essentielles……..... 18
1.3.1. Généralités ……..... 18
1.3.2. Localisation et lieu de synthèse….....…… 18
1.3.3. Composition chimique….....…… 19
1.3.4. Propriétés physico-chimiques…….……..... 22
1.3.5. Procédés d'obtention…….. 22
1.3.6. Facteurs de variabilités ……..…… 25

Chapitre 2. Stress oxydant et résistance bactérienne

2.1. Stress oxydant……... 27
2.1.1. Définition …….. 27
2.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS)……...…… 27
2.1.3. Atteintes liées aux ERO……....……... 28
2.1.4. Antioxydants……..... 29
2.5.1. Plantes, source naturelle d'antioxydants ……...……..... 31
2.2. Résistance bactérienne…….. 33
2.2.1. Résistance bactérienne naturelle ……..... 33
2.2.2. Résistance acquise ……..... 34
2.2.3. Plantes, source naturelle d'antibactériens……..……..... 34

Chapitre 3. Description des deux espèces étudiées

3.1. *Pinus halepensis* Mill. …….....……..... 37
3.1.1. Genre Pinus ……... 37
3.1.1.1. Usage traditionnel du pin ……...……...… 37
3.1.2. Description botanique de *P. halepensis*….....……...……...…… 38
3.1.3. Place de *P. halepensis* dans la systématique ……..……..…. 39
3.1.4. Répartition géographique de *P. halepensis* ……..……...….. 40

3.1.5. Données pharmacologiques et phytochimiques de *P. halepensis* 41
3.1.6. Utilisations en phytothérapie de *P. halepensis* 42
3.2. *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* 43
3.2.1. Genre Thymus..... 43
3.2.1.1. Répartition géographique du genre Thymus 43
3.2.1.2. Utilisation traditionnel du Thym..... 44
3.2.1.3. Composition et activités biologiques 45
3.2.2. Description botanique de *T. ciliatus* 46
3.2.3. Place de *T. ciliatus* dans la systématique..... 47
3.2.4. Données pharmacologiques et phytochimiques de *T. ciliatus* 48
3.2.5. Utilisations en phytothérapie de *T. ciliatus* 48

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal..... 49
1.1. Récolte des plantes..... 49
2. Méthodes..... 51
2.1. Extraction des huiles essentielles 51
2.1.1. Hydrodistillation..... 51
2.1.2. Détermination de la composition chimique 52
2.1.3. Indices physicochimiques des huiles essentielles 53
2.1.3.1. Caractéristiques organoleptiques..... 53
2.1.3.2. Indices chimiques..... 53
2.1.3.3. Indices physiques..... 54
2.2. Détermination de la teneur en eau de *T.ciliatus*..... 55
2.3. Détermination de la teneur en cendres totales de *T.ciliatus* 55
2.4. Screening phytochimique de *T.ciliatus* 56
2.5. Préparation des extraits de *Thymus cilliatus*..... 59
2.5.1. Extraction par macération..... 59
2.5.1.1. Préparations des extraits bruts..... 59
2.5.1.2. Préparations des extraits avec des solvants à polarité croissante..... 59
2.5.1.3. Préparations des extraits aqueux 59
2.5.2. Extraction au Soxhlet..... 61
2.5.2.1. Préparations des extraits avec des solvants à polarité croissante..... 61
2.5.3. Détermination du rendement 61
2.6. Analyse quantitative des extraits 62
2.6.1. Dosage des polyphénols totaux..... 62
2.6.2. Dosage des flavonoïdes..... 62
2.7. Activités biologiques 63
2.7.1. Activité antibactérienne..... 63
2.7.1.1. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme)..... 64
2.7.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)..... 65
2.7.1.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)..... 66
2.7.2. Activité antioxydante..... 66
2.7.2.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$ 66
2.7.2.2. Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power..... 67

2.8. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)…….. 68
2.9. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)……..... 70
2.10. Criblage biologique des extraits de *T. ciliatus*……..... 71
2.11. Purification des extraits méthanoliques……..... 72
2.11.1. Extrait méthanolique obtenu par macération……... 73
2.11.2. Extrait méthanolique obtenu par soxhlet……..... 75
2.12. Chimie structurale …….. 77
2.12.1. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)……..…….... 77
2.13. Analyse statistique ……..... 77
2.14. Technique histologique……..... 78
2.14.1. Double coloration……. 78
2.14.2. Histométrie……... 78

Partie III : Résultats et discussion

1. Huiles Essentielles de *Pinus halepensis* Mill.……..……... 79
1.1. Rendement des HEs de *P. halepensis* Mill……..……..... 79
1.2. Composition chimique des HEs de *P. halepensis* Mill ……... 79
2. Huiles Essentielles de *Thymus ciliatus* ssp.*coloratus*……..……..... 82
2.1. Rendement des HEs de *T. ciliatus* ……... 82
2.2. Composition chimique des HEs de *T. ciliatus* …….……... 83
2.3. Indices physico-chimiques des HEs de *T. ciliatus* ……..... 90
3. Teneur en eau, matière organique et cendre de *T. ciliatus*……..... 92
4. Screening phytochimique de *T. ciliatus*……..…… 93
5. Rendement des extraits bruts de *T. ciliatus* ……..……...…… 95
6. Rendements des différentes extractions de *T. ciliatus* ….……...… 96
7. Analyse quantitative des extraits de *T. ciliatus* …….……... 98
7.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoides ……..……..... 98
7.1.1. Extrait brut de *T. ciliatus* ……..…… 100
7.1.2. Extraits organiques de *T. ciliatus* …….…… 102
8. Activité antibactérienne ……... 108
8.1. Aromatogramme de l'HE de *P. halepensis*…….……..… 108
8.2. Aromatogramme de l'HE de *T. ciliatus*……..……..... 109
8.3. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'HE de *T. ciliatus*……... 114
8.4. Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'HE de *T. ciliatus*……. 119
8.5. Extraits organiques de *T. ciliatus*……..... 122
9. Activité antioxydante……... 124
9.1. Huiles essentielles de *T. ciliatus*……..... 124
9.1.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$…….. 124
9.1.2. Réduction du Fer…… 130
9.2. Extraits organiques de *T. ciliatus*……..... 133
9.2.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$…….. 133
9.2.2. Réduction du Fer…… 142
10. Chromatographie sur Couche Mince des EMeOH de *T. ciliatus* ……. 150
11. Analyse par HPLC des extraits méthanoliques de *T. ciliatus* ……... 152
12. Analyse des composés isolés par RMN……..…… 153
13. Histologie de *T. ciliatus* ……..... 158

13.1. Tige de *T. ciliatus*……..... 158
13.2. Feuille de *T. ciliatus* ……..... 160
13.3. Etude histométrique ……..... 164

Conclusion générale et perspectives 167

Références bibliographiques 171

Annexes 195

Liste des tableaux

Tableau1	Classe, structure des flavonoïdes d'après Heim et *al*. (2002)	09
Tableau 2	Propriétés biologiques des métabolites secondaires sur l'organisme	17
Tableau 3	Principales substances antioxydantes	30
Tableau 4	Place de *Pinus halepensis* Mill. dans la systématique	39
Tableau 5	Principaux composants des huiles essentielles du *P. halepensis* Mill. des différentes origines	42
Tableau 6	Composants majoritaires des huiles essentielles des espèces de Thym d'Algérie	45
Tableau 7	Place de *T. ciliatus* dans la systématique	47
Tableau 8	Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études	49
Tableau 9	Liste des souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. ciliatus*	63
Tableau 10	Liste des souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill.	64
Tableau 11	Programme de l'élution	71
Tableau 12	Composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.	80
Tableau 13	Composition chimique des huiles essentielle de *Thymus ciliatus ssp. coloratus*	84
Tableau 14	Les caractéristiques physicochimiques des HEs de *T. ciliatus*.	91
Tableau 15	La teneur en eau, matière organique et cendre de *T. ciliatus*.	92
Tableau 16	Caractérisation des groupes chimiques dans la poudre de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*	93
Tableau 17	Aspects, couleur et rendement des extraits de différentes extractions de *Thymus ciliatus*	97
Tableau 18	Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de *Thymus ciliatus*	104
Tableau 19	Activité inhibitrice de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. et antibiotique pour les trois souches bactériennes.	108
Tableau 20	Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de *Thymus ciliatus*	111
Tableau 21	Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) de l'HE de *T. ciliatus*	115
Tableau 22	Concentration Minimal Bactéricide (CMB) de l'HE de *T. ciliatus*	120
Tableau 23	Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de *T. ciliatus* ssp. c*oloratus*	122
Tableau 24	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH˙ en fonction des différentes concentrations des HEs et d'acide ascorbique	128
Tableau 25	Valeurs de l'IC_{50} des huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* et d'acide ascorbique	128
Tableau 26	Valeurs de l'IC_{50} déterminées par le test DPPH des extraits de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*	137
Tableau 27	Valeurs de l'EC_{50} déterminées par le test Réduction du fer des extraits de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*	146
Tableau 28	Résultats de la séparation par CCM des extraits MeOH de *T. ciliatus* dans le système de solvant : B.A.W (60 : 15 : 25) (v/v/v)	150
Tableau 29	Mesures histologiques de la feuille de *T. ciliatus* ssp. *coloratus (µm)*	165
Tableau 30	Mesures histologiques de la tige de *T. ciliatus* ssp. *coloratus (µm)*	166

Liste des figures

Figure 1	Biosynthèse des métabolites secondaires	05
Figure 2	Structure de quelques hydroxybenzoïques	07
Figure 3	Structure de quelques hydroxycinnamiques	07
Figure 4	Molécule de base des flavonoïdes	08
Figure 5	Structure de quelques tanins condensés	10
Figure 6	Structure de quelques tanins hydrolysables	10
Figure 7	Structure de base des anthocyanes	11
Figure 8	Structure de quelques quinones	12
Figure 9	Structure de quelques coumarines	12
Figure 10	Structure de quelques alcaloïdes	13
Figure 11	Structure de quelques iridoïdes	14
Figure 12	Filtration schématique des principaux groupes des lactones sesquitérpèniques	15
Figure 13	Structure chimique d'un saponoside : Ginsénoside	16
Figure 14	Structure chimique de quelques monoterpènes des HEs	20
Figure 15	Structure chimique de quelques sesquiterpènes des HEs	21
Figure 16	Structure chimique de quelques composés aromatiques	21
Figure 17	Origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie	28
Figure 18	Rameaux de *Pinus halepensis* Mill.	38
Figure 19	Aire de distribution géographique de *Pinus halepensis* Mill.	40
Figure 20	Aire de distribution géographique des espèces du genre Thymus	44
Figure 21	*Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*	46
Figure 22	Situation géographique des zones d'études	50
Figure 23	(a)Appareil d'hydrodistillation. (b) : Appareil pour la détermination des Huiles Essentielles type Clevenger	51
Figure 24	Schéma du protocole d'extraction de *T. ciliatus*	60
Figure 25	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire $DPPH^{\bullet}$ et un antioxydant	66
Figure 26	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).	67
Figure 27	Schéma du criblage biologique des extraits de *T. ciliatus*	72
Figure 28	Schéma d'isolement du composé CMPA	74
Figure 29	Schéma des différentes étapes de fractionnement de l'EMeOHF-S	75
Figure 30	Chromatogrammes de l'huile essentielle de *P. halepensis* des sites 1 (a) et 2 (b)	80
Figure 31	Rendements des Huiles Essentielles de *Thymus ciliatus*	82
Figure 32	Chromatogrammes de l'huile essentielle de *T. ciliatus* obtenue (a) avant floraison (b) pendant floraison (c) après floraison	86
Figure 33	Variation des composés majoritaires des HEs de *T. ciliatus* durant son cycle phénologique	87
Figure 34	Rendement des extraits bruts de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*	95
Figure 35	Courbe d'étalonnage (a) acide gallique (b) catéchine	99

Figure 36	Teneurs en PPT et Fl de *Thymus ciliatus*	100
Figure 37	Corrélation entre les teneurs en PPT et Fl de *T. ciliatus*	102
Figure 38	Cinétique de réduction du radical $DPPH^{\bullet}$ en présence d'acide ascorbique	125
Figure 39	Cinétique de réduction du radical $DPPH^{\bullet}$ en présence d'HE avant floraison	126
Figure 40	Cinétique de réduction du radical $DPPH^{\bullet}$ en présence d'HE floraison	126
Figure 41	Cinétique de réduction du radical $DPPH^{\bullet}$ en présence d'HE après floraison	127
Figure 42	Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *T. ciliatus* et l'acide ascorbique.	131
Figure 43	Pourcentage d'inhibition du radical $DPPH^{\bullet}$ des extraits hexaniques aux différents stades de croissence de *T. ciliatus*	134
Figure 44	Pourcentage d'inhibition du radical $DPPH^{\bullet}$ des extraits DCM aux différents stades de croissence de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*	135
Figure 45	Pourcentage d'inhibition du radical $DPPH^{\bullet}$ des extraits MeOH aux différents stades de croissence de *T. ciliatus*	136
Figure 46	Pourcentage d'inhibition du radical $DPPH^{\bullet}$ de l'extrait Aqu AS pendant floraison	137
Figure 47	Corrélation entre activité anti radicalaire au DPPH et teneurs en polyphénols totaux (PPT) et teneurs en flavonoïdes (Fl).	140
Figure 48	Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* avant floraison et de l'acide ascorbique.	143
Figure 49	Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* pendant floraison obtenus par macération et de l'acide ascorbique.	144
Figure 50	Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* avant floraison obtenus par soxhlet et de l'acide ascorbique.	145
Figure 51	Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* après floraison et de l'acide ascorbique.	146
Figure 52	Corrélation entre pouvoir réducteur et teneurs en polyphénols totaux (PPT) et teneurs en flavonoïdes (Fl) de *T. ciliatus*	149
Figure 53	Profils chromatographiques des extraits méthanoliques par HPLC *A : avant floraison ; B : floraison ; C : après floraison*	152
Figure 54	Spectre RMN ^{1}H (500 MHz- MeOH-*d*) **(a)** ; Spectre RMN ^{13}C (125 MHz- MeOH-*d*) (b) du composé CMA	154
Figure 55	Spectre de corrélation Cosy(a) ; HSQC du composé CMA(b)	155
Figure 56	Spectre RMN ^{1}H (500 MHz- H_2O-*d*) **(a)**; Spectre RMN ^{13}C (DEPT) (125 MHz- H_2O-*d*) (b) du composé CMB	156
Figure 57	Spectre de corrélation Cosy(a); Spectre HSQC (b) du composé CMB	157
Figure 58	Coupe transversale de la tige de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* observée au microscope optique (GX100 : X400)	159
Figure 59	Forme d'un poil glandulaire	160
Figure 60	Observations microscopiques des stomates de feuille de *T. ciliatus* à différentes périodes de croissance (A : avant floraison ; B : floraison ; C : après floraison)	162
Figure 61	Coupe transversale de la feuille de *T. ciliatus* ssp. *colotatus* observée au microscope optique(GX100 ; X400)	163
Figure 62	Macle d'oxalate de calcium (GX400)	164

Liste des abréviations

AcOEt	: Acétate d'éthyle
AFNOR	: Association Française de Normalisation
ATCC	: American Type Culture Collection
BHA	: Butyl HydroxyAnisole
BHT	: ButylHydroxyToluène
CCM	: Chromatographie sur Couches Minces
COSY	: COrrelation Spectroscopy Y.
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	: Concentration Minimale Bactéricide
DMSO	: Diméthylsulfoxide
DO	: Densité Optique
DCM	: Dichlorométhane
$DPPH^{\bullet}$	: Diphenylpicrylhydrazine
EC50	: Concentration Efficace à 50%
FPP	: Farnésyl diphosphate
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
GC/MS	: Chromatographique en phase Gazeuse couplée au Spectroscopie de Masse
GGPP	: Géranylgéranyl diphosphate
GPP	: Géranyl diphosphate
HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance
HE	: Huile Essentielle
HEs	: Huiles essentielles
Hex	: Hexane
HSQC	: Heteronuclear single quantum correlation
IPP	: Isopentenyl diphosphate
IC_{50}	: Concentration Inhibitrice 50
MH	: Agar de Mueller Hinton
MeOH	: Méthanol
NEU	: (NP/PEG) Natural Product Polyethylèneglycol
O.M.S	: Organisation Mondiale de la Santé
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
Rf	: Rapport Frontal
Tr	: temps de rétention

B. subtilis	*:Bacillus subtilis*
E. aerogenes	*:Enterobacter aerogenes*
Micrococcus luteus	*:M. luteus*
P. mirabilis	*:Proteus mirabilis*
P. aeruginosa	*:Pseudomonas aeruginosa*
S. aureus	*:Staphylococcus aureus*
E. coli	*:Escherichia coli*
K.oxytoca	*:Klebsiella oxytoca*
Klebsiella pneumoniae	*:K. pneumoniae*

RESUME

Thymus ciliatus ssp. *coloratus* et *Pinus halepensis* Mill. sont des plantes méditerranéennes largement utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques attribuées essentiellement aux huiles essentielles.

Ce travail vise à la valorisation du *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et *Pinus halepensis* Mill. par la caractérisation chimique ainsi que par l'étude de l'activité antimicrobienne et de l'activité antioxydante de leurs huiles essentielle et des extraits.

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation. Les rendements et la composition chimique sont variables selon le lieu de récolte pour *Pinus halepensis* et selon la période de récolte pour *Thymus ciliatus*. L'analyse par CG/SM a montré que les HEs de *Thymus ciliatus* sont constituées principalement par le Thymol (33,39-21,02%) et le carvacrol (24,16-31,37%). Les constituants majoritaires de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. (Zarouria) sont l'α-pinène (21,01%) et le β-caryophyllène (31,14%), cependant ceux de lac Mellah sont: le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%). Parmi ces HEs, l'HE de *Thymus ciliatus* (après floraison) a témoigné une forte activité antibactérienne vis-à-vis des souches multi-résistantes aux antibiotiques et de références. En outre, une importante efficacité réductrice du fer par rapport à celle du radical $DPPH^{\bullet}$ par cette huile essentielle a été également démontrée.

Le screening phytochimique effectué sur l'espèce *T. ciliatus* a permis la mise en évidence de plusieurs groupes chimiques notamment les flavonoïdes, les tanins cathéchiques, les coumarines, les anthocyanes et les terpènes et stéroïdes.

Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants: $DPPH^{\cdot}$, pouvoirs de réduction. En outre, les extraits ont été soumis à un criblage pour leur activité antimicrobienne possible *in vitro*, en utilisant la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé.

Les extraits hydro-méthanoliques de la partie aérienne de *Thymus ciliatus* sont plus riches en composés phénoliques au mois de juin. La comparaison des propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits, selon le solvant d'extraction, la période de récolte, et la méthode d'extraction a révélé que les extraits méthanoliques et aqueux sont les plus riches en composés phénoliques en période de floraison ; en particulier ceux obtenus par soxhlet. Ces deux extraits semblent être de bons piégeurs de radicaux libres $DPPH^{\bullet}$, et la réduction du fer. Les extraits les plus riches en polyphénols ont montré une bonne activité antioxydante et antibactérienne.

Mots clés : *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*, *Pinus hlepensis* Mill. , huiles essentielles Polyphénols, CG/SM, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Abstract

Thymus ciliatus ssp. *coloratus* and *Pinus halepensis* Mill. Mediterranean plants are widely used in traditional medicine for their therapeutic properties attributed essentially with essential oils.

This work aims at the valorization of *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* and *Pinus halepensis* Mill. by chemical characterization and the study of the antimicrobial and antioxidant activity of their essential oils and various extracts.

The extraction of essential oils was performed by steam distillation. The yields and chemical composition vary depending on the harvest site for *Pinus halepensis* and the harvest season for *Thymus ciliatus*. Analysis by GC / MS showed that has *Thymus ciliatus* consist mainly Thymol (33.39 to 21.02%) and carvacrol (24.16 to 31.37%). The major constituents of the essential oil of the needles of *P. halepensis Mill*. (Zarouria) are α-pinene (21.01%) and the β-caryophyllene (31.14%), However EO lake Mellah are: β-caryophyllene (31.89%), the α-pinene (24.41%). the EO after flowering of *T.ciliatus* has showed a strong antiomicrobial activity against strains resistant to multiple antibiotics. furthermore, the strong exhibited reducing power compared to DPPH radical assay for this essential oil was also demonstrated.

The phytochemical screening performed on the specie *T. ciliatus* showed that the presence of several chemical groups such as flavonoids, tannins cathechiques, coumarins, anthocyanins and trepens and sterols.

The phenolic contents and flavonoids were determined by spectrophotometric methods. The antioxidant activities were determined *in vitro* through the following tests: DPPH, reduced power. Furthermore, the various extracts were subjected to screening for their possible antimicrobial activity *in vitro*, using the agar diffusion method.

The hydro-methanol extracts of the aerial part of *Thymus ciliatus* are richer in phenolic compounds in June. Comparison of the antioxidant and antibacterial extracts, as the extraction solvent, and in the harvest season, and according to the extraction method showed that methanolic and aqueous extracts are rich in phenolic compounds in flowering period; especially those obtained by soxhlet. Both extracts seem to be good scavengers of free radicals DPPH and reduction of iron, the richest in polyphenols extracts showed good antioxidant and antibacterial activity.

Keywords: *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*, *Pinus hlepensis* Mill., essential oil, GC/MS, polyphenolics, antimicrobial activity, antioxidant activity.

الملخص

تعد نبتة *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* و *Pinus halepensis* Mill من نباتات البحر الأبيض المتوسط كثيرة الاستعمال في الطب الشعبي (التقليدي) لما تمتاز به من خصائص علاجية لغناها بالزيوت الطيارة (الزيوت العطرية).

- تهدف هذه الدراسة إلى معرفة الخصائص الكيميائية ونشاط ضد البكتيريا وضد الأكسدة للزيوت الطيارة ومستخلصات نبتتي *Thymus ciliatus* ssp.*coloratus* و *Pinus halepensis* Mill .

- تم استخلاص الزيوت العطرية بواسطة التقطير، كما تبين من النتائج ان المردود و المكونات الكيميائية لكل زيت تختلف حسب مكان القطف (الجني) بالنسبة لنبات *Pinus halepensis* و حسب فترة القطف بالنسبة لنبات *Thymus ciliatus* .

- بين التحليل الكيميائي بواسطة CG/SM ان الزيوت العطرية لنبات *Thymus ciliatus تتكون* أساسا من التيمول (Thymol) بنسبة (33,39-21,02%) وكرفاكرول (Carvacrol) بنسبة (33,39-24,16%).

إن أغلب مكونات الزيوت الطيارة المستخلصة من الأوراق الإبرية لنبات *Pinus halepensis* في منطقة الزعرورية هي l'α-pinène بنسبة (21,01%) و β-caryophyllène بنسبة (31,14 %) أما بالنسبة لمنطقة الملاحة هي β-caryophyllène بنسبة (31,89 %) و α-pinène بنسبة (24,41 %).

تظهر الزيوت العطرية لنبات *Thymus ciliatus* المستخلصة بعد الإزهار أن لها فعالية كبيرة ضد النشاط البكتيري بالنسبة لسلالات لها مقاومة عديدة ضد المضادات الحيوية، بالإضافة إلى ذلك يظهر هذا الزيت الطيار لنبات *Thymus ciliatus* فعالية كبيرة لإرجاع الحديد مقارنة مع جدر DPPH.

يكشف التحليل الكيميائي النباتي الذي أجري على *Thymus ciliatus* عن وجود مجموعات كيميائية عديدة خاصة الفلافونويد، الأصبغة، الكومارين، أونتوسيان، تربان و ستيرويد. وقد تم تحديد محتوى المركبات الفينولية والفلافونويد بواسطة تقنيات الطيف الضوئي و كذا تحديد مضادات الأكسدة في الفحص المخبري (*in vitro*) من خلال اختبارات التقييم التالية: DPPH و القدرة على الارجاع، بالإضافة إلى ذلك خضعت المستخلصات إلى الفحص المخبري (*in vitro*) لدراسة نشاط ضد البكتيريا باستعمال تقنية نشر الأقراص في وسط زرع صلب. أكدت النتائج أن المستخلصات (المائية الميثانولية) للجزء الهوائي لنبات *Thymus ciliatus* تكون أغنى بالمركبات الفينولية في شهر جوان.

كما أثبتت مقارنة خصائص مضاد الأكسدة ومضاد البكتيريا حسب مذيب الاستخلاص المستعمل، فترة الجني وتقنيات الاستخلاص أن المستخلصات الميثانولية والمائية تحتوي على أعلى التراكيز الفينولية خلال فترة الإزهار، خاصة التي تنتج عن سوكسليت (soxhlet). استنتجنا من هذه الدراسة أن هذان المستخلصان من أقوى المثبطات للجدر الحرة ·DPPH وإرجاع الحديد. كما أبدت المستخلصات التي تحتوي على أعلى التراكيز من متعدد الفينول أقوى مضاد للأكسدة وللبكتريا.

الكلمات المفتاحية : *Thymus ciliatus* ssp .*coloratus*, *Pinus hlepensis* Mill ; الزيوت الطيارة ; CG/SM ; المركبات الفينولية ;نشاط مضاد للأكسدة ;نشاط مضاد البكتيريا .

Introduction générale

INTRODUCTION

L'histoire des Plantes Aromatiques et Médicinales est associée à l'évolution des civilisations, dans toutes les régions du monde. L'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires**.** Selon L'Organisation mondiale de la Santé (OMS), plus de 22000 espèces végétales ont été inventoriées comme plantes médicinales ; ces dernières constituent une composante fondamentale pour l'avenir du système de santé dans le monde. Elles demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives attribuées aux métabolites secondaires qui sont très diversifiés et possèdent un très large éventail d'activités biologiques **(Duraffourd et *al*., 1997**).

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 55 millions de personnes sont mortes dans le monde entier en 2011, et que les maladies infectieuses sont responsables d'un tiers de tous les décès. Cette situation est aggravée par le nombre croissant de maladies causées par des micro-organismes résistants aux antibiotiques, qui sont en mesure de survivre après l'exposition aux antibiotiques par leur capacité à acquérir et de transmettre la résistance. Par conséquent, la résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique d'ampleur croissante, et la découverte puis le développement de nouveaux agents antimicrobiens pour traiter ce problème est une priorité importante **(Hogberg, 2014).** De nombreux rapports scientifiques ont montré que les plantes ont un potentiel élevé de synthétiser différentes substances antimicrobiennes **(Daglia, 2012).** Les agents antimicrobiens dérivés de plantes peuvent être classés en composés phénoliques et polyphénoliques, les terpènes, les alcaloïdes, les lectines, les polypeptides et les polyacétylènes**.** Basés sur l'utilisation traditionnelle, ces extraits obtenus à partir de plantes sont généralement les premiers traitements recommandés, en raison de leurs actions antimicrobiennes multi-cibles et les effets indésirables faibles **(Simoes et *al*., 2009).**

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires. L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Le procédé d'oxydation est l'un des itinéraires le plus important pour

la production de radicaux libres dans les produits alimentaires, les médicaments et l'organisme **(El Ouariachi et *al.*, 2014)**

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent provoquer de nombreuses pathologies. Le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle **(Goncalves et *al.*, 2013)** radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides **(Favier, 2003).** L'apport d'antioxydant dans les aliments peut être utilisé pour réduire les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres dans le corp humain **(Valko et *al.*, 2007 ; El Ouariachi et *al.*, 2014).**

En plus, la plupart des antioxydants de synthèse, généralement utilisés dans l'industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, se sont avérés responsables d'effets indésirables (**Deba et *al.*, 2008**), carcinogenèses et qu'ils étaient responsables de dommages causés dans le foie **(Edeas, 2007)**. Par conséquent, les antioxydants végétaux sont proposés comme une alternative intéressante. Les huiles et les extraits de diverses plantes médicinales et aromatiques sont connus pour leur capacité à prévenir les acides gras de la décomposition oxydante. Les composés phénoliques sont les principaux agents qui peuvent donner l'hydrogène aux radicaux libres et ainsi briser la réaction en chaîne de l'oxydation des lipides lors de la première étape d'initiation **(Brahmi et *al.*, 2015)**

La flore méditerranéenne est bien connue pour son abondance en plantes aromatiques, avec environ 49% des genres contenant des espèces aromatiques dans cette zone climatique. La famille des Lamiaceae dans cette région a attiré beaucoup d'attention en raison de sa diversité en produits monoterpèniques dans différentes espèces **(Thompson, 2003).** Par ailleurs, la flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropical, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques **(Quezel, et Santa 1963).** Parmi cette végétation, on trouve les plantes aromatiques utilisées pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales.

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne nous nous sommes intéressées à deux plantes aromatiques. La plante sur laquelle a porté notre premier choix est une espèce de la famille des Lamiaceae "*Thymus ciliatus* ", provenant de la péninsule de l'Edough à Annaba (Nord est de l'Algérie) ; elle est endémique à l'Algérie et riche en huiles essentielles.

Notre deuxième choix porte sur une espèce de la famille des Pinaceae : *Pinus helepensis* Mill. du Parc National d'El Kala (PNEK) à El Taref (Nord Est de l'Algérie) par ce qu'elle est très répandu en Algérie et également riche en huiles essentielles.

Notre investigation a pour but l'étude phytochimique et l'évaluation du potentiel antioxydant et antibactérien des extraits de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et *Pinus halepensis Mill.,* en incluant les facteurs de variabilités (stades végétatifs, localisation géographique).

Cette étude comporte quatre parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les principes actifs des Plantes Médicinales, les antioxydants et les antibactériens, et enfin sur les deux espèces choisies.

La seconde partie expérimentale, décrit toutes les méthodes utilisées : extractions, dosages spectrophotométriques, tests antioxydants, antimicrobiens, histologie, Chromatographie sur Couche Mince (CCM), Chromatographie en Phase Gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse (CG/SM), la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

La troisième est consacrée aux résultats et discussion. Elle est répartie en trois volets.

- ✓ Le premier porte sur l'étude des huiles essentielles des deux espèces, et les différents extraits de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*
- ✓ Le deuxième est consacré à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Thymus ciliatus,* en outre les extraits méthanoliques, qui se sont montrés les plus actifs, ont été analysés par HPLC. Les extraits les plus actifs issus du criblage biologique ont fait objet d'une purification et analyse des composés isolés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).
- ✓ Le troisième est consacré à l'étude histologique des feuilles et tiges de *Thymus ciliatus.*

Ce travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives.

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre 1 :

Principes actifs des Plantes Médicinales

1.1. Plantes Médicinales

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des drogues. Environ 200 000 espèces végétales sur les 300 000 recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et d'ailleurs **(Sofowora, 2010).** Elles sont utilisées de différentes manières (décoction, macération, infusion). Plusieurs de ces parties peuvent être utilisées **(Cecchini, 2003)**. Au sens de la pharmacopée c'est une drogue végétale. Une drogue végétale tout matériel végétal utilisé en thérapeutique et n'ayant encore subi aucune préparation pharmaceutique ; elle peut être :

- La plante entière.
- Une partie de la plante (exemple : feuille de romarin, bouton floral de giroflier, fruit d'ombellifère, grain de colchique, etc…)
- Un suc (gomme des légumineuses, latex du pavot, etc…) **(Paris et Hurabielle, 1981).**

1.2. Classifications des métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits« secondaires ». La distinction entre métabolites primaire et secondaire est plus claire au niveau de la plante, alors que les métabolites primaires constituent le fonctionnement de la vie les métabolites secondaires n'ont pas de rôle connu dans l'assimilation des nutriments ni dans la croissance et le développement de la plante. En plus, leurs répartitions inégales dans les végétaux, ils sont caractéristiques de certaines espèces, genres ou familles. Cependant, durant ces trois dernières décennies, il a été montré que de nombreux métabolites secondaires jouaient un rôle écologique important.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...). Ils représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire **(Macheix et *al.*, 2005 ; Hopkins, 2003).**

Figure 1: Biosynthèse des métabolites secondaires **(Verpoorte et Alfermann, 2000 ; Wink, 2010)**.

1.2.1. Polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces **(Cuendet et *al*., 1999).** Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales ou bien lui permettent de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales **(Macheix et *al*., 2005).** Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale **(Martin et Andriantsitohaina, 2002)**.

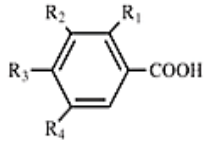
La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées **(Urquiga et Leighton, 2000).**

1.2.1.1. Acides phénoliques

Ce sont des molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle. Elles peuvent être également estérifiées, éthérifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides. Parmi les acides phénoliques en distingue les dérives de l'acide benzoïque, et ceux de l'acide cinnamique.

- **Dérivés d'acides hydroxy benzoïques**

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C1), et varient suivant les hydroxylations et les méthylations sur le cycle aromatique phénolique. Les plus répandus sont l'acide salicylique, l'acide gallique, l'acide syringique et l'acide gentisique. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes, d'où ils sont libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de lignine, de certains tanins **(Macheix et *al*., 2005).**

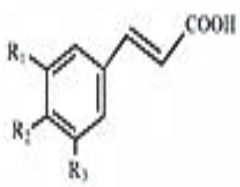


$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	acide benzoique (non phénolique)
$R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$	acide *p*-hydroxybenzoique
$R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$	acide protocatéchique
$R_1 = R_4 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$	acide vanillique
$R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OH$	acide gallique
$R_1 = H, R_2 = R_4 = OCH_3, R_3 = OH$	acide syringique
$R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$	acide salicylique
$R_1 = R_4 = OH, R_2 = R_3 = H$	acide gentisique

Figure 2: Structure de quelques hydroxybenzoïques **(Macheix et *al.*, 2005)**

- **Dérivés d'acides hydroxycinnamiques**

Ces composés répondent à une représentation structurale de type (C6-C3) dérive de l'acide cinnamique dont les plus abondants sont les acides caféique et coumarique. Ils sont à l'origine des voies de biosynthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes et les stilbènes. Alors que les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques sont généralement combinés avec d'autre molécules organiques formant des esters avec les acides (tartrique, quinique…), ou des phénolamines (avec tyramine, spermidine..). ils peuvent également être combines avec des sucres conduisant alors à des glucosides **(Collin et Crouzet, 2011)**.



$R_1 = R_2 = R_3 = H$	acide cinnamique (non phénolique)
$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$	acide *p*-coumarique
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$	acide caféique
$R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$	acide férulique
$R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$	acide sinapique

Figure 3 : Structure de quelques hydroxycinnamiques
(Macheix et *al.*, 2005)

1.2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi-universels des végétaux. Ils sont en partie responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux **(Ghedira, 2005).** Les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure de base du diphénylpropane à quinze atomes de carbones C6-C3-C6 (fig.4), qui est constitué

de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3.les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C **(Collin et Crouzet, 2011 ; Bruneton, 1999).**

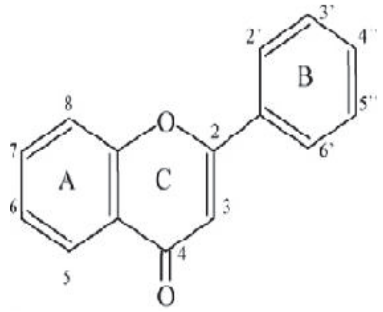
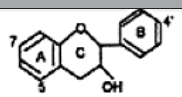
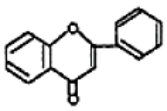
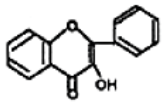
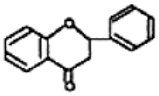
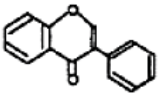


Figure 4 : Molécule de base des flavonoïdes (**Ghedira, 2005).**

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules, les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes **(Ghedira, 2005 ; Heim et *al*., 2002).** Elles se distinguent d'après la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation, du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C. Dans les flavonoïdes au sens strict, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés isoflavonoïdes. En plus, l'hétérocycle (C) peut-être une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols **(Birt *et al*., 2001).**

Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de *C*- où *O*-glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7). Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères **(Dacosta, 2003).** On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit.

Tableau 1 : Classe, structure des flavonoïdes d'après **Heim et *al*. (2002).**

Classe	Structure générale	Flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3′,4′-OH
		(-)-epicatechin	3,5,7,3′,4′-OH
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3′,4′,5′-OH,3-gallate
Flavone		chrysin	5,7-OH
		apigenin	5,7,4′-OH
		rutin	5,7,3′,4′-OH, 3-rutinose
		luteolin	5,7,3′,4′-OH
		luteolin glucosides	5,7,3′-OH, 4′-glucose
			5,4′-OH, 4′,7-glucose
Flavonol		kaempferol	3,5,7,4′-OH
		quercetin	3,5,7,3′,4′-OH
		myricetin	3,5,7,3′,4′,5′-OH
		tamarixetin	3,5,7,3′-OH,4′-OMe
Flavanone (dihydroflavon		naringin	5,4′-OH,7-rhamnoglucose
		naringenin	5,7,4′-OH
		taxifolin	3,5,7,3′,4′-OH
		eriodictyol	5,7,3′,4′-OH
		hesperidin	3,5,3′-OH,4′-OMe, 7-rutinose
Isoflavone		genistin	5,4′-OH, 7-glucose
		genistein	5,7,4′-OH
		daidzin	4′-OH, 7-glucose
		daidzein	7,4′-OH

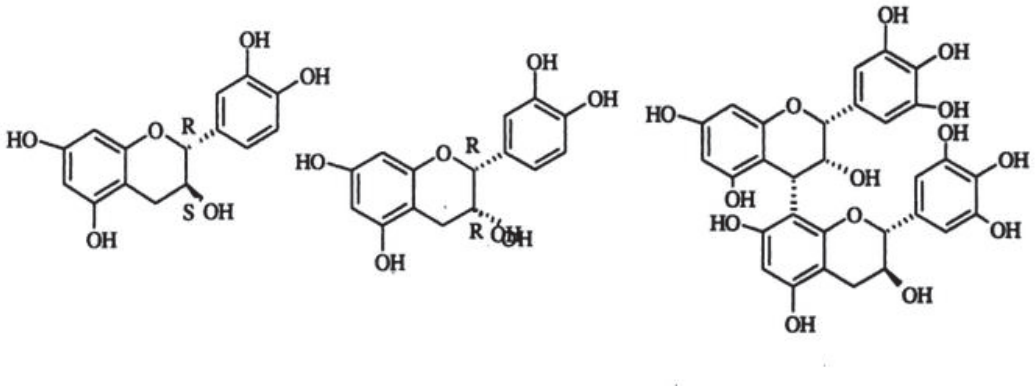
1.2.1.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure, à poids moléculaires relativement élevé, fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives.

Ils ont la propriété de tanner la peau, en plus, ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes. Les tanins sont divisés en deux groupes principaux d'après leurs structures et leurs propriétés, les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Tanins condensés**

Les tanins condensés ou proanthocyanidine, forment le groupe le plus important. Ce sont des dérivés non hétérosidiques, résultant de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines) **(Vermerris et Nicholson, 2006).**



Catéchine **Epicatéchine** **Prodelphinidine**

Figure 5: Structure de quelques tanins condensés **(Bhat et *al.*, 2006)**

- **Tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysés, sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique qui est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxy diphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des *tanins éllagiques* **(Bruneton, 1999).**

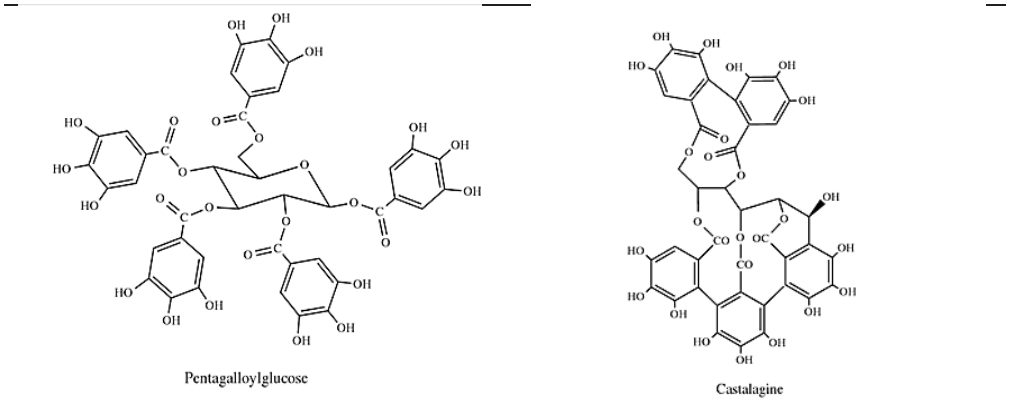
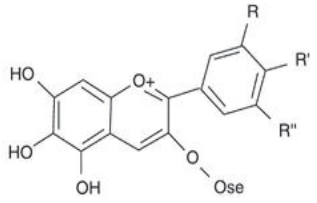


Figure 6: Structure de quelques tanins hydrolysables

(Macheix et *al.*, 2005)

1.2.1.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués **(Andersen et Markham, 2006).** Ce sont des pigments végétaux responsables de pigmentation des fleurs, fruits. Elles sont localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques et sous épidermiques des différents organes **(Bruneton, 1999).** En plus de leur pigmentation, elles ont des fonctions biologiques multiples, protection contre les rayons UV et pathogènes, attirent les insectes et les oiseaux qui jouent un rôle important dans la pollinisation et la dispersion des graines **(Samouelian et *al*., 2009).**



Pigment	R	R'	R''	Couleur
Pélargonidine	H	OH	H	rouge
Cyanidine	H	OH	OH	bleu
Delphinidine	OH	OH	OH	pourpre
Péonidine	OCH_3	OH	H	rose
Pétunidine	OCH_3	OH	OH	pourpre
Malvidine	OCH_3	OH	OCH_3	mauve

Figure 7: Structure de base des anthocyanes

(Samouelian et *al*., 2009)

1.2.1.5. Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation des dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,2-dicéto-cyclohexa-3,5-diénique, ou par un motif 1,4 dicéto-cyclohexa-2,5-diénique. Ils sont classés selon le nombre de noyaux aromatiques, en benzoquinones, naphtoquinones, anthraquinones et phénanthrènes **(Bruneton, 1999).**

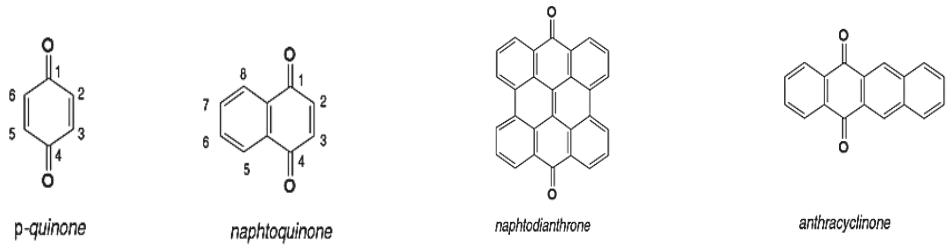


Figure 8 : Structure de quelques quinones **(Bruneton, 2009)**

1.2.1.6. Coumarines

Ce sont des lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydro-cinnamiques. Elles sont divisées en coumarines simples et complexes (furocoumarines, pyrannocoumarines). Les coumarines de différents types se trouvent dans de nombreuses espèces végétales. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique et abiotique **(Collin et Crouzet, 2009 ; Bruneton, 1999).**

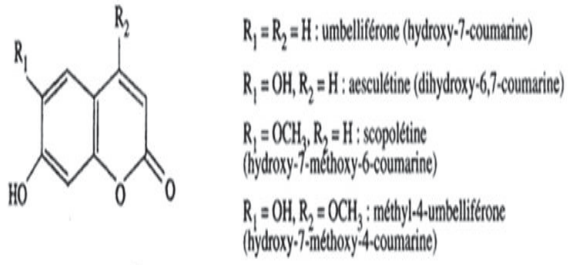


Figure 9 : Structure de quelques coumarines **(Collin et Crouzet, 2009)**

1.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine végétale, renfermant de l'azote et le plus souvent inclus dans un hétérocycle. Ils ont un caractère alcalin (de l'Arabe *alkaly* et du grec *eidos* qui fait référence à leur caractère basique).

Cette famille de métabolite secondaire a été partiellement étudiée, en raison de leurs propriétés toxiques et médicamenteuses. En effet plus 12.000 molécules ont été exploitées en industrie pharmaceutique **(Aniszewski, 2007)**.

La plupart des alcaloïdes sont toxiques comme la strychnine, l'aconitine, l'atropine, la cocaïne..., mais à faible dose ils ont des propriétés pharmacodynamiques, par exemple, de propriétés analgésiques avec la morphine ou la codéine, dans le cadre de protocoles de

sédation (anesthésie) souvent accompagnés d'hypnotiques, ou bien d'un usage comme agent antipaludéen (quinine, chloroquine) ou agent anticancéreux (vinblastine, vincristine), et même de la sédation aux opiacés avec l'ibogaïne.

Les alcaloïdes ont des structures très variées, nombreux d'entre eux ont une origine commune à partir des amino-acides. On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais :** qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle. Ils existent à l'état de sel (exemple : cocaïne, quinine, morphine)
- **Proto-alcaloïdes**, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : hardenine, merscaline)
- **Pseudo-alcaloïdes**, qui ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : caféine, éphédrine) **(Aniszewski, 2007).**

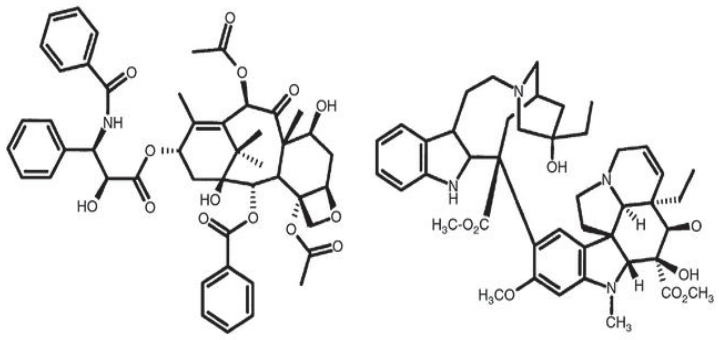


Figure10 : Structure de quelques alcaloïdes **(Aniszewski, 2007)**

1.2.3. Terpènes et leurs dérivés

Le nom du terpène (terpénoïde ou isoprénoïde) provient du nom de l'arbuste méditerranéen du térébinthe, que les molécules terpéniques soient cycliques ou non. Leur formation ainsi que leurs propriétés extrêmement variées, ont en commun de dériver de l'isoprène C_5H_8.

Leur synthèse passe par isopentenyl diphosphate (IPP) provenant de la voie de l'acide mévalonique **(Hopkins, 2003).** Leur squelette carboné renferme un atome de carbone issu multiple de 5 carbones de type isoprène.

Selon le nombre d'unités isoprèniques les terpènes sont classés en **:** Monoterpène (C_{10}) correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes, Sesquiterpènes (C_{15}), Diterpènes (C_{20}). Triterpènes (C_{30}). Tértraterpènes ou caroténoïdes

(C_{40}) **(Bruneton, 1999)**. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation d'un nombre d'unités isoprèniques à partir de laquelle se forme par polymérisation et isomérisation tous les autres dérivés (**Guignard, 2000).** Les terpènes peuvent être présents sous la forme d'hydrocarbure ou peuvent être oxygénés **(Bruneton, 1999);** et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes.

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc.

Un autre type des monoterpènes : **les iridoïdes** qui ont un squelette méthylcyclopentanique (iridane), dans un sens plus large, les iridoïdes peuvent aussi inclure les séco-iridoïdes dont le noyau cyclopentane est ouvert suite à une rupture de la liaison entre C_7,C_8. Les iridoides sont généralement associés à des sucres sous forme d'hétérosides et caractéristiques de certains cotylédones.

Les iridoïdes sont présents dans un nombre de plantes médicinales auxquelles ils confèrent leurs propriétés pharmaceutiques. On peut même remarquer qu'ils sont préférentiellement élaborés par des gamopétales : Dipsacales, Gentianals, Scorphularialles, ce qui en fait des marqueurs chimiotaxonomiques. Environ 500 structures sont actuellement connues, présentant des variations structurales nombreuses. Des iridoïdes non hétérosidiques pouvant donner naissance à des structures polycycliques ou même alcaloïdes, des esters, des éthers. D'ailleurs certaines ont permis de proposer des subdivisions à l'intérieur du groupe (**Rahman, 2005).**

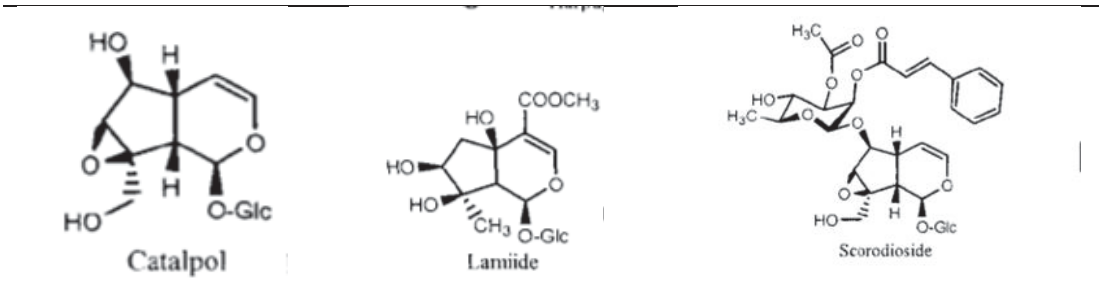


Figure 11: Structure de quelques iridoïdes **(Rahman, 2005)**

Une large gamme des sesquiterpènes contiennent un cycle γ-lactone et sont connus sous le nom des **sesquiterpènes lactones.** Particulièrement chez les Astéraceae, chez ces derniers, les sesquiterpènes lactones sont localisés dans des poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, tiges, ou des bractées **(Bruneton, 2009).**

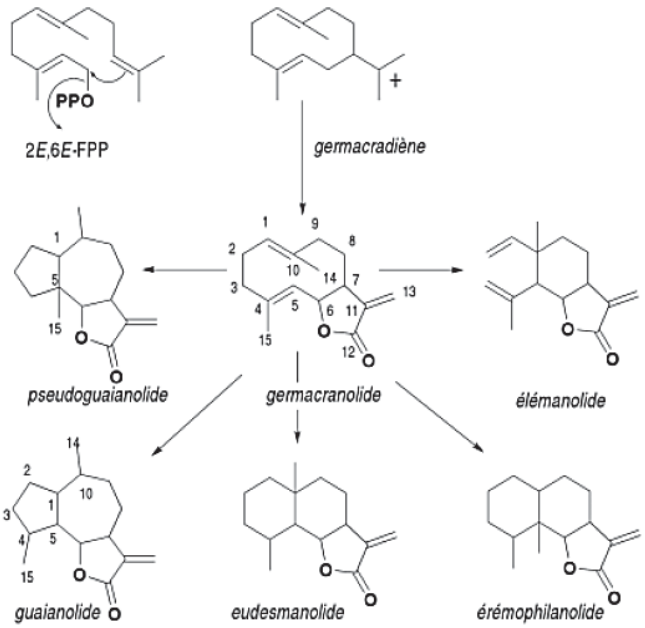


Figure12: Filtration schématique des principaux groupes des lactones sesquitérpèniques **(Bruneton, 2009)**

Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme les hormones (gibbérellines et l'acide abscissique), des pigments (carotène et xanthophylle), les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, le latex qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire.

1.2.3.1. Saponines

Les saponines sont des terpènes glycosylés très fréquents chez les végétaux, ils peuvent être stéroïdes glycosylés, stéroïdes alcaloïdes glycosylés, hétérosides triterpénoïdes. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives ou détergents, ils font apparaitre de la mousse savonneuse lorsqu'on les mélange avec l'eau **(Hopkins, 2003)**.

Structuralement, les saponosides sont classés selon la nature de leurs génines stéroïdes et les triterpénoïdes :

✓ **Saponosides stéroidiques.** Les saponines à génine stéroïdique sont pratiquement présentes chez les Angiospermes Monocotylédones (Liliopsida). Ils sont classes en hétérosides de spirostanales, hétérosides de furostanoles et hétérosides d'amines stréroidiques (pseuso-alcaloïdes).

✓ **Saponosides triterpénoïdes.** La plupart des saponines végétales appartiennent à cette classe, elles existent chez quelques Ptéridophytes. Pratiquement inexistants chez les Gymnospermes, on les rencontre, pour l'essentiel, chez les Angiospermes –Dicotylédones. La majorité des génines triterpéniques sont des molécules pentacycliques : oleanane, ursane et lupane. Parfois, tétracyclique : lanosta **(Güçlü-Ustündağ et *al.*, 2007)**

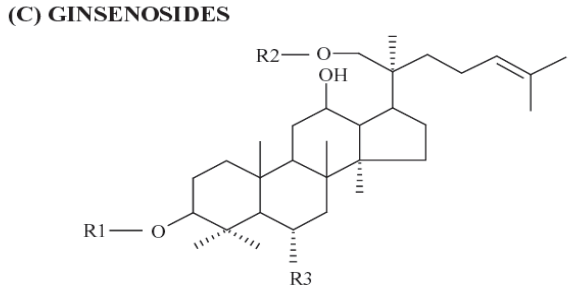


Figure 13: Structure chimique d'un saponoside : Ginsénoside **(Güçlü-Ustündağ et *al.*, 2007)**

1.2.4. Propriétés biologiques

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, de nombreux métabolites secondaires peuvent être valorisés en pharmacologie ; parmi eux, citons les phyto-œstrogènes du Soja, permettant de gérer les symptômes, de la ménopause, ou le taxol de l'if utilisé comme

anticancéreux, ou encore la quinine de quinquina, permettant de lutter contre la malaria **(Bouharmont et *al.*, 2011)**. On attribue aux métabolites secondaires des propriétés variées :antibactériennes, antiradicalaires, anti-inflammatoires, antiestrogéniques, antispasmodiques, antiallergiques, antitumorales, hépatoprotectrices, estrogéniques, veinotoniques et analgésique….etc.

Nous indiquons dans le tableau 2 quelques propriétés biologiques des métabolites secondaires sur l'organisme.

Tableau 2: Propriétés biologiques des métabolites secondaires sur l'organisme

Composé	Activités biologiques	Références
Flavonoïdes	Antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, Anti-hépatotoxiques, anti-ulcerogènes, protecteurs vasculaires, inhibitrices d'enzymes, antimicrobiennes, antiarthrites, anti cancer, ostreogènes, antioxydantes	(Ghedira, 2005 ; Shi et *al*., 2015; Birt et *al*., 2001 ; Cushnie et lamb, 2005 ; Bhat, 2005).
Acides phénols	Antiparasitaires, antifongiques, antioxydantes, antibactériennes, anti-ulcéreuses.	(Flores et *al*., 2009)
coumarines	anti-inflammatoires, anticoagulants	(wichtl et Anton, 2003 ; Collin et Crouzet, 2009)
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques, anti inflammatoires, antidiurétiques, antibactériennes, vasoconstricteurs, inhibiteur enzymatiques spécifiques, hémostatiques.	(Bruneton, 2009 ; Bahorun, 1997 ; Wichtl et Anton, 2003)
Quinones	Antimicrobiennes, antispasmodiques, anti-diarrhéiques, anti-inflammatoires	(Wichtl et Anton, 2003)
Terpènes	anti-inflammatoires, antitumorales	(Rahman, 2005)
Huiles essentielles	Anticancéreuse, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antioxydantes, spasmolytiques, analgésiques, sédatives, diurétiques	(Durrafourd et *al.*, 1997 ; Bakkali et *al*., 2008)
Alcaloïdes	anticancéreuses, antimalariques, effets sur le système nerveux, anti-douleurs	(Aniszewski, 2007 ; Iserin, 2001)
Saponines	Diurétiques, expectorants, antimycotiques Antifongiques, vasoconstrictrices et anti-inflammatoires.	(Guo et *al*., 2008 ; Rahman, 2005)

1.3. Huiles Essentielles

1.3.1. Généralité

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux, et selon **L'AFNOR. (2000)** (Association française de Normalisation), une huile essentielle est définie comme étant un : "*produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par expression, procédé mécanique mis en œuvre à partir de l'épicarpe des Citrus*".

Les huiles essentielles font partie des métabolites secondaires qui assurent divers rôles fonctionnels au sein de la plante. Elles représentent un élément de communication chimique **(Bruneton, 2009).** Les huiles essentielles permettent, entre autres, à la plante de se défendre contre les agressions extérieures. Elles ont des propriétés répulsives ou attractives vis-à-vis des insectes. En plus, elles ont un rôle attractif favorisant la pollinisation des fleurs (économiquement, très importante pour les arbres fruitiers). Elles présentent aussi des propriétés antiseptiques dirigées contre les parasites du sol et des propriétés inhibitrices sur la germination des graines sur le sol **(Kaloustrian, 2012).**

1.3.2. Localisation et lieu de synthèse

Il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles dont les Lamiaceae, les Asteraceae, les Rutaceae et les Lauraceae. Dans la synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *Liaceae, Germinaceae*, et *Rutaceae*, ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés au sein des tissus végétaux chez les *Myrtaceae, Auranthiaceae*, ainsi que les canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaceae, Apiaceae* ou *Asteraceae*.

Les essences dans la plante peuvent être stockées dans divers organes : Les fleurs (Origan), feuilles (Citronnelle, Eucalyptus, Pistachier), écorces (Cannelier), bois (bois de Rose, Santal) racines (Vétiver), rhizomes (Gingembre), sève (Myrte), bourgeons (Pin), fruit (Badiane) ou graines (Carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe **(Bruneton, 1999).**

1.3.3. Composition chimique

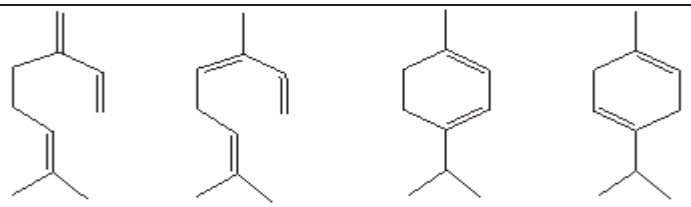
Les Huiles Essentielles peuvent contenir une centaine de composés différents, appartenant à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques spécifiques : les terpènes et les dérivés du phénylpropane biosynthétisé essentiellement à partir de l'acide shikimique **(Bruneton, 1999).**

1.3.3.1. Les terpènes

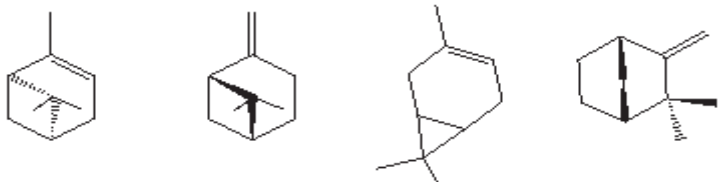
Les Huiles Essentielles sont constituées d'un certain nombre de composés terpéniques, généralement les plus importants. Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de 5 atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)n$. Ce dernier, sous sa forme réactive est L'isopentényl- pyrophosphate IPP qui se transforme en diméthylallyl pyrophosphate DMAPP. Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranyl pyrophosphate GPP, précurseur des monoterpènes en C_{10}. Une deuxième molécule d'IPP réagissant sur le GPP, fournit farnésyl pyrophosphate FPP, précurseur des sesquiterpènes en C_{15}, puis une troisième molécule d'IPP réagissant sur FPP fournit le géranylgéranyl pyrophosphate GGPP, précurseur des diterpènes en C_{20} et ainsi de suite, pour la formation des septerpènes en C_{25}, des triterpènes en C_{30}, des carotènes en C_{40} **(Kaloustrian, 2012)**.

- **Monoterpènes**

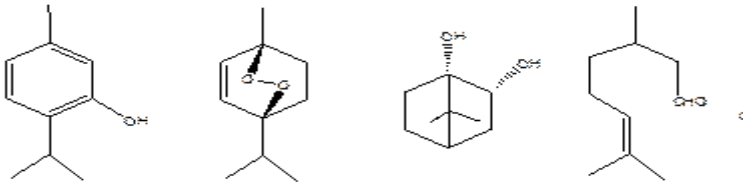
Ce sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être acycliques (myrcènes, ocymène), ou cycliques comme (pinène, camphène), et même aromatiques comme le p-cymène, aussi, ils peuvent contenir des atomes d'oxygène (dérivés oxygénés) comme alcool (linalol), cétone (camphre), phénol (thymol, carvacrol) **(Fig.14).**



myrcène *ocimène* *α-terpinène* *γ-terpinène*



(-)α-pinène *(-) β-pinène* *3-carène* *(+)-camphène*

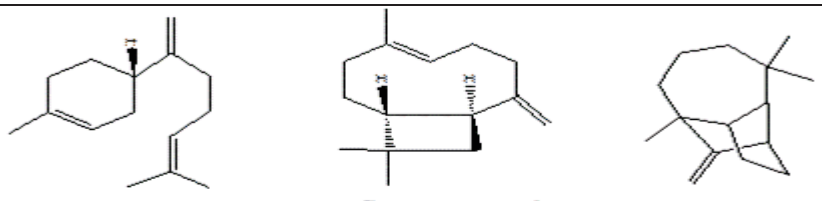


thymol *ascaridol* *(-)- bornéol* *citronellal*

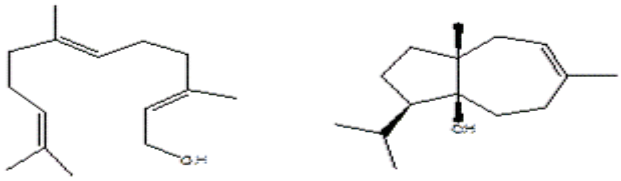
Figure 14: Structure chimique de quelques monoterpènes des HEs **(Bruneton, 1999).**

- **Sesquiterpènes**

On trouvera également des sesquiterpènes avec des fonctions chimiques caractéristiques : alcool (farnésol, carotol), carbure (β-caryophyllène), cétones et esters **(Baser et Buchbauer, 2010)**. **(Fig.15).**



β-bisabolène *β-caryophyllène* *longifolène*



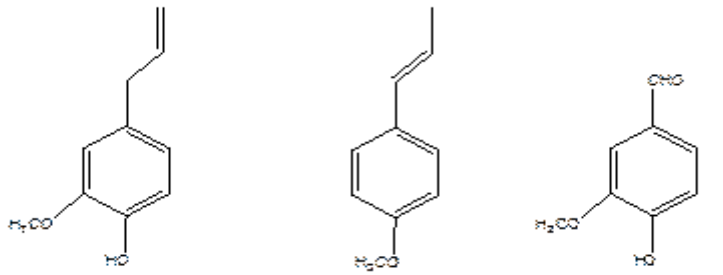
trans, trans-farnésol *carotol*

Figure 15: Structure chimique de quelques sesquiterpènes des HEs **(Bruneton, 1999).**

1.3.3.2. Composés aromatiques (phénylpropanoïdes)

Les dérivés aromatiques des huiles essentielles sont formés à partir de l'acide cinnamique (C6-C3), qui provient de l'acide shikimique **(Bruneton, 1999)**. Ils existent sous forme : des aldéhydes (cinnamldéhyde), des dérivés méthoxylés (anéthole), ainsi que des phénols (eugénol), des alcools (alcool cinnamique),des méthylène-dioxy (apiol, safrole)**(Fig.16).**

Les phénylpropanoïdes sont moins répondus dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines Huiles Essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil) et de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle **(Bakkali, 2008).**



eugénol *E-anéthole* *vanilline*

Figure 16: Structure chimique de quelques composés aromatiques **(Bruneton, 1999)**

1.3.3.3. Composés d'origine diverse

Les huiles essentielles peuvent renfermer des composés d'origines diverses, issues de la transformation de molécules non volatiles et qu'ils sont entrainables par la vapeur d'eau. **(Bruneton, 1999).** Des acides organiques de faible poids moléculaire acides acétiques, valeniques, isovaleniques, des cétones de faible poids moléculaire, des coumarines volatiles ex (bergaptènes), des composés azotés ou soufrés, des composés issus de la dégradation d'acide gras exemple la formation d'acide jasmonique et leurs esters **(Paris et Hurabielle, 1981).**

1.3.4. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire rétinoïdes, très odorantes, volatiles, incolores ou jaunes pâles excepté quelques couleurs caractéristiques : rouge pour l'HE de Cannelle, verte pour l'Absinthe, et bleue pour la camomille. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau (de l'ordre de 0,750 à 0,990), à l'exception des huiles essentielles de la cannelle, et des clous de girofle.
Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcools, les huiles fixes et la plupart des solvants organiques, En outre, les huiles essentielles se distinguent les unes des autres par :

- ✓ leurs propriétés organoleptiques : l'aspect, la couleur, la saveur, l'odeur ;
- ✓ leurs propriétés physiques : la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, la solubilité ;
- ✓ leurs propriétés chimiques : la composition chimique, l'indice d'acide et d'ester, l'indice de saponification, d'alcool, de phénol et de composés carbonylés **(Kaloustrian, 2012 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Bardeau, 2009).**

1.3.5. Procédés obtention

Les huiles essentielles sont obtenues selon plusieurs techniques.

1.3.5.1. Expression à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les agrumes, dont l'écorce deszsruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer (à l'aide /

de presses) les zestes frais de manière à faire éclater les cellules contenant l'huile essentielle, l'essence est récupérée sur une éponge naturelle que l'on presse ensuite pour en recueillir l'huile essentielle **(Roux, 2008 ; Zhiri et Baudoux , 2005).**

.

1.3.5.2. Distillation en présence d'eau

● **Hydrodistillation simple :** Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (entier, coupé ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide (réfrigérant). Le condensat est récupéré dans un erlenmeyer où l'HE se sépare de la phase aqueuse par différence de densité**.** L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger**.** Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon L'eau en excès retourne dans l'alambic **(Fabrocini, 2007 ; Moro-Buronzo, 2008).**

● **Distillation à vapeur saturée** le végétal n'est pas en contact avec l'eau ; la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entrainées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques, et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau surnage au-dessus de l'hydrolat **(Bruneton, 1999).**

● **Hydrodiffusion** Elle a été développée par la firme Suisse Schmidt S.A. qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La matière végétale est disposée sur une grille à l'intérieur d'un parallélépipède métallique, ce qui permet une meilleure répartition de la charge **(Garnero, 1991).**

1.3.5.3. Autres procédés

- **Extraction au CO_2 supercritique**

À l'état supercritique, le CO_2 présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques exactement comme un solvant organique classique. Dans cette technique, un courant de CO_2 à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraine les HEs qui

seront ensuite récupérées. Cette technique est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel sans aucune trace de solvant **(Willem, 2002).**

- **Extraction par les solvants organiques**

On épuise les plantes fraiches par des solvants volatiles (par exemple l'essence de jasmin), dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très colorés, très aromatique la concrète. Cette concrète purifiée par l'alcool absolu, donne l'absolue, sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle. On appelle résinoïde l'homologue de la concrète obtenue à partir de plante sèche **(Duraffourd et Lapraz, 2002)**

- **Extraction par enfleurage :**

Elle consiste à mettre en contact la fleur avec un corps gras qui se sature d'essence.

Puis ce corps gras est épuisé par un solvant qui est évaporé sous vide. Cette méthode délicate et coûteuse est remplacée par l'extraction par les solvants. Il y a deux types l'enfleurage.

L'enfleurage à froid : Quand la technique se pratique à froid

L'enfleurage à chaud (digestion): Quand la technique se pratique à chaud **(Kaibeck, 2013).**

Le produit obtenu est une pommade florale puis épuisée par l'alcool absolu (dans lequel les corps gras sont très peu solubles). L'alcool est ensuite évaporé sous vide**.**

Les différentes méthodes utilisées pour extraire les HEs des plantes, conduisent à des produits présentant des compositions différentes. Les pharmacopées n'admettent comme procédés d'extraction que l'entraînement à la vapeur ou l'expression **(Bruneton, 2009 ; Belaiche, 1991).**

1.3.6. Facteurs de variabilité

La variabilité chimique des Huiles essentielles est d'ordre génétique, mais peut aussi dépendre de la période de récolte, des conditions climatiques, de la localisation géographique, de la nature du sol et des méthodes d'obtention.

1.3.6.1. Influence des facteurs intrinsèques

- **Existence de variétés chimiques ou chémotypes**

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes.

Les chémotypes, on dit aussi races chimique, sont très fréquents chez les plantes à huiles essentielles. L'un des exemples les plus démonstratifs est celui du thym (*Thymus vulgaris* L.) de la méditerranée occidentale. On compte pour cette espèce, morphologiquement homogène et caryologiquement stable, sept chimiotypes différents : six dans les garrigues du sud de la France (à thymol, à carvacrol, à géraniol, à linalol, à α-terpinéol, à *trans*-4-thuyanol et *cis*-8-myrcénol) et un, en Espagne, à cinéole. Le même phénomène s'observe pour d'autres espèces du genre *Thymus* ainsi que pour d'autres Lamiaceae : des chémotypes thymol et carvacrol ont été mis en évidence chez certaines espèces de *Thymbra*, *Satureja*, *Majorana, Origanum et Corydothymus* **(Bruneton, 2009 ; Zhiri et Baudoux , 2005 ; Franchomme, 2001).**

- **Selon l'organe végétal**

La composition et le rendement d'une HE varient selon la partie de la plante à partir de laquelle est extraite (par exemple, la fleur de lavande contient beaucoup plus d'huile essentielle que la tige)**.**

- **Selon le cycle végétatif**

Pour une espèce donnée, la proportion des différents constituants d'une huile essentielle peut varier tout au cours de son développement **(Bruneton, 1999),** par exemple pour les labiées, le plus souvent, pendant la période de floraison. Les sommités fleuries (feuilles et fleurs en début de floraison) du thym (*Thymus vulgaris*) sont cueillies à la fin du printemps ou au début de l'été) car elles sont riches en thymol et en carvacrol (phénols) ; en hiver, les feuilles seules sont riches en précurseurs des phénols (γ-terpinène et *p*-cymène) **(Kaloustrian, 2012)**

1.3.6.2. Influence des facteurs extrinsèques :

Il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence plus importante pour les espèces végétales dont les organes qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles (ex. : poils sécréteurs des Lamiaceae) que pour ceurx dont huile est produite dans des formations schizogénèses (localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante). Il y a des différences

de composition chimique selon le pays d'origine. Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes **(Bowles, 2003).** Quelques exemples illustrent cette influence des facteurs extrinsèques :

-chez la menthe poivrée, les jours longs et les nuits tempérées conduisent à des rendements en huile essentielle plus élevés et à une augmentation de la teneur en menthofuranne. *A contrario,* les nuits froides favorisent la formation de menthol.

-chez *Laurus nobilis* L., la teneur en huile essentielle des feuilles exposées au sud est plus importante que celle des feuilles exposées au nord.

-chez certains *Citrus*, la teneur est d'autant plus élevée que la température est importante. Les pratiques culturales sont également déterminantes sur le rendement et la qualité du produit final. L'apport d'engrais et l'influence des variations N, P, K ont été étudiés pour diverses espèces. L'expérience montre qu'il n'y a pas de règles générales applicables dans tous les cas. Un autre élément fondamental est le régime hydrique. Là encore, toute généralisation s'avère hasardeuse **(Bruneton, 1999).**

Chapitre 2 :

Stress oxydant et Résistance bactérienne

2.1. Stress oxydant

2.1.1. Définition

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et leur élimination **(Migdal et Serres, 2011)**. Dans les phénomènes de stress oxydant (prenant place dans les milieux biologiques), les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ils sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un grand désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaires **(Powers et Jackson, 2008).**

2.1.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène ERO, en anglais ROS (Reactive Oxygen Species), elles incluent l'ensemble des radicaux libres de l'oxygène proprement dit tels que le radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), le radical peroxyle ($ROO^{\bullet}$), mais également certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) L'oxygène singulet ($^1O_2$) **)(Dacosta, 2003),** certaines espèces réactives de l'azote (RNS : Reactive Nitrogen Species) appartenant à ce groupe puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et quelles se comportent comme ERO vis-à-vis d'un stress oxydant le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) et le péroxynitrite ($ONOO^-$) **(Favier, 2003).**

Les espèces réactives sont produites dans la mitochondrie en grande partie au cours de la respiration cellulaire pour fournir l'énergie nécessaire à la machinerie cellulaire **(Edeas, 2007 ; Gardès-Albert et *al*., 2003).** En effet, toute réaction impliquant de l'O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO **(Barouki, 2006)**. D'autre part les ERO peuvent se produire naturellement par l'organisme au cours de processus biologiques comme la réponse immunitaire, principalement d'origine enzymatique (la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la NO-synthase, les lipooxygénases et cyclooxygénases) (**Babior et *al*., 2002)**, et durant le catabolisme de certains xénobiotiques **(Migdal et Serres, 2011).** Les espèces réactives sont également générées en réponse à un stress environnemental (pollution, fumée de tabac, fibres d'amiante, ultraviolets, pesticides...) **(Edeas, 2007).**

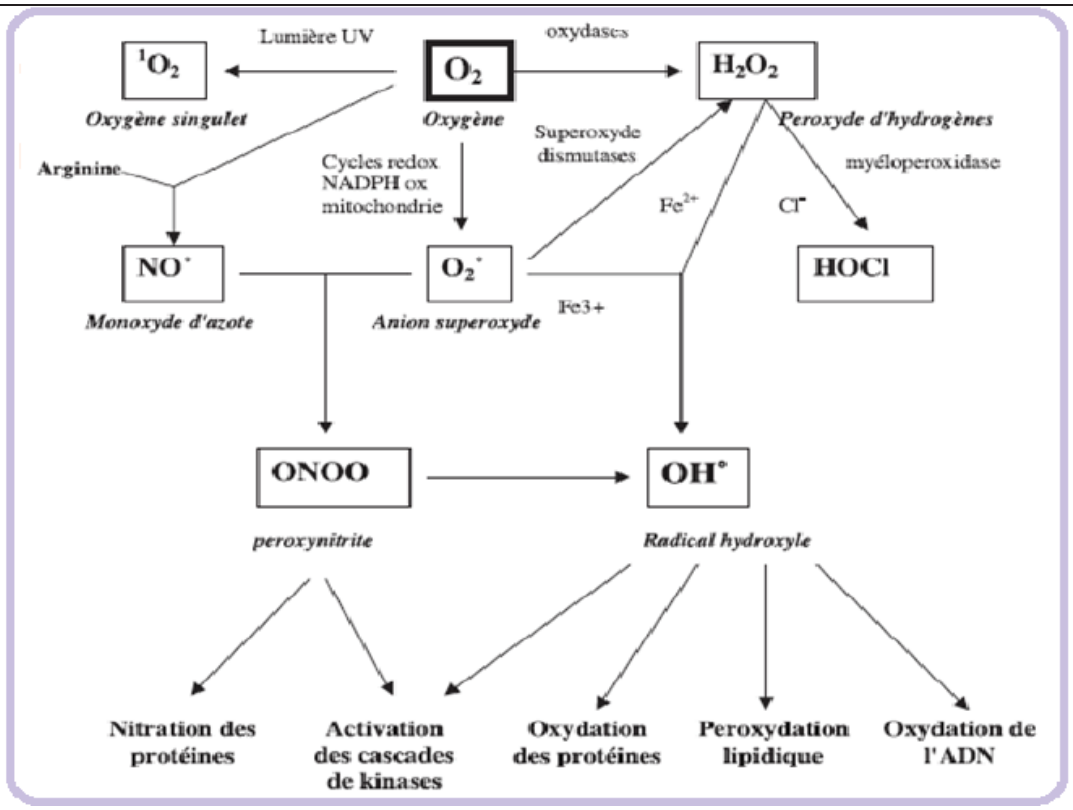


Figure 17 : Origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie **(Favier, 2003)**

2.1.3. Atteintes liées aux ERO

Les atteintes radicalaires de divers composants cellulaires peuvent induire de nombreuses perturbations cellulaires, qui entrainent le développement d'altérations cellulaires pouvant aboutir au disfonctionnement de certains organes, de ce fait, les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses pathologies.

2.1.3.1. Oxydation des lipides

Les chaines d'acides gras insaturés (constituants essentiels des membranes cellulaires) constituent une cible majeur pour les ERO, l'oxydation des lipides polyinsaturés, en présence d'oxygène, est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connue sous le nom de péroxydation lipidique **(Vellas et Robert, 2013).**

Les peroxydations lipidiques vont altérer la structure des cellules animales ou végétales, et sont responsables de la dégradation organoleptique des aliments.

2.1.3.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont aussi la cible des ERO, soit au niveau de leur chaine latérale, avec formation des produits d'oxydation ; soit au niveau de la liaison peptidique, entrainant la fragmentation de la chaine (**Levine, 2002),** en particulier pour certains acides aminés comme la cystéine, la méthionine et la tyrosine. Cette oxydation joue un rôle dans la maturation et dans la signalisation mais peut aussi conduire à une toxicité cellulaire. Une oxydation des protéines peut conduire à leur carbonylation et à leur dénaturation **(Barouki, 2006).**

2.1.3.3. Oxydation des acides nucléiques

Les bases nucléiques sont susceptibles d'être oxydées, ce qui serait à l'origine de mutations géniques ou de défauts de transcription. L'attaque de l'ADN par les radicaux libres (en particulier le radical hydroxyl) peut entraîner des cassures dans la double hélice, et des modifications de bases. Ces altérations pourraient atteindre la formation des protéines et contribuer à la dysfonction et à la mort cellulaire (**Vellas et Robert, 2013).** Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et aussi dans le vieillissement cellulaire **(Haleng et *al*., 2007)**

2.1.4. Antioxydants

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO **(Favier, 2003).** Il est clair que tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes pour contrer les conséquences potentiellement délétères des agents pro oxydants. Un antioxydant peut agir de diverses manières **;**

- Les chélateurs des métaux de transition : la séquestration des métaux de transition par les protéines spécifiques empêchant la réaction de Fenton et la production de *OH.
- Les désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet
- Les piégeurs d'oxygène
- Les donneurs d'hydrogène
- Destruction des peroxydes : en métabolisant grâce à des enzymes (superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase) (**Cillard, 2006).**

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

- Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques).
- D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation. C'est le cas par exemple de la cystéine et la Coenzyme Q10 **(Pokorny et *al*., 2001).**

Le tableau 3 ci-dessous présente les principales substances utilisées pour lutter contre toute forme d'oxydation (**Pokorny et *al*., 2001; Le Cren, 2004).**

Tableau 3: Principales substances antioxydantes **(Pokorny et *al*., 2001; Le Cren, 2004)**

A. Enzymatiques	**A. Non enzymatique**			**A. de synthèse**
Enzymes Cytosoliques	Vitamines	Minéraux	Phytochimiques	
-GPX (GlutathionPeroxydase) -GRD (Glutathion réductase) - GRT (Glutathion ransférase) -SOD (Superoxyde Dismutase) -Catalase	-Vit C -Vit E (Tocophérols) -Vit Q (Ubiquinone) -Vit A (Rétinol) -Vit B5 (A. pantothénique	Sélénium -Zinc -Manganèse -Cuivre -Magnésium -Anhydride sulfureux (SO2)	-Terpènes -Polyphénols	-BHT (3,5ditertobutyl-4hydroxytoluène) -BHA (3-tertiobutyl4-hydroxyanisole) -TBHQ (tertiobutylhydro-xyquinone) -Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique) -Gallate de propyle (E310) -Gallate d'octyle (E311) -Gallate de dodécyle (E312

A : antioxydant

2.5.1. Plantes, source naturelle d'antioxydants :

Il y a actuellement un regain d'intérêt pour les phytomolécules comme source potentielle d'antioxydants naturels, comme les flavonoïdes, les polyphénols. Les composés phénoliques particulièrement ont montré une activité antioxydante *in- vivo* et *in- vitro* **(Urquiza-Martínez et Navarro, 2016).**

Les polyphénols doivent leur activité (comme leur nom l'indique), à un très grand nombre de résidus hydroxyles, qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne **(Rolland, 2004).** Leur effet antioxydant est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans : Le piégeage direct des ERO ; L'inhibition des enzymes génératrices d'ERO ; La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ; L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes **(Nijveldt et *al.*, 2001 ; Halliwell, 1994)** et d'autre part via la modulation des voies de signalisation intracellulaires contrôlant l'expression des enzymes anti-oxydantes (**Morand et Milenkovic, 2014)**. Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires. Nous consommons chaque jour environ un gramme de polyphénols qui proviennent exclusivement des aliments d'origine végétale **(Edeas, 2007).**

L'activité antioxydante des **flavonoïdes** peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis des effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou en captant les cations métalliques. En effet les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif et ils sont également capables de chélater les ions métalliques oxydants **(Cotelle et *al.*, 1996**) en inhibant les enzymes responsables de la génération des ERO **(Cotelle, 2001).** Cette capacité antioxydante serait liée à l'affinité pour les radicaux et donc à la structure du flavonoïde : la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo**,** la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3, un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant.

L'effet de la glycosylation diminue l'activité des flavones et flavanones **(Heim, 2002 ; Van Acker et *al*., 1996),** plusieurs flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la lipooxygénase et/ou de la cyclooxygénase, ce qui pourrait être en relation directe avec leur capacité à piéger les radicaux libres. Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif, qui est en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement **(Quideau *et al*., 2011)**.

Les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols. Ils ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi la réaction en chaîne de l'auto- oxydation des lipides **(Rahman *et al*., 2005)**.

Quant aux **acides phénoliques** , les dérivés de l'acide hydroxycinnamique, plus exactement des dérivés des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et chlorogénique ont une activité antioxydante plus importante que les dérivés hydroxyles de l'acide benzoïque étant donné que la présence de CH_2=CH - COOH dans les acides cinnamiques, assure une plus grande capacité antioxydante par rapport au groupe COOH dans l'acide benzoïque (**Gocer et Gulcin, 2011)**. Les **coumarines** sont également d'excellents piégeurs des radicaux libres et de très bons chélateurs des métaux **(Al-Majedy et *al*., 2016).** En effet, des substances comme l'esculétine, le fraxetin, la daphnétine et d'autres dérivés de coumarine sont reconnus comme inhibiteurs de la lipoxygénase et cyclooxygénase, et de la génération anion superoxyde (**Fylaktakidou et *al*., 2004).**

Plusieurs études ont montré des propriétés antioxydantes des huiles essentielles **(Muthumperumal et *al*., 2016 ; Viuda-Martos, 2011 ; Wei et Shibamoto, 2007 ; Bakkali, 2008).** Les effets antioxydants d'huiles essentielles sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique **(Amzad- Hossain et *al*., 2008).**

Les **Caroténoïdes** constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouve le β-carotène. Ce dernier est une molécule liposoluble présente dans les

membranes biologiques. C'est un précurseur de la vitamine A (rétinol) et se trouve principalement dans les légumes et les fruits (carotte, poivron).

Il possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Nous avons également l'alpha carotène (mangue), la lutéine (épinards), le lycopène (tomates). Les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet $^1O_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par rayons ultraviolets de la lumière solaire **(Gardès-Albert et *al*., 2003)**.

2.2. Résistances bactériennes

Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, d'autres agents antimicrobiens plus efficaces ont été découverts et mis au point par l'élucidation des cibles médicamenteux et par une modification des molécules médicamenteux **(Kohanski *et al.*, 2010).**

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie**.** Ils peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens **(Singh et Barrett, 2006).**

L'utilisation accrue d'antibiotique conduit à une résistance bactérienne (connu pour toutes les familles d'antibiotiques) **(Rao, 1998)**, on distingue deux types de résistance : Résistance bactérienne naturelle et acquise.

2.2.1. Résistance bactérienne naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les bactéries d'une même espèce ne possèdent pas dans leur structure, la cible que l'antibiotique devra atteindre pour la détruire. L'espèce bactérienne sera naturellement résistante à cet antibiotique **(Remy, 2010).** C'est ainsi que, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux β-lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (la paroi bactérienne) **(Normak et *al*., 2002).**

Lorsque la bactérie possède une enzyme capable de détruire l'antibiotique, 50% des souches *staphylococcus aureus* possèdent une enzyme appelée pénicillinase capable de rendre la pénicilline inactive **(Remy, 2010).**

2.2.2. Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise survient lorsque des souches d'une même espèce donnée, normalement sensible aux antibiotiques deviennent résistantes. Elle peut être d'origine chromosomique où plasmidique **(Clos, 2012).** Dont son niveau augmente à partir de l'utilisation de l'antibiotique. Ainsi, l'antibiotique ne crée pas la résistance à l'échelle d'une population bactérienne, il ne fait que sélectionner un mécanisme de résistance **(Tigaud, 2004).** L'utilisation irraisonnée et importante d'antibiotique, en détruisant les souches non résistantes, favorise la sélection et le développement des souches résistantes. Ce phénomène est encore aggravé lorsque l'on utilise des doses d'antibiotiques insuffisantes ou qu'on arrête le traitement trop tôt. De plus certaines souches ont acquis une résistance à de nombreux antibiotiques, ce sont des souches multi-résistantes **(Remy, 2010).**

2.2.3. Plantes, source naturelle d'antibactériens

Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, durant ces dernières années, un intérêt accru s'est focalisé sur les substances biologiquement actives isolées des plantes (**Goetz et Ghedira 2012).** Parmi ces substances on trouve : les huiles essentielles et les polyphénols

2.2.3.1. Propriétés antimicrobiennes importantes des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des substances aromatiques est connue de façon empirique depuis l'Antiquité. Des études expérimentales ont été entreprises en France dès 1885, et en 1938, René-Maurice Gattefossé décrit la considérable avancée de la recherche dans ce domaine. Ces dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt considérable dans l'étude de nouveaux antimicrobiens végétaux. Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **(Kaloustrian, 2012 ; Burt, 2004).**

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire **(Burt, 2004).** Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* **(Wan *et al*., 1998)** et *Campylobacter jejuni* **(Wannissorn *et al*., 2005)** ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles.
La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* **(Dorman et Deans, 2000**). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **(Kalemba et Kunicka, 2003).** Elle est à mettre en relation avec sa composition chimique, et les possibles effets synergétiques. Dans ce contexte, carvacrol, thymol, eugénol et cinnamaldéhyde semblent être, comme le confirme la pratique quotidienne en aromathérapie, les molécules phares de la lutte antimicrobienne et leur cible privilégiée, des bactéries aussi variées que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus.*

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être
Inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) **(Tohidpour *et al*., 2010 ; May *et al*., 2000)** et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) **(Fisher et Phillips, 2009).**

2.2.3.2. Propriétés antibactériennes importantes des composés phénoliques

Les composés, appartenant aux **acides phénoliques**, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféiques. On les retrouve présents dans le thym et la téragone. Ces composés sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus **(Cheng *et al.*, 2008)**. De plus, le nombre et la

position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique pourraient être en relation avec leur toxicité relative sur les microorganismes **(Cowan, 1999).**

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes **(Ulanowska et *al*. 2006 ; Naidu, 2000).**

L'activité antimicrobienne a été attribuée à la fonction phénolique des flavonoïdes, cette activité est sensée augmenter avec le nombre de substituants hydroxyles, méthoxyles ou glucosyle. Les structures les plus efficaces étant les flavones et les flavanones **(Picman et *al*., 1995).** En effet, L'activité antibactérienne en présence de l'apigénine, la galangine, la pinocembrine, la poncirétine, la genkwanine, la naringine, l'épigallocatéchine, la lutéoline et la lutéoline7-O-glucoside, la quercétine, 3-O-methylquercétine, plusieurs quercétine glucosides, et le kaempférol et ces dérivés, et autres flavones, isoflavonoles, et chalcones ont été décelés **(Cushnie, 2005).** La capacité des **tanins** à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes **(Cowan, 1999)**. D'ailleurs, les proanthocyanidines se sont révélés les plus efficaces **(Daglia, 2012).**

Des études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes et antifongiques. Elles inhibent la transcription de l'ADN gyrase, on note qu'elles sont plus efficaces si le groupement OH est en position 7, comme dans le cas de novobicin (**Orhan, 2012**).

Chapitre 3 :

Description des deux espèces étudiées

3.1. *Pinus halepenisis* Mill.

3.1.1. Genre Pinus

Le genre Pinus appartenant à la famille des Pinaceae. Il est le plus important de tous les Conifères tant par le nombre de ses espèces (de plus de 90) toutes caractérisées par une phyllotaxie unique et prétendue des forêts qu'il constitue, que par son utilisation intensive dans le reboisement et l'importance économique de ses produits.

Ils vivent en plaine dans les régions nordiques, mais surtout en montagne dans les régions chaudes. Ce sont, à quelques exceptions près, des arbres de haute taille, à cime habituellement conique, dont les rameaux longs couverts de petites écailles portes des rameaux très courts à feuilles aciculaires persistantes, à la différence de celles des sapins ou des épicéas **(Brosse, 2000).**

On reconnait un Pin par le développent sur le rameaux longs ou moyens de petits bouquets de 2, 3, 5 aiguilles. Ces aiguilles ne sont pas libres, mais réunies en faisceaux dans une gaine écailleuse qui enserre leur base *brachyblaste* et c'est d'après le nombre des feuilles ainsi groupées qu'on distingue dans le genre trois sections : pins à2, à3 et à5 **(Gaussen et *al*., 1982 ; Quezel et Santa, 1963).** Les cônes (ou pommes à pin), dont la maturation demande 2 ou 3 ans, sont constitués d'écailles ligneuses à la partie terminale épaissie et de forme pyramidale, portant le nom d'écusson **(Brosse, 2000).**

3.1.1.1. Usage traditionnel du pin

Parties utilisées : feuilles, bourgeons, graines, résine, bois.

- ✓ **La résine** de pin a été considérée de tout temps, comme un remède très efficace dans les affections pulmonaires. Hippocrate l'employait contre la péripneumonie et les médecins arabes contre les ulcères du poumon **(Leclerc, 1994).** Elle exerce une action antirhumatismale et décongestionnante.
- ✓ **Les bourgeons** de pin sont riches en huile essentielle, ils sont béchiques, balsamiques et efficaces dans le traitement de la toux **(Boullard, 2001 ; Cecchini, 2003).** Les huiles essentielles riche en pinène sont utiles dans de nombreuses indications tel que : les affections des voies respiratoires, la grippe, la fatigue, les infections des voies urinaires, le rhumatisme et la goutte **(Fleurentin, 2008 ; Lacoste, 2014).**

✓ Quant **au goudron** résultant de la distillation de bois, sous sa forme galénique en sirop ou en pastilles, il est considéré comme béchique et pectoral **(Fleurentin, 2008 ; Cecchini, 2003)**, il est utilisé également en usage externe contre les dermatoses**.** Des feuilles on extrait le catéchol (protecteur capillaire).

✓ De **l'écorce** on extrait le cyanidol qui est un antihémorragique efficace en cas de trouble de la perméabilité cellulaire et d'insuffisance veineuse **(Boullard, 2001).**

Les pinènes sont des matières premières courantes en parfumerie. L'essence de térébenthine, ou l'infusion d'aiguille de pin, entrent dans la composition de produits pour bains désinfectants, stimulants, rafraichissants et désodorisants **(Hlava et *al.*, 1984).**

3.1.2. Description botanique de *P. halepensis*

Noms vernaculaires :

Arabe : Senouber, raourai

Tamazight : Azoumbei, Taïda

zgougou (la graine),Radjina, Eulk snouber ,

ouazouri (la résine),

qat'ran, zeft(goudron),

aïdha, chelouda (écorce).

Français : pin d'Alep

Figure 18 : Rameaux de *Pinus halepensis* Mill.

Le Pin d'Alep est originaire des bords de la méditerranée occidentale, de l'Espagne à la Grèce, en Algérie et en Tunisie, il est rare par contre en méditerranée orientale où il est remplacé par une espèce voisine *P. brutia* Ten.

P. halepensis est un arbre qui peut atteindre 20 m avec un tronc de 1,50m de diamètre (**Maire, 1952),** il est branchu et feuillé dès la base, puis développe un fût grêle, flexueux, souvent penché par le vent, à cime étalée, irrégulière et peu dense.

- ✓ **Ecorce** d'abord lisse et gris argenté, puis épaisse, fissurée, brun rougeâtre, riche en tanin.
- ✓ **Bourgeons** cylindro-coniques,7-8mm, non résineux.
- ✓ **Aiguilles.** Groupées par 2, parfois plus, filiformes souples, longues, vert –gris clairlongues de 5 à 10 cm, rassemblées en pinceaux à l'extrémité des rameaux **(Brosse, 2000)**, à marges finement denticulées, sommet brusquement atténué en une courte pointe rigide. Ces pseudophylles sont persistantes **(Maire, 1952).**

- ✓ **Les cônes mâles**, ressemblant à des chatons dressés, produisent une grande quantité de pollen jaune orangé dispersé par le vent, longs de 6 à 7 cm.
- ✓ **Les cônes femelles**, plus gros, mûrs à l'automne de la seconde année, ovoïdes-coniques aigus, longs de 6 à 12 cm, roux vif luisant à maturité et réfléchis vers le bas du rameau **(Nahal, 1986).**
- ✓ **Les Graines** : 5-7 mm, grises mouchetées de noir, avec une aile brun 3-4 fois plus longue (**Bonnier, 1990).**

Le pin d'Alep demande beaucoup de lumière et de chaleur. Il supporte bien la sécheresse mais il est très sensible au froid, ce qui limite son implantation en zone méditerranéenne et à faible altitude (étage semi –aride). Très peu exigeant quant au sol, il s'accommode bien des terrains calcaires ou il a peu de concurrents.

3.1.3. Place de *P. halepensis* dans la systématique.

La position systématique du taxon selon différentes approches morphologiques **(Maire, 1952)** et phylogéniques *APGIII* **(Dobignard et Chatelain, 2012**) est décrite dans le tableau ci-dessous (Tab.4)

Tableau 4 : Place de *Pinus halepensis* Mill. dans la systématique

	Maire, 1952	***APGIII* (Dobignard et Chatelain, 2012)**
Règne	Plantae	Plantae
Embranchement	Spermatophytes	Spermatophyte
Sous embranchement	Gymnospermes	Gymnosperme
Classe	Pinopsida	Gymnospermae
Ordre	Pinales	Pinales
Famille	Pinacées	Pinaceae
Genre	Pinus	Pinus
Espèce	halepensis Mill.	halepensis Mill.

3.1.4. Réparation géographique de *P.halepensis*

- **Dans le monde**

Le pin d'Alep occupe une aire morcelée sur tout le pourtour méditerranéen ; Espagne (de Gibraltar à la Catalogne), France (dans le Languedoc et la Provence calcaire), Italie péninsulaire, Grèce, Turquie (dans la région d'Adana), Algérie, Maroc dans (le Rif), le Moyen et le grand Atlas voir figure 19 **(Allemand, 1989).**

Figure 19 : Aire de distribution géographique de *Pinus halepensis* Mill. (Nahal, 1986).

- **En Algérie**

Le pin d'Alep forme des forêts sur tous les massifs montagneux du tell littoral à l'atlas saharien **(Quezel, 1986)**, très répandu dans les montagnes sèches de l'intérieur : Souk – Ahras ; Ouenza ; Aurès ; Bellezma, Monts du Hodna et dans les terrains calcaires du littoral à Bougie et jusqu' à dans la basse vallée de l'Oued Agrioun **(Maire, 1952).**

En Algérie, le pin d'Alep couvre 850.000 ha (35% de la surface du Nord boisée) **(Bentouati et *al.*, 2005).**

3.1.5. Données pharmacologiques et phytochimiques de *P. halepensis* Mill.

P. halepensis a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques et pharmacologiques ;

Kaundun et *al.* (1998) ont indiqué la présence des flavonoïdes dans les aiguilles : proanthocyanidines (delphinidine et cyanidine,) et six flavonols (myricétine, quercétine, larycitrine, kaempférol, isorhamnétine et syringétine).

Elles contiennent aussi des acides phénoliques tel que l'acide *p*-coumarique, l'acide syringique et l'acide4-hydroxybenzoique **(Pasqualini et *al*., 2003).** L'huile des graines de *Pinus halepensis* est constituée de glycolipides : esther glucoside stérile, monogalactosyl diacyl glycérols, cérébrosides, et digalactosyl diacyl glycérols. Des phospholipides : acide Phosphatidique, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylsérine, phosphatidyl glycérol et diphosphatidyl glycérol **(Kadri et *al.*, 2013),** il a été démontré que ces composés possèdent une activité cytotoxique contre trois lignées de cellules cancéreuses humaines et une activité antiangiogénique **(Kadri et *al*., 2015).**

Une autre étude sur la fraction lipidique contenue dans les graines de *Pinus halepensis* Mill. a permis de déduire sa richesse en acides insaturés (acide oléique : 27,3% et acide linoléique : 48,8%) et d'autres acides saturés comme l'acide palmitique (8,75%), myristique, rnyristoleique, palmitoleique, margarique, margaroleique, stearique, linolénique, arachidique, eicosenoique, ont été également détecté mais a des faibles teneurs. Dans la même étude, la composition moyenne de graines de *P. halepensis* a été déterminée, les résultats ont montré la composition suivante : 22,7% de protéines, 43,3% d'huile, 8,3% de cendre, 25,7 % de glucides, et une faible quantité (1%) des éléments minéraux (K, Mg, Ca) (**Cheikh et *al*., 2006).**

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des aiguilles de *Pinus halepensis*, a fait l'objet d'un grand nombre d'études **(Djerrad et *al.*, 2015 ; Fekih et *al*., 2014, Abi-ayad et *al.*, 2011, Dob et *al*., 2005 ; Macchioni et *al*., 2003 ; Hmamouchi et *al*., 2001 ; Roussi et *al*., 1995 ; Tazerouti et *al*., 1993),** décrivant leur composition chimique très variée (Tab.5)

Les travaux de **Abi-ayad et *al.* (2011)** ont montré que les huiles essentielles de *P. halepensis* ont un effet fongicide contre l'*Aspergillus flavus*, l'*Aspergillus niger*, le *Fusarium oxysporum*, le *Rhizopus stolonifer.* D'autres travaux ont démontré une activité antibactérienne **(Fekih et *al*., 2014),** et activité antioxydante **(Djerrad et *al.*, 2015)** des huiles essentielles de *P. halepensis*

Tableau 5 : Principaux composants des huiles essentielles de *P. halepensis* Mill. des différentes origines

Origines		Composés majoritaires	Références
Algérie	**Tebessa Batna**	α-pinène (17,2%), (Z)-b-Caryophyllène (20,3%) α-pinène (21,4%), (Z)-b-Caryophyllène (22,5%)	(Djerrad et *al.*, 2015)
	Tlemcen (Nedroma)	α-pinène (21,2%) Myrcène (32%)	(Fekih et *al*., 2014)
	Tlemcen (Ghazaouet)	Caryophyllène oxyde (48,2%), thymbergol (8,3%)	(Abi-ayad et *al.*, 2011)
	Alger (Sidi fradj)	(Z)-b-Caryophyllène (40,31%) α-Humulène(7,92%)	(Dob et *al*., 2005)
	Tissemsilt Djelfa	Sabinène(6,95%),Myrcène (8,65) α-Pinène(17,56%),Myrcène (3,22)	(Tazerouti et *al*., 1993)
Maroc		α-Pinène (23,3%) Myrcène (16,3%)	(Hmamouchi et *al*., 2001)
Grèce		α-Pinène (13,4%) β-Caryophyllène (19,05%)	(Roussi et *al*., 1995)
Italie		α-Pinène (18.1 %), Myrcène (27.9%)	(Macchioni et *al*., 2003)

3.1.6. Utilisation en phytothérapie de *P. halepensis*

Parties utilisées : les bourgeons, le bois, les racines, les rameaux, les feuilles, la résine, l'écorce

Principes actifs : résine, tanin, acide primarique, acide primarinique, piripicrine terpène, **(Mahmoudi, 1984).**

Nous trouvons pratiquement les mêmes vertus thérapeutiques chez les espèces de Pin**.** Les rameaux feuillés renferment une huile essentielle riche en pinène, puissant antiseptique apprécié en cas d'affections respiratoires, dépuratifs en décoction, balsamique et amère (appréciés alors en cas d'inflammation intestinale ou de leucorrhée) **(Boullard, 2001).** De son oléorésine par distillation fractionnée, on extrait une Térébenthine, elle a des propriétés comparables comme antiseptiques urinaires et pulmonaires.

En médecine traditionnelle algérienne, il est utilisé pour ces propriétés : expectorant, balsamique, léger diurétique, antiseptique puissant; astringent **(Mahmoudi, 1984).** Selon la tradition kabyle trois cuillérées à soupe de résine pilée et tamisée, incorporées à un pot de miel pur de 500 g, constituent le traitement complet de la bronchite **(Hammiche, 2015).**

3.2. *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*

3.2.1. Genre Thymus

Le nom Thymus désigne en latin « *thymum* » et en grec « *thymon* », le nom provient de l'égyptien *than*, nom d'une plante servant d'embaumer les corps ou de la racine grecque *thy*, signifiant « exhaler une odeur » **(Couplan, 2012).** Le thym appartient à la famille des Lamiaceae. Il se trouve à l'état spontané, sous l'aspect d'un sous-arbrisseau très ramifié à la base. Les nombreuses tiges (quadrangulaires) dressées, portent de minuscules feuilles opposées, aux bords enroulés verts foncés. Vers les extrémités des tiges s'épanouissent de petites fleurs roses pâles ou blanches, rassemblées en glomérules à l'aisselle des feuilles **(Guignard et Dupont, 2004 ; Meyer et *al*., 2004).** Le calice tubuleux à 2 lèvres, la supérieure à 3 dents, l'inférieure à 2. Les étamines dépassent la lèvre supérieure de la corolle (au moins 2 d'entre elles), à filets divergents. Le fruit est un tétrakène **(Martin, 2014)**.

3.2.1.1. Répartition géographique du genre Thymus

- **Dans le monde**

Le genre thymus comprend près de 928 espèces de thym sont réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya **(Morales, 2002).**

Environ 120 espèces du genre Thymus se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre (**Stahal-biskup et Saez, 2003)** (Fig.20).

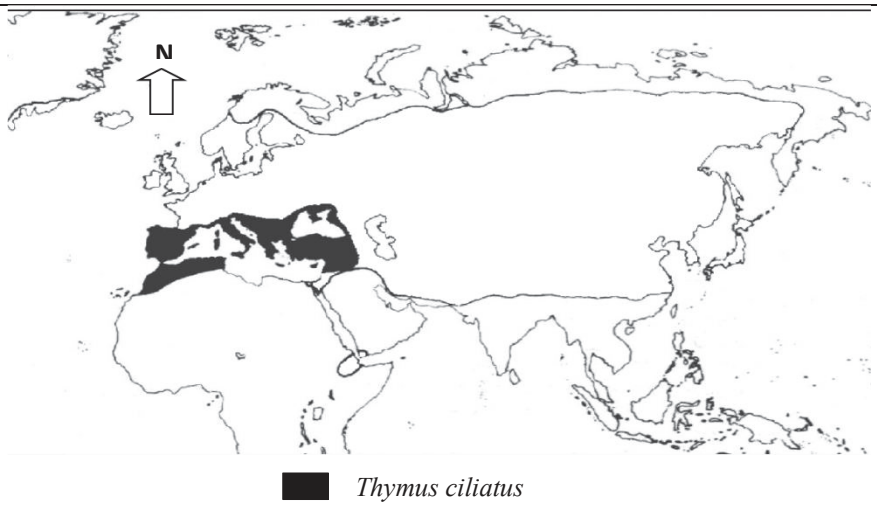


Figure20: Aire de distribution géographique des espèces du genre *Thymus* **(Morales, 2002)**

- **En Algérie**

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales en regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le thym de la famille des Lamiaceae ou Labiateae, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement.

En Algérie, il est représenté par 12 espèces, dont 9 sont endémiques. Citant ainsi quelques espèces connus en Algérie : *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. algériensis*, *T. fontanésii*, *T. ciliatus*, *T. hirtus*, *T. pallescens*, *T. dreatensis* **(Quezel et Santa, 1963).**

3.2.1.2. Utilisation traditionnel du Thym

Le thym est une des plantes les plus utilisées en phytothérapie ; depuis les temps les plus reculés, le thym est apprécié pour ses nombreuses vertus médicinales. Autrefois utilisé contre le hoquet et les morsures de serpent, on lui a découvert au fil des siècles une longue liste de propriétés. Stimulant général, physique et psychique **(Maison, 2012).** Il est considéré comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces dans le traitement de pathologies respiratoires : la toux, la coqueluche, l'angine, le rhume, la grippe, et l'asthme humide. Il est utilisé comme antalgique : contre les maux de tête, la névralgie sciatique. Il est recommandé aussi pour l'expulsion des gaz intestinaux, il est indiqué aussi comme stomachique, et antispasmodique. En, médecine populaire il est utilisé dans les cas d'hypertension et de vertige. En suage externe, c'est un désinfectant et un cicatrisant des plaies **(Saoud, 2010 ; Fleurentin, 2008 ; Beloued, 2005).**

3.2.1.3 Composition et activités biologiques

De part son grand intérêt économique et sa répartition géographique étendue, un grand nombre d'espèces du genre thymus a fait l'objet d'investigation phytochimique. En particulier, des huiles essentielles. Ces huiles essentielles sont très riches en thymol, carvacrol, *p*-cymene, 1,8 –cineol, linalol. Dont les teneurs varient selon : l'espèce, les conditions climatiques, la méthode d'extraction, la localisation géographique, d'où la notion de chémotype. On indique le nom de chémotype en fonction du constituant principal. Par exemple pour *Thymus vulgaris,* au minimum sept chémotypes ont été décrit en France (thymol, carvacrol, géraniol, linalol, para-cymène, α-terpinéol et trans-4-thuyanol accompagné de terpinéol-4**) (Kaloustrian, 2012).** L'huile essentielle de thym est listé dans plusieurs pharmacopée : européenne, Allemande, United kinglom **(Nezhadali et *al*., 2014).** Nous rapportons dans le tableau 6 les composants majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces de Thym d'Algérie.

Tableau 6 : Composants majoritaires des huiles essentielles des espèces de Thym d'Algérie

Espèces	Composés	Référence
T. pallescens de Noé	Cavacrol 63,3-68,2) Thymol (6,6-7,5)	(Benchaban et *al.*, 2015)
T. algeriensis **Boiss.et Reut.**	α-pinène (25,52-27,14) comphor (8,45-8,77)	(Giordani et *al*., 2008)
T. dreatensis	Thymol (20,2%) Linalool(30,4%)	(Hazzit et *al*., 2009)
T. fontanesii **Boiss.et Reut.**	Cavacrol 66,7-69,5%) Thymol (0,5-0,7%)	(Bekhechi et *al.*, 2007)
T. numidicus **Poiret.**	Cavacrol (49,7-77,5%) Thymol (0,17-2,7%)	(Kouch et *al*., 2014)
T. vulgaris	Cavacrol (25,57%) p-cymen (26,39%)	(Giordani et *al*., 2008)
T. munbyanus **Boiss.Reut.**	Thymol (52,0%) p-cymen (08,5%)	(Chikhoune et *al*., 2015)

De nombreuses études ont confirmé *in vitro* l'effet antibactérien, antioxydant et antifongique des extraits de thym **(Nezhadali et *al*., 2014 ; Kouch et *al*., 2014 ; Giweli et *al*., 2013 ; Cheurfa et *al*., 2013 ; Amarti et *al*., 2011 ; Giordani et *al*., 2008 ; Bounatirou et *al*., 2007 ; Bekhechi et *al*., 2007).**

Des études pharmacologiques montrent que les extraits hydroalcooliques ont des effets antispasmodiques, anti-inflammatoires **(Fleurentin, 2008),** dus surtout aux flavonoïdes.
En effet, les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une importante source de flavonoïdes. En effet, de nombreux flavonoïdes sont décrits dans de multiples espèces de ce genre **(Bruneton, 1999).** Majoritairement l'identification des extraits de thym a montré que l'acide rosmarinique et la luteoline7-O-glucoside sont les plus répandues **(Roby et *al*., 2013),** d'autres sont : acide caféique , acide quinique, acide cinnamique, acide férulique, apigénine, naringénine, eriodictyol, et quercétine **(Roby et *al*., 2013 ; Pereira et *al*., 2013 ; Kruma et *al*., 2008),** apigénine, apigénine 7-O-b-glucuropyranoside, circimaritine, lutéoline, lutéolin 7-O-b-glucopyranoside, cirsilineole **(Benayache et *al*., 2014),** apigénine , eriodictyol , naringénine, cirsilineol , 8-methoxy-cirsilineol **(Georgiou et *al*., 2015).**

3.2.2. Description botanique de *T. ciliatus*

Arabe: Zaitra , kheita, Djertile

Tamazight: Azoukenni, Tazoukrn

Thymus ciliatus (Desf) Benth. est une plante aromatique **endémique d'Algérie et du Maroc.**

Figure 21 : *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*

Elle se trouve à l'état spontané sous forme d'un arbrisseau de petite taille très ramifié, pouvant former des touffes bien étalées sur le sol, et pouvant atteindre 40 centimètres de Hauteur. Les feuilles sont opposées, sans stipules, courtement pétiolées, oblongues, glabres, mais généralement ciliées à la base. Les nervures sont à peine visibles et le bord du limbe est fortement enroulé. La tige est très ramifiée et ligneuse en sa partie inférieure. Elle est constituée de petites feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base (**Benabid A. 2000 ; Quezel et Santa, 1963).**

Elle est localisée dans le Nord de l'Algérie. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés. **Quezel et Santa, (1963)** décrivent trois sous-espèces qui appartiennent à *Thymus ciliatus*:

Ssp. eu- ciliatus (Maire): Fleurs très grandes rouges ou violacées dépassant 1cm de long.

Ssp. coloratus (Boiss et Reut) Batt**:** Feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base (Fig.21).

Ssp. Munbyanus (Boiss et Reut) Batt.**:** feuilles florales vertes

3.2.3. Place de *T. ciliatus* dans la systématique

La position systématique du taxon selon différentes approches morphologiques et phylogéniques est décrite dans le tableau ci-dessous (Tab.7).

Tableau 7 : Place de *T. ciliatus* dans la systématique

	(Quezel et Santa, 1963)	***APGIII* (Dobignard et Chatelain 2012)**
Règne	**Plantae**	**Plantae**
Sous règne	**Angiospermes**	**Tracheobionta**
Classe	**Dicotylédones**	**Eudicots**
Ordre	**Lamiales**	**Lamiales**
Famille	**Lamiacées**	**Lamiaceae**
Genre	***Thymus***	***Thymus***
Espèce	***ciliatus***	***munbyanus***
Sous espèces	***coloratus* (Boiss et Reut.)Batt.**	***coloratus* (Boiss et Reut.)** Greuter et Burdet

3.2.4. Données pharmacologiques et phytochimiques de *T. ciliatus*

La caractérisation des huiles essentielles de la partie aérienne de *T. ciliatus* a fait objet de plusieurs études **(Amrouni et *al*., 2014 ; Ghorab et *al*., 2013 ; Giordani et *al*., 2008 ; Bousmaha et *al*., 2007). L'**analyse par CG/SM de ces huiles révèle une prédominance de composés phénoliques (thymol ou carvacrol). Ces huiles ont montré une activité antibactérienne **(Amrouni et *al*., 2014 ; Ghorab et *al*., 2013 ; Bousmaha et *al*., 2007)** antifongique **(Giordani et *al*., 2008)** ; antioxydante **(Ghorab *al*., 2013 ; Amarti *al*., 2013[b]).**

Aucune étude de nature chimique n'a été trouvée sur cette espèce, mis à part sur les huiles essentielles. Cependant une investigation quantitative des extraits de cette plante et leur activité antioxydante, a révélé que la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne à une activité antioxydante remarquable **(Kholkhal et *al*., 2013)** et une autre étude rapportée par **Gaamoune et *al*. (2015)**. où Ils sont démontrés l'activité antioxydante et antifongique de l'extrait des flavonoïdes.

3.2.5. Utilisation en phytothérapie de *T. ciliatus*

Elle est utilisée par la population locale dans les préparations culinaires et en médicine traditionnelle comme plusieurs espèces de thym. On l'utilise en cas de ballonnement abdominaux et aussi contre les affections de l'appareil respiratoire : bronchites, angines. Et il agirait même comme antivirale (grippe).

Ces propriétés biologiques et pharmaceutiques du thym sont en grand partie dues à la présence de substances actives telles que les flavonoïdes et les terpénoïdes qui représentent les plus grandes classes des produits naturels synthétisés par la plante (**Chermat et Gharzouli, 2015 ; Beloued, 2005 ; Bellakhdar, 1997).**

Partie II

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Récolte des plantes

Les plantes étudiées ont été choisies essentiellement pour leurs usages thérapeutiques, qui sont largement répandus**.** Ces plantes ont été récoltées dans trois stations différentes du nord est algérien. Les paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études sont représentés dans le tableau 8 et la Figure 22.

L'identification botanique des espèces a été réalisée au niveau de notre Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement à l'Université Badji Mokhtar –Annaba.

Tableau 8 : Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études

Plantes	Stations	Parties étudiées	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
T. ciliatus* ssp.*coloratus	Ain barbar (Annaba)	Partie aérienne	7°30'49,1 E	37°00259″ N	324	Subhumide
***Pinus halepensis* Mill.**	Lac melah (Eltaref)	Feuilles	8°18'37″ E	36°54'35″ N	-	humide
	Zarouria (Souk Ahras)		7°59' E	36°14'46″ N	680	Semi- aride

N :Nord ; E :Est

La partie aérienne de *T. ciliatus* a été récoltée tôt le matin durant l'année 2013, séchée à l'aire libre et à l'ombre, dont une partie est utilisée directement pour l'extraction des huiles essentielles, et l'autre partie est soumise à un broyage afin d'obtenir une poudre. La drogue obtenue est conservée dans des flacons en verre ambré en vue des extractions.

Les feuilles (aiguilles) de *Pinus halepensis* cueillies sont celles portées par les rameaux inferieurs des différents arbres en floraison. Les aiguilles ont été séchées dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière.

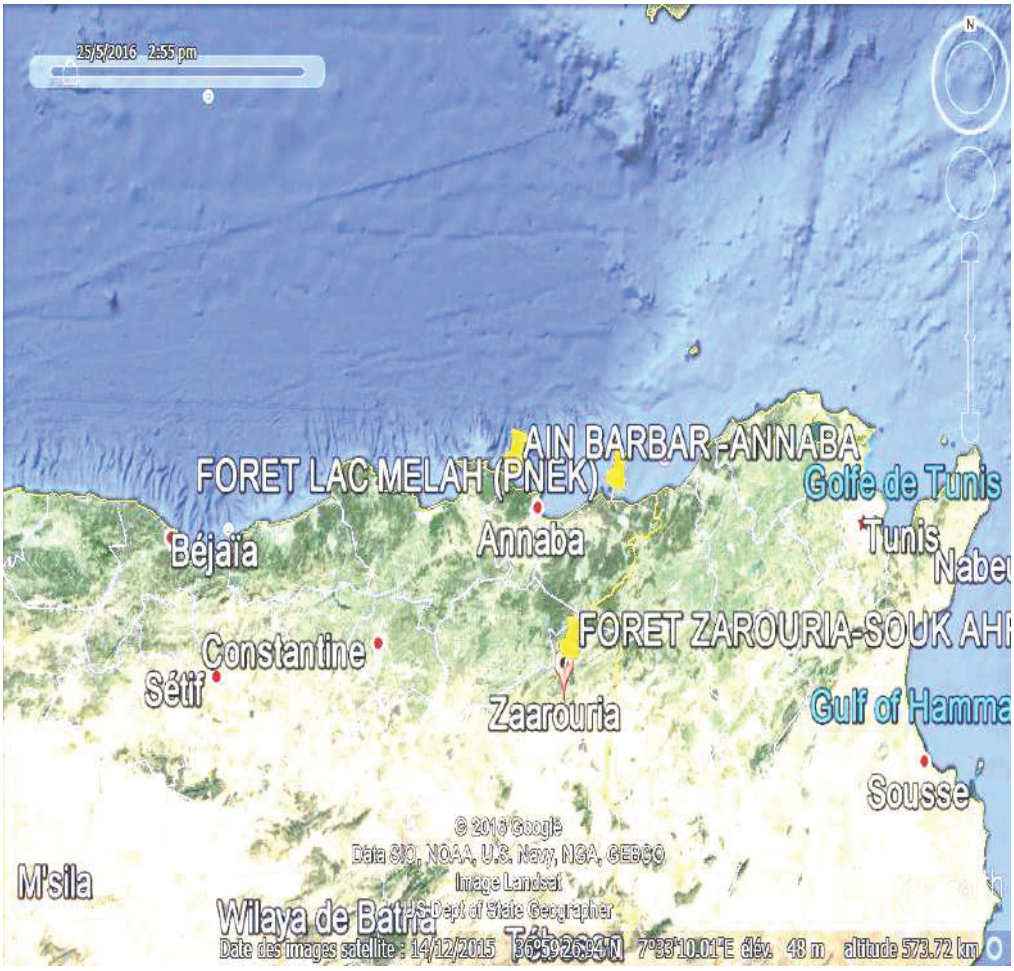


Figure 22 : Situation géographique des zones d'études (Google Earth, 2016)

2. Méthodes

2.1. Extraction des huiles essentielles

2.1.1. Hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par entrainement à la vapeur d'eau à l'aide d'un appareil de type Clevenger, qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans l'eau, qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité **(Garnero, 1996 ; Hmamouchi et *al.*, 2001).**

Un ballon dans lequel on introduit 100 g de partie de plante sèche et l'eau distillée ; Le ballon est adapté à l'appareil de condensation. De l'eau est versée par le tube de remplissage (N) jusqu'à l'effleurement en (B), ceci permet de monter un circuit fermé, pour garder un niveau constant d'eau dans le ballon. Le chauffage du ballon débute et au moment de l'ébullition, nous débutons l'entrainement à la vapeur d'eau qui dure 3heures**.** Les vapeurs vont se condenser à l'aide d'un réfrigérant à eau, formant deux phases liquides ; Une phase organique supérieure (Huile Essentielle) et une phase aqueuse inférieure, dite eau aromatique. A l'aide du robinet, l'Huile Essentielle est amenée au niveau du tube gradué juste au niveau J, pour la mesure du volume de l'Huile Essentielle distillée (Fig.23) (**Pharmacopée Belge, 1982**). L'extrait obtenu est passé à travers du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau. L'huile essentielle est stockée à 4°C dans des flacons en verre ambré, pour une analyse chimique ultérieure **(Loizzo et *al.*, 2007).** Le rendement en huile essentielle est exprimé par le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée **(Benyoucef et *al.*, 2005)**

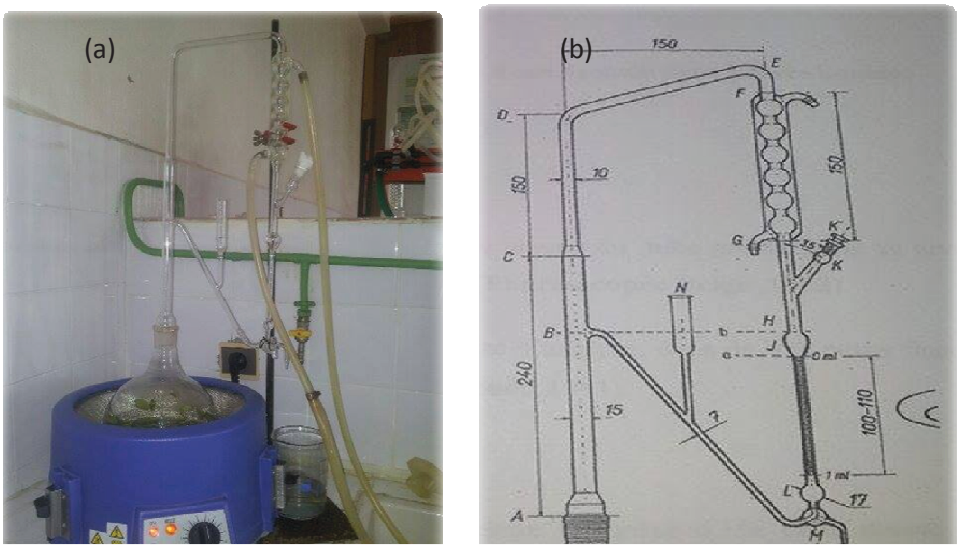


Figure 23 : *(a)Appareil d'hydrodistillation. (b) : Appareil pour la détermination des Huiles Essentielles type Clevenger* ***(Bruneton, 1999).***

2.1.2. Détermination de la composition chimique

La composition chimique des huile essentielles de *Thymus ciliatus* a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Chromatographe : HP (Agilent technologies) 6800 plus Spectromètre de masse : HP (Agilent technologies) MSD 5973. Les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique(EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode SCAN. La colonne utilisée est de Type : hp-5MS de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Les injections ont été faites en mode splitless. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 1ml/min. La température de la colonne est de 60 à 220°C à raison de 3°C /min en mode splitless. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert sont de 250 et 220°C. La température du four a été programmée comme suit : la température initiale de la colonne est de 60°C maintenue en isotherme pendant 10min puis augmentée à raison de 2°C/min pour atteindre 250°C. Le volume injecté de l'huile essentielle diluée à 10% dans l'hexane est de 0,1 µL. Les composés de cette huile correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés, d'une part, par comparaison de leurs temps de rétention (Tr) avec ceux d'une série témoins d'alcanes linéaires (C_9-C_{28}), et d'autre part, par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une banque de données WILEY.

Cette analyse a été effectuée au laboratoire d'analyses physico-chimiques du Centre de Recherche CRAPC à Alger, pour les HEs de *T. ciliatus*

La composition chimique des huiles essentielles *Pinus halepensis* a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Shimadzu QP2010. La colonne utilisée est une OV 17 de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. et dans la même conditions décrites ci-dessus ; Les composés de l'huile essentielle correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés, d'une part, par comparaison de leurs temps de rétention (Tr) avec ceux d'une série témoins d'alcanes linéaires (C_9-C_{28}), et d'autre part, par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une banque de données Nist27**(Adams, 2001 ; Xianfie et *al.*, 2007).**

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de biocatalyse, Université Badji Mokhtar Annaba, pour les HEs de *P. halepensis* Mill.

2.1.3. Indices physicochimiques des huiles essentielles : (AFNOR, 2000).

2.1.3.1. Caractéristiques organoleptiques :

Afin de caractériser les HE de *T. ciliatus*, il est indispensable d'étudier leurs caractères organoleptiques, principalement leur aspect, leur couleur et leur odeur. Il s'agit d'utiliser les différents organes des sens humains, notamment les yeux pour l'aspect et la couleur, ainsi que le nez pour l'odeur. L'appréciation de l'odeur se fait d'heure en heure, puis à intervalles de temps de plus en plus longs. Quant à la couleur, le test s'effectue 3 fois et avec un intervalle de temps d'au moins une heure afin d'assurer la fiabilité des résultats. L'aspect est déterminé macroscopiquement.

2.1.3.2. Indices chimiques

- ✓ **Indice d'acide :**

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle. Dans un ballon ou une fiole introduire la prise d'essai (2g ± 0.05), puis ajouter 5 ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes de solution de phénolphtaléine (0,2%). L'échantillon est ensuite titré avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0,1N), jusqu'à obtention d'une couleur rose. On peut réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester. L'indice est donc donné par la formule suivante: 5,61 V/ m

Où : V : est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

- ✓ **Indice d'ester :**

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters présents dans 1g d'huile essentielle. Elle consiste en hydrolyse des esters par chauffage, en présence d'une solution éthanolique, titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorohydrique.

Dans le ballon, contenant la solution qui provient de l'indice d'acide, ajouter 25 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,5 N. Le ballon est adapté au réfrigérant, puis porté à ébullition pendant une heure. Après refroidissement de la solution, 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine à 0,2% sont ajoutées.

Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5N), jusqu'à la disparition de la couleur rose. Parallèlement, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions. L'indice est calculé par la formule suivante : 28,05/ m (V_0 -V_1) Où :

V_0 : est le volume, en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc

V_1 : est le volume, en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination de l'indice d'ester

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

2.1.3.3. Indices physiques

- ✓ **Miscibilité à l'éthanol :**

Une huile essentielle est dite miscible à *V* volumes ou plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20°C, lorsque le mélange de un volume de l'huile essentielle considérée avec *V* volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition progressive d'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes.

- ✓ **Densité relative à 20 °C :**

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport entre la masse d'un certain volume d'huile et la masse d'un égal volume d'eau distillée.

La densité est ainsi donnée par la formule : $m_2 – m_0 / m_1 – m_0$

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide.

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau distillée.

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

- ✓ **Indice de réfraction :**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

- Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indice de réfraction située entre 1,300 et 1,700, l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1,333 pour l'eau distillée.

2.2. Détermination de la teneur en eau *de T. ciliatus*

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. On procède à la dessiccation du matériel végétal (*T. ciliatus*) à la température de 103°C ± 2°C dans une étuve jusqu'à poids constant La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation **(Audigié et *al.*, 1978)**. La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1-M2}{PE} X\ 100$$

H% : Teneur en eau.

M1 : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

PE : La prise d'essai.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages d'eau de 3 essais dans les mêmes conditions. La matière sèche (MS) est obtenue comme suit :

$$(MS)\ \% = 100- H\%$$

2.3. Détermination de la teneur en cendres totales *de T. ciliatus*

Elle Consiste au passage au four du matériel végétal (*T. ciliatus*) à une température de 550°C, jusqu'à destruction totale de toute particule charbonneuse **(Multon, 1991).** La teneur en matière organique est calculée par la formule suivante :

$$MO\% = \frac{M1-M2}{PE} X100$$

MO% : Matière organique.

M1 : Poids de la capsule et de l'échantillon avant calcination.

M2 : Poids de la capsule et de l'échantillon après calcination.

PE : Prise d'essai.

La teneur en cendre est calculée comme suit :

$$\text{Cendres \%} = 100 - \text{MO \%}.$$

Nous avons réalisé 3 essais de la même manière afin de déterminer un pourcentage moyen**.**

2.4. Screening phytochimique *de T. ciliatus*:

Les essais chimiques de caractérisation ont porté sur la recherche des principaux groupes chimiques dans des différentes solutions préparées à base de la poudre de *T. ciliatus*. Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique, ces caractérisations ont été faites en utilisant principalement les réactions en tube, les résultats sont classés en :

- Réaction positive +
- Réaction négative -

2.4.1. Recherche des Saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de matériel végétal sec broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendent 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes à essais (1,3cm de diamètre interne) dans les quels on dépose un volume croissant de 1, 2,…, 10 ml. Le volume final de chaque tube à essai étant ajusté à 10 ml avec l'eau distillée, chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1cm dans le xe tube, alors l'indice de la mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (cm) dans le } 10^{ème} \text{ tube x } 5}{0{,}0\ X}$$

La présence de saponosides dans la plante est confirmée avec un indice (I) est supérieur à 100 **(Dohou et *al.*, 2003).**

2.4.2. Recherche des anthocyanes

La présence des anthocyanes est mise en évidence en ajoutant à 2ml d'infusé aqueux, quelques gouttes d'HCl pur. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes **(Solfo, 1973).**

2.4.3. Recherche des leuco-anthocyanes

Prendre 5ml d'infusé aqueux, mélanger avec 4ml d'alcool chlorhydrique (éthanol /HCl pur ; 3v/v). Après un chauffage au bain marie à 50°C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco-anthocyanes **(Solfo, 1973).**

2.4.4. Recherche des tanins

Un volume de 1ml d'une solution de Chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 1% est additionné à 5ml d'extrait aqueux.

- ✓ La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables).
- ✓ La couleur vire au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condenses) **(Diallo et *al.*, 2004).**

prendre 30ml de la solution et ajouter 15ml de réactif de Stiasny : Formol à 30% + HCl concentré (3:1v/v). Après chauffage de 30mn au bain-marie, l'observation d'un précipité orange indique la présence des tanins catéchiques **(Solfo, 1973).**

2.4.5. Recherche des alcaloïdes

Une masse de 2g de poudre est macérée avec 40 ml de HCl 1%, pendant 24h. Après filtration, 1ml de filtrat est reparti dans deux tubes. Puis additionner dans le premier tube quelques gouttes de réactif de Mayer et dans le second du réactif de Dragendorff.

La présence des alcaloïdes est mise en évidence par la formation d'un précipité :

- Blanc jaunâtre avec le réactif de Mayer.
- Orange avec le réactif de Dragendorff (**Tiwari et *al.*, 2011).**

2.4.6. Recherche des flavonoïdes

Cinq grammes de poudre sont macérés dans 75ml d'HCl à 1% pendant 24 heures, après avoir filtré le mélange, 10ml du filtrat sont placés dans un tube, puis rendu basique par l'ajout du NH_4OH. L'apparition d'une couleur jaune claire après 3heures dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

2.4.7. Recherche des cardinolides

La recherche des cardinolides débute par une macération de 02g de drogue pulvérisée dans 40 ml d'eau distillée. Après filtration, prélever 5ml du filtrat et ajouter un mélange de 5 ml de $CHCl_3$ et de C_2H_5OH, évaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 1,5 ml de CH_3COOH et finalement ajouter quelques gouttes de $FeCl_3$ suivi de 0,5 ml de H_2SO_4 concentré sur les parois du tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des cardinolides.

2.4.8. Recherche des terpènes et stéroïdes

Cinq grammes de poudre sont macérés dans 20ml d'éther de pétrole, après avoir filtré et évaporé la phase organique dans un bain de sable à 90°C, le résidu est dissout dans 5ml d'acide acétique en ajoutant 1ml d'H_2SO_4 concentré dans la zone de contact. Entre les deux liquides, il se forme un cercle marron ou violet, ensuite il vire vers le gris. Ce changement du cercle indique la présence des terpènes et stéroïdes.

2.4.9 Recherche des anthraquinones

Prendre 1g de poudre est l'ajouter à 10ml de KOH (0,5N) et 1ml de H_2O_2 (5%). On laisse le mélange bouillir quelques minutes. Après refroidissement et filtration, on acidifie le filtrat avec l'acide acétique puis, on extrait la solution acide avec 10 ml de benzène, additionner 5 ml de NH_4OH. L'apparition d'une couleur rouge dans la phase acide indique la présence des anthraquinones **(Bruneton, 1999).**

2.4.10. Recherche des composés réducteurs

La réaction de détection des composés réducteurs consiste à traiter 2 ml d'extrait obtenu par macération (1 g de drogue pulvérisée dans 30 ml d'eau distillée) avec 2ml de liqueur de Fehling (1ml Fehling A + 1ml Fehling B), puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique **(Diallo et *al.*, 2004).**

2.4.11. Recherche des coumarines

Cinq grammes de poudre sont macérés dans20 ml d'ether diéthylique , après avoir filtré et évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans 2 ml d'eau chaude, un volume de cette phase aqueuse est additionné avec 0,5 ml d'une solution d'ammoniaque NH_4OH à 10% et un autre volume est gardé comme un témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous lampe UV indique la présence de coumarines (**Bruneton, 1999**).

2.5. Préparation des extraits (*Thymus ciliatus*)

2.5.1. Extraction par macération

2.5.1.1. Préparations des extraits bruts

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. L'extraction a été réalisée par la méthode classique décrite par **Atanasova et *al.* (2009)**. Une prise d'essai de 0,25 g de la poudre de *Thymus ciliatus* a été mise à macérer dans 25ml d'un mélange méthanol/eau à 80/20 (v/v), pendant 24heures sous agitation. L'extrait filtré est évaporé à sec sous pression réduite à une température 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis conservé à 4°C .

2.5.1.2. Préparations des extraits avec des solvants à polarité croissante

L'extraction a été effectuée par épuisement successif de la poudre de *Thymus ciliatus* par macération au solvant à polarité croissante Hexane (Hex), Dichlorométhane (DCM), Méthanol (MeOH), eau (Aq AS), selon la méthode décrite par **(Diallo et *al.*, 2004).** 50g de poudre ont été macérés dans un erlenmeyer avec 500 ml d'Hexane. Le mélange est placé sous agitation magnétique pendant 3X 24h à une température ambiante (avec renouvellement 500 ml de solvant chaque 24h). Après filtration, le marc à été séché, puis ensuite extrait avec 3X 500 ml de Dichlorométhane pendant 3X 24h. Le marc de l'extraction précédente a été séché et repris avec 3X 500ml de Méthanol et placé sous agitation magnétique pendant 3X 24h. Apres passage de chaque solvant (Fig.24). Chaque extrait est concentré à l'aide d'un évaporateur rotative de marque Buchi à la température 35°C, l'extrait aqueux est lyophilisé.

2.5.1.3. Préparations des extraits aqueux :

Nous avons réalisé une macération de 5 g de poudre de *T. ciliatus* dans 50ml d'eau distillée sous agitation durant 24heures. Après filtration, le filtrat a été lyophilisé

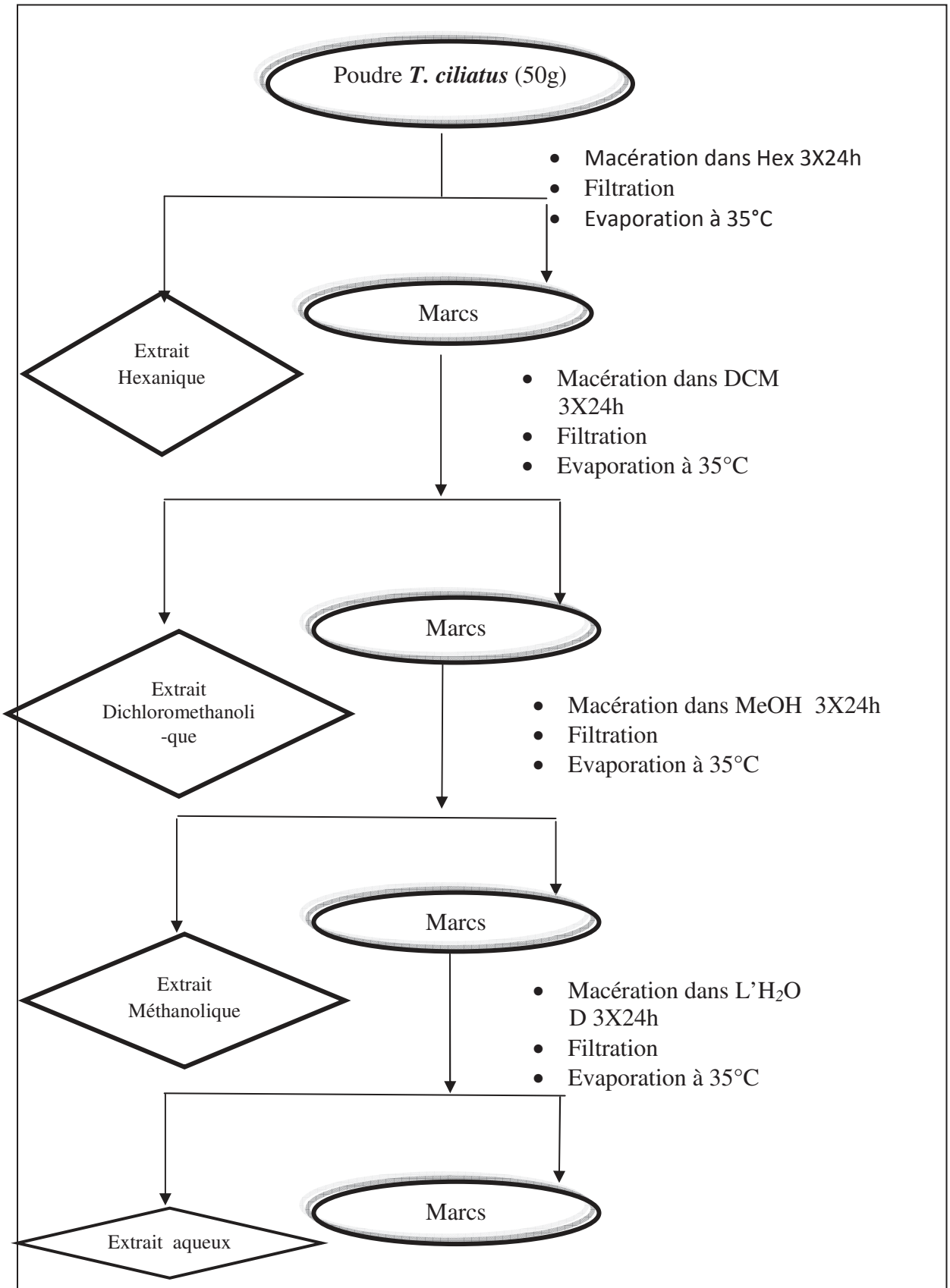


Figure 24 : Schéma du Protocole d'extraction de *T. ciliatus*

2.5.2. Extraction au Soxhlet

2.5.2.1. Préparations des extraits avec des solvants à polarité croissante

L'extracteur Soxhlet permet le traitement de solides (matériel végétal) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) est surmonté d'un réfrigérant. Les vapeurs de solvant se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le matériel végétal dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé **(Houghton et Raman, 1998).**

L'extraction par épuisement de la partie aérienne de *T. ciliatus* (17g) récoltée en période de floraison par l'extracteur Soxhlet pendant 3X 6 heures avec 250ml de solvant à polarité croissante : Hex, DCM, MeOH, AqAS. Après le passage de chaque solvant, les extraits obtenus ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif à température 45°C.

2.5.3. Détermination du rendement :

On a déterminé le rendement (R) de la plante (*T. ciliatus*) en extraits secs par la formule suivante :

$$R\% = \frac{P1 - P2}{PE} \times 100$$

R% : Rendement.

P1 : Poids de ballon + échantillon après évaporation.

P2 : Poids de ballon vide.

PE : Prise d'essai.

2.6. Analyse quantitative des extraits

2.6.1. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Le dosage de polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu à été décrit dés1965 **par Singleton et Rossi .**

Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 720 et 750nm est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans les extraits végétaux

Un volume de 1ml d'extrait convenablement dilué est introduit dans une fiole jaugée de 25ml contenant 9ml d'eau distillée, un ml du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté au mélange. Après 5mn, 10ml d'une solution de carbonate de sodium à 7,5% ont été additionnés au mélange. Après, le volume est ajusté jusqu' à 25ml. Les fioles sont agitées et conservées à l'obscurité durant 90 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à750nm par un spectrophotomètre Jenway 6504 (**Kim et *al*., 2003).**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme (mg) d'équivalent d'acide gallique(EAG) par 100 gramme de la matière végétale sèche.

2.6.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique décrite par **Zhishen et *al.* (1999)** avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm.

500 µl de l'extrait convenablement dilué sont mélangés avec 1500 µl d'eau distillée, suivie de 150 µl de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 5%. Après 5min, 150 µL de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 10% sont rajoutés au mélange. Après 6min, d'incubation à la température ambiante, 1000 µL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1M sont additionnés. Le volume est ajusté à 5ml avec l'eau distillée. La mesure de l'absorbance à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant de la quercétine comme contrôle positif. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en milligramme d'equivalent de la quercétine (EQ) par 100g de la matière végétale sèche.

2.7. Activités biologiques

2.7.1. Activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. ciliatus* a été effectué sur un total de 12 souches (Tab.9). Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie appliqué de la faculté des sciences, Université d'Annaba. Cependant, les souches bactériennes cliniques isolées ont été choisies pour leur résistance aux antibiotiques, elles ont été fourni**es** par le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Ibn Rochd d'Annaba. La liste des souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. ciliatus* est consignée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Liste des souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. ciliatus*

Bactéries à Gram(-)	*Klebsiella oxytoca*
	Citrobacter freundii
	Proteus mirabilis
	Escherichia coli ATTC25922
	Pseudomonas aeruginosa ATTC27853
	Klebsiella pneumoniae ATTC700603
Bactéries à Gram(+)	*Staphylococcus aureus (1)*
	Staphylococcus aureus (2)
	Staphylococcus aureus(3)
	Staphylococcus aureus(4)
	Staphylococcus aureus(5)
	Staphylococcus aureus ATTC25923

Des extraits de *T. ciliatus* obtenus par macération. Les solutions des extraits sont préparées dans le Dimethyl sulfoxide (DMSO). Les dilutions sont préparées de façon à obtenir une concentration de50 mg/ml. L'activité antibactérienne des extraits a été effectuée sur un total de 5 souches : *Staphylococcus aureus ATTC25923, Klebsiella pneumoniae ATTC700603, Pseudomonas aeruginosa ATTC27853, Escherichia coli ATTC25922 et Klebsiella oxytoca*

Le test de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill. a été effectué sur un total de 3 souches. Ce test a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Médicale de la faculté de Médecine de Annaba (Tab.10).

Tableau10 : Liste des souches utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill.

Bactéries à Gram(-)	*Escherichia coli*
	Pseudomonas aeruginosa
Bactéries à Gram(+)	*Staphylococcus aureus*

Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé et la méthode de macro-dillution en milieu liquide

2.7.1.1. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme)

Le test de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatogramme selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique **(NCCLS, 2001).** L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle **(Vincent, 1991).**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum.

un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de l'HE de la partie aérienne de *Thymus ciliatus*. et *Pinus halepensis* puis déposé au milieu d'une boite de Pétri de 90 mm de diamètre contenant un milieu gélosé « Mueller Hinton » de 4 mm d'épaisseur, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum. Ce dernier est préparé à une concentration de 0,5
Marc Ferland, de 10^6 à 10^8 CFU/ml (Colony Forming Units /ml) pour chaque souche. Trois répétitions sont réalisées pour chaque essai.

Les boites de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37°C, la lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque disque; la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits.
En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO et des témoins positif: antibiotiques ((piperacilline (100µg/disque), oxacilline (1µg/disque), ofloxacine (5 µg/disque), ceftazidine (30 µg/disque), gentamicine (30 µg/disque)) ; Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37ºC. L'expérimentation a été réalisée en triplicata.

2.7.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Ce test en milieu liquide a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI par macro-dilution, le principe est le même que celui de la micro-dilution, sauf qu'il est effectué dans des tubes contenant l'huile essentielle à différentes concentrations, incorporée dans un milieu de culture liquide. La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle aucune poussée bactérienne n'est observée. La méthode décrite par **Randrianarivelo et *al.* (2008).** avec légère modification a été employée.

Une solution mère d'HE (10 mg/ml) préparée dans 10% de DMSO et bouillon Muller-Hinton, à partir de laquelle on réalise une préparation d'une série de dilution en tubes avec le milieu de culture liquide (Muller-Hinton), selon une progression géométrique de base 2. Un tube contrôle servira de témoin. Puis, on ajoute la même quantité d'inoculum (préparé à partir d'une culture jeune a une concentration 5 10^6 CFU/ml).

Après une incubation des tubes à une température de 37°C pendant 24heures, nous avons procédé à la lecture par une observation macroscopique des tubes, la CMI sera la concentration en HE la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible.

2.7.1.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La CMB est la concentration minimale de l'extrait de plante qui produit une élimination de 99,9% de la population bactérienne (soit moins de 1% de survivant), après 18 à 24 heures d'incubation à 37ºC **(Chebaibi et *al*., 2011).**

Nous avons ensemencé en stries sur gélose Muller Hinton. Des prélèvements effectués, on commence à partir du tube qui a déterminé la CMI (tube dépourvu de culot bactérien). Les boites ensemencées sont incubées à 37ºC.

2.7.2. Activité antioxydante

2.7.2.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$

L'activité antiradicalaire à été évaluée en utilisant le radical DPPH$^{\bullet}$, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante **(Brand-williams, 1995).** Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH. Cette couleur disparait en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe pécryl ; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Fig.25).

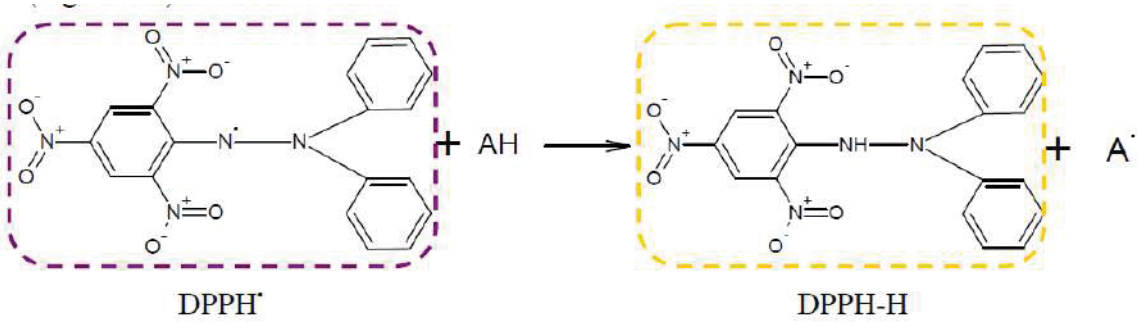


Figure 25: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH$^{\bullet}$ et un antioxydant

Le pouvoir antiradicalaire a été testé en employant la méthode décrite par **Sharififer et *al.* (2009) et Tepe et *al.* (2005[b]).** La solution à 0,004% de DPPH a été préparée dans le méthanol. Un volume de 50µl d'huiles essentielles ou extraits à différentes concentrations a été ajouté à 5ml d'une solution de DPPH (La solution 0,004% de DPPH a été préparée dans le méthanol). Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 517nm **(Politeo et *al.*, 2007)** contre un blanc (solution DPPH/méthanol). L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence. La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH dans le % Activité antioxydante = [Abs contrôle-Abs échantillon / Abs contrôle] x 100 **(Pal Singh et *al.*, 2009).**

La cinétique des réactions de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* et l'acide ascorbique avec le DPPH a été inscrite à chaque concentration examinée. Le paramètre IC50 (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) appelée également EC50 (*Efficient concentration 50*) est défini comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH$^{\bullet}$. Les IC50 sont calculées graphiquement à partir de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés **(Villano et *al.*, 2007).**

2.7.2.2. Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante. Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode d'**Oyaizu (1986),** basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) (Fig.26). Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur de l'échantillon testé

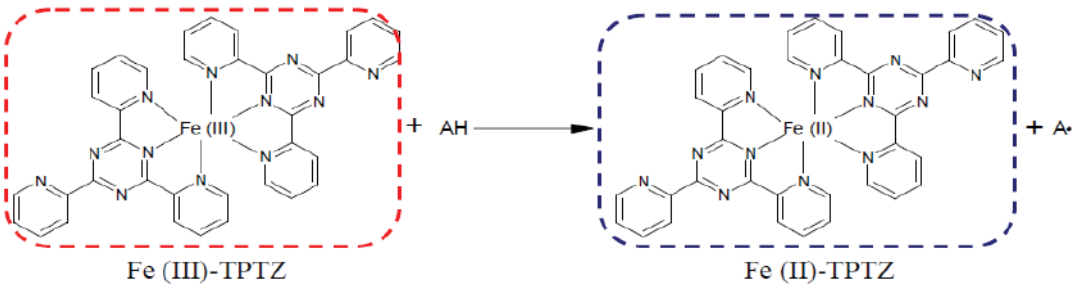


Figure 26: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).

La méthode FRAP est réalisée selon le protocole de **Yen et Chen, (1995)**.les extraits dilués dans du méthanol (0,5ml) ont été mélangées avec 1,25ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 1,25ml de ferricyanure de potassium ($(K_3Fe (CN)6)$ à 1%). L'ensemble a été incubé à 50° C pendant 20 min. Ensuite, 1,25ml d'acide trichloroacétique (TCA) (10%) a été additionné au mélange, le tout centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. 1,25ml d'eau distillée et 250µl de la solution chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 0,1%) ont été ajoutés à 1,25ml du surnageant. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le méthanol. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif et dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en triplicata et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais.

La concentration EC_{50} qui est définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

L'EC_{50} est la concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0,5, obtenue à partir de la courbe.

2.8. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une méthode physico-chimique, de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser entre deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile**.** La couche mince (phase stationnaire) est constituée d'une fine couche d'adsorbant recouvrant une plaque de verre, de métal ou sur une feuille appropriée tandis que la phase mobile est un solvant ou bien un mélange de solvant. La séparation des constituants du mélange s'effectue grâce à l'ascension par capillarité de la phase mobile le long de la phase stationnaire **(Mendham, 2005).** C'est une technique simple et rapide très apprécié en phytochimie, car elle permet d'avoir des empreintes chromatographiques du contenu de l'extrait**.**

- ✓ **Préparation de la phase stationnaire**

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur plaque de gel de Silice 60 F_{254} support aluminium ou en verre

- ✓ **Préparation de la phase mobile**

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations. Après une série d'essais réalisée dans le but d'une recherche d'un éluant favorable pour la séparation des différents composants des EMeOH de *T. ciliatus*, nous avons opté pour Eluant : Butanol, Acide acétique, eau (60 :15 :25) qui nous semble comme étant le meilleur éluant.

- ✓ **Dépôt des extraits:**

Notre choix s'est basé sur les EMeOH à différentes périodes de récolte (avant, pendant et après floraison) qui ont montré lors de cette étude une bonne activité antioxydante.

Deux microlitres de chaque extrait sont déposés à des points repèrent à 1 cm du bord inferieur de la plaque. Après une dilution avec du MeOH..

- ✓ **Développement des plaques**

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entrainé par capillarité de la phase mobile tout au long de la phase stationnaire.

- ✓ **Révélation**

La révélation a été faite sous la lampe UV, qui permet de mettre en évidence sous forme des tâches de substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm et une révélation par des réactifs spécifiques qui donnent un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler. Les réactifs employés : $AlCl_3$ pour les flavonoïdes et DPPH pour le dépistage du pouvoir antioxydant **(Kabran et *al*., 2011).**

- ✓ **Identification**

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile).

Les rapports frontaux sont calculés comme suit :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

2.9. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (pression), abrégée HPLC (CLHP en français) est une technique de séparation basée sur les mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soient un ou plusieurs solvant et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué et par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant. Les différents constituants sont séparés selon plusieurs paramètres tels que leur affinité dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Elle se différencie également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système **(Braithwaite et Smith, 1999).**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe de marque waters 2410, équipé d'éléments suivants :

- une colonne : novapark C18 (3.9X150mm) à 4µm ;
- un système de pompage, Pompe: waters 600;
- un injecteur : waters 996, pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression ;
- un détecteur: waters475;
- un logiciel Millenium32.

Les analyses ont été effectuées sur les extraits méthanoliques suivant les conditions décrites par **Mahfoudhi et *al.* (2014)** Les conditions opératoires sont les suivantes:

- ✓ Débit: 0,9 ml/min ;
- ✓ Pression de travail : 100-150 bars ;
- ✓ Volume d'injection: 20 µl ;
- ✓ Longueur d'onde: 190-600 nm ;
- ✓ Concentration de l'échantillon: 2 mg/ml;
- ✓ Phase mobile est composée d'un mélange de (A) : 0,1 M HCOOH dans l'eau et (B) :ACN (Acétonitrile) ;
- ✓ les extraits sont élués en utilisant suivant un gradient d'élution linéaire (voir tableau11).

Tableau 11 : Programme de l'élution

Temps (min)	**%A**	**%B**
0-15	5	15
15-25	15	20
25-60	20	35
60-65	35	50
65-70	50	80

Différentes substances sont identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des standards avec ceux des échantillons.

2.10. Criblage biologiques des extraits de *T. ciliatus*

Nous avons réalisé un criblage des extraits étudiés selon une méthodologie que nous avons adoptée en deux étapes consistait en :

- une analyse quantitative réalisée sur des extraits obtenus à différentes périodes de récolte, dans le but de sélectionner le meilleur solvant d'extraction et l'extrait le plus riche en PPT et Fl.
- évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des différents extraits.

Les résultats de ce tri-biologique ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux (période de floraison) se sont montré plus actifs (Fig.27)

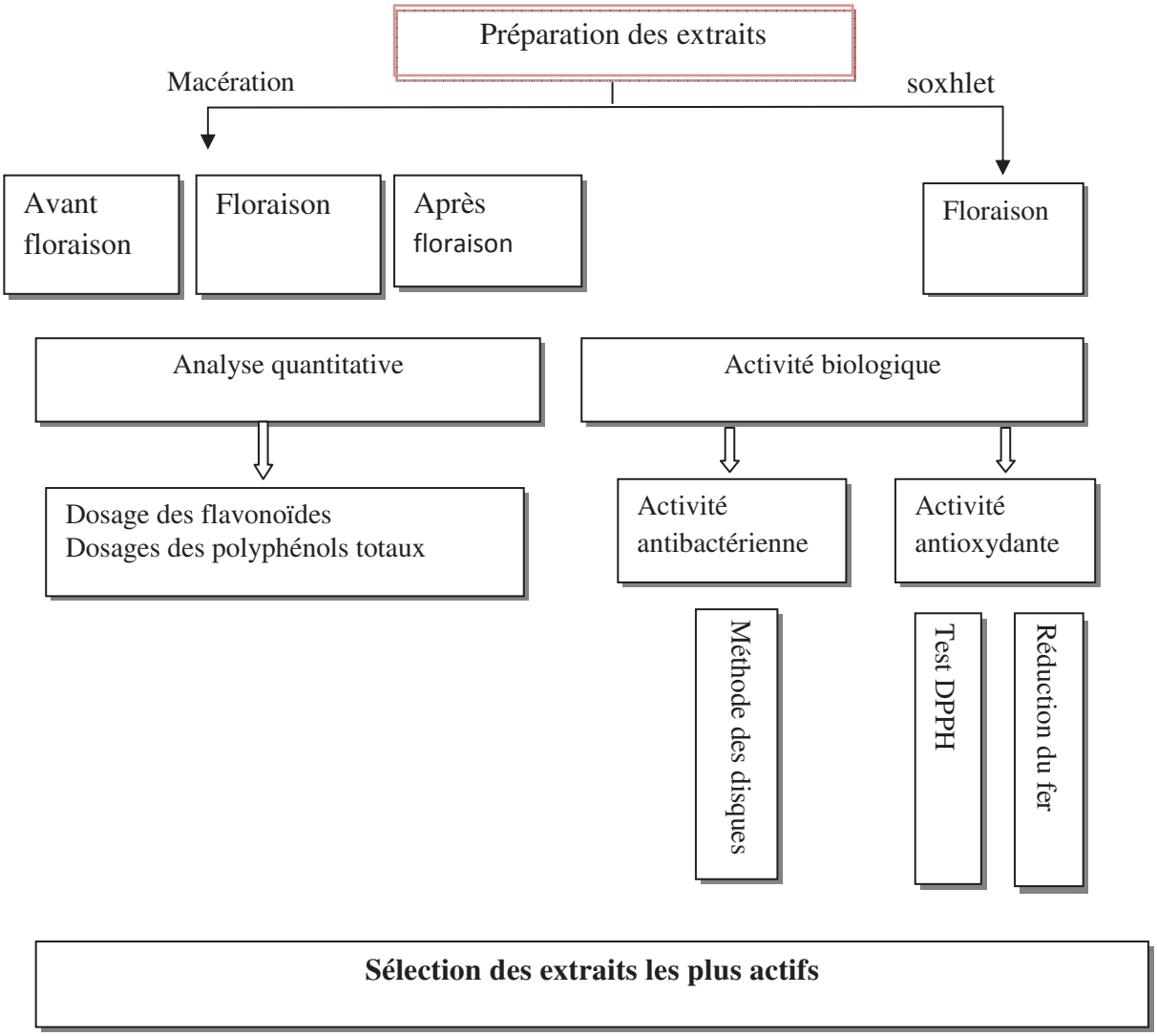


Figure 27 : Schéma du criblage biologique des extraits de *T. ciliatus*

2.11. Purification des extraits méthanoliques

Dans l'optique de séparer les extraits méthanoliques de *T. ciliatus* (période de floraison) ; nous avons effectué une purification par flash chromatographie. C'est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange à pression moyenne. Les composés se séparent en fonction de leurs affinités respectives pour la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire peut être une phase normale ou une phase inverse, est conditionné dans des cartouches. La phase mobile ou l'éluant est classiquement constituée par un mélange de solvants dont la composition peut varier au cours du temps.

2.11.1. Extrait méthanolique obtenu par macération

La purification de l'extrait mèthanolique a été réalisée par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures.

Dans cette première étape, la purification de l'extrait (EMeOHF) a été réalisée par flash chromatographie (un appareil Biotage : BiotageR Isolera TM Spectra One and Four) sur colonne de silice. 106 fractions de 22 ml chacune sont recueillies.

Les conditions opératoires sont présentées ci- dessous

- Colonne de Silice : SNAP
- Eluents : n-Hexane, Ethyl Acétate, Méthanol
- Debit : 24m/min
- Volume de fractions : 22ml
- Nombre de fraction : 106
- Détecteur : type ELSD (Evaporative Light Scattering)
- Gradient : Annexe1 (B)

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leurs profils chromatographiques

Le contrôle des sous- fractions a été effectué par CCM sur plaque de gel de Silice 60 F_{254}

- Eluant : Butanol/Acide acétique/ eau (60 :15 :25) (v/v/v)
- Révélation avec la vanilline sulfurique, NEU

Les différentes fractions recueillies par volumes de 22 ml sont regroupées selon leur profil chromatographique en quatre fractions :

- Les fractions (5-26) : fraction 1(389mg)
- Les fractions (27-82) : fraction 2(372,8mg)
- Les fractions (82-90) : fraction 3 (205,2 mg)
- Les fractions (91-105) : fraction4 (25mg)

- **Séparation par Chromatographie sur Couche Mince préparative**

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, la quantité d'échantillon appliquée sur la plaque chromatographique est plus grande (20mg à 40mg), les zones de silice correspondant aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique.

ainsi que l'épaisseur de la couche du gel de silice sur la plaque. Dans cette technique, les plaques que nous avons utilisées sont généralement des plaques en verre (Merck).

La fraction 3 est soumise à une purification par Chromatographie sur Couche Mince preparative, on obtient le composé **A,** le protocole d'isolement est résumé dans la figure28.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- ✓ Support chromatographie : plaque en verre gel de Silice 60 F_{254} 20X20 cm (Merck), épaisseur de la couche 2mm
- ✓ Phase mobile: Butanol/Acide acétique/ eau (60:15:25) v/v/v
- ✓ Révélateur: réactif NEU
- ✓ Solvant de récupération: Méthanol 100%

Apres séchage de la planque, on récupère les composés d'intérêt sur la silice à l'aide d'un scalpel, ensuite dispersée dans une petite quantité de solvant, et filtrée sous vide.

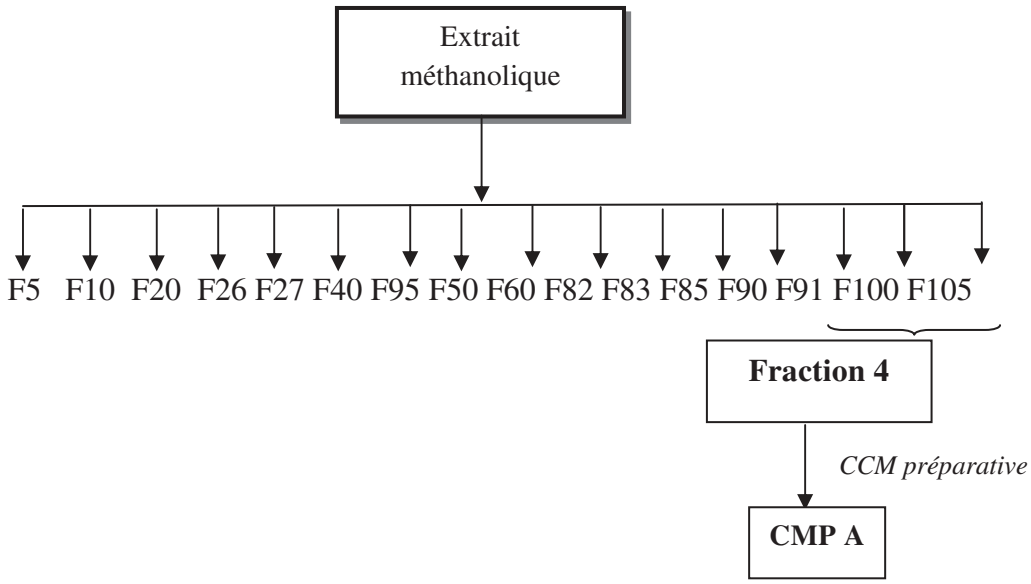


Figure 28 : Schéma d'isolement du composé CMPA

2.11.2. Extrait méthanolique obtenu par soxhlet.

2.11.2.1. Fractionnement de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique obtenu par extraction au soxhlet de *T. ciliatus* récolté pendant floraison (EMeOHS-F) a été soumis à des partitions liquide-liquide successives en présence de cyclohexane, de chloroforme et d'acétate d'éthyle. Après évaporation de solvant sous pression réduite, 1,33 g d'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) sont obtenus (Fig.29)

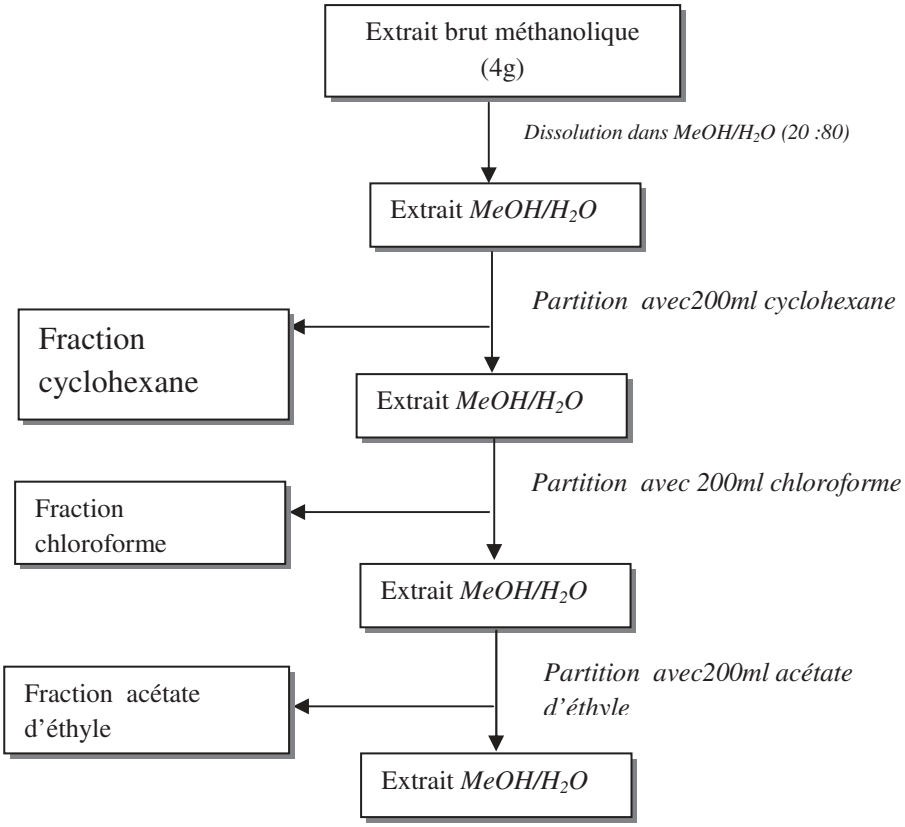


Figure29 : Schéma des différentes étapes de fractionnements de l'EMeOHF-S

Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt) :

Nous avons utilisé pour le fractionnement de cet extrait **(AcOEt)**, presque les mêmes techniques que celle utilisées pour l'extrait MeOH F, a conduits à l'isolement d'un composé (CMPB). L'extrait AcOEt est soumis à une séparation par flash chromatographie sur un appareil Biotage (Biotage R Isolera TM Spectra One and Four). Les conditions opératoires sont présentées ci-dessous.

- Colonne de Silice : SNAP C18
- Eluant : Chloroforme, Méthanol
- Débit : 24ml / min
- Volume de fractions : 22ml
- Nombre de fraction : 42
- Détecteur : type ELSD
- Gradient : Annexe1(A)

Le contrôle des sous fractions a été effectué par CCM sur plaque de gel de Silice 60 F_{254}

Eluant : Chloroforme/Methanol/eau (10:7 :3) v/v/v

Révélation avec vanilline sulfurique

Regroupement des fractions en trois fractions

- Les fractions (1-7) : fraction A
- Les fractions (8-14) : fraction B (84mg)
- Les fractions (15-42) : fraction C

Séparation par Chromatographie sur Couche Mince préparative

Quant à la fraction B, elle est soumise à une CCM préparative pour donner le composé B. Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous

- ✓ Support chromatographie : plaque en verre gel de Silice Silice 60 F_{254} 20X20 cm (Merck), épaisseur couche 2mm
- ✓ Phase mobile : Chloroforme/Méthanol/eau (10 :7 :3) v/v/v
- ✓ Révélateur: réactif NEU
- ✓ Solvant de récupération: eau/MeOH

2.12. Chimie structurale

2.12.1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique qui sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. En effet, les noyaux de certains atomes (1H, 13C, ...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une valeur quantique appelée « le spin ». La RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraine un dédoublement des niveaux d'énergie du « spin » nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate.

Le spectre RMN du proton fournit de nombreuses informations telles que les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes voisins d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

Le spectre RMN du Carbone 13 permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette analyse permet de mettre en évidence les carbones primaires
(CH_3), secondaires (CH_2), tertiaires (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires **(Silverstein et *al*., 2004).**

Les spectres de résonnance magnétique nucléaire RMN ^{1}H et ^{13}C sont enregistrés sur un appareil Bruker avance à 500 MHz pour ^{1}H et ^{13}C, de l'Université de Mons, Belgique. Les échantillons sont dissous dans des solvants deutérés : MeOH-*d* et H_2O-*d*.

2.13. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triplicata et sont exprimées en tant que moyenne ±écart type, l'analyse statistique a été exécutée en utilisant l'analyse de la variance a un critère de classification (ANOVA), suivi du test Tukey au seuil de signification ($P < 0,05$), en utilisant le logiciel Minitab 16.

La détermination de la concentration IC50 est effectuée par le logiciel Minitab 16.

2.14. Technique histologique

Pour l'étude anatomique et histologique des feuilles et tiges de l'espèce *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus,* nous avons utilisé la technique de la double coloration.

2.14.1. Double coloration

- **Principe :** Sur une coupe aussi fine que possible, on fait agir successivement des solutions d'hypochlorite de sodium et d'hydroxyle de sodium diluées. Les contenues cellulaires sont détruits, les parois sont respectées. En faisant agir successivement le vert de méthyle et le rouge Congo, les parois cellulosiques se colorent en rose, les parois lignifiées ou sclérifiées se colorent en vert (**Paris et Hurabielle, 1981).**
- **Mode opératoire :**

Pour obtenir une meilleure coloration qui permet de réaliser la différenciation de certains tissus on suit les étapes suivantes :

- Pendant 15 à 20 min dans l'hypochlorite de sodium dilué au ½ (dans le bute de vider les cellules de leurs contenus).
- Rinçage avec l'eau distillée.
- Rinçage avec la solution d'hydroxyde de sodium à 5%.
- Rinçage avec l'eau distillée.
- Passer successivement dans l'eau additionnée de quelques goutes d'acide acétique (qui détruira les traces hypochlorites restantes et qui facilitera la fixation ultérieure des colorants).
- Traitement avec le vert de méthyle pendant 2 à 3 min.
- Rinçage avec l'eau distillée.
- Traitement avec le rouge Congo pendant 15 min.
- Rinçage avec l'eau distillée. Puis montrer entre lame et lamelle pour l'observation microscopique.

2.14.2. Histométrie

L'étude histométrique faite au niveau des feuilles et des tiges de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* récoltés pendant les trois stades *;* va nous permettre de mesurer d'une manière précise tous les tissus observés des dix meilleures coupes. La mesure des dimensions des différentes structures des tissus est très intéressante. Elle est réalisée à l'aide d'un microscope optique et un micromètre **(Henaoui et Bouazza, 2013)**.

Partie III

Résultats et discussion

1. Huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill.

1.1. Rendement des HEs de *P. halepensis* Mill.

Le rendement moyen (0,81%) de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. récoltées dans le site 1 est supérieur à celui du site 2 (0,3%). Nous notons que le rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj (Algérie), est de 0,52% **(Dob et *al.*, 2005)**. Cette variation est probablement due à la sensibilité de l'huile essentielle aux facteurs biotique et abiotique.

1.2. Composition chimique des HEs de *P. halepensis* Mill.

Les chromatogrammes des huiles essentielles sont comparés à la banque de données NIST27, afin d'identifier les composés correspondants, d'où l'intérêt de la CG/SM. Les constituants chimiques identifiés dans les aguilles de pin du lac Mellah (site1) sont au nombre de 16 (Tab.12 et Fig.30[a]). Ce sont principalement le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%) et le β-myrcène (19,38%). Les composés mineurs sont représentés par l'α-terpinolène (5,27%), l'α-caryophyllène (4,76%), la Sabinène (3,42 %) et le β-pinène (2,13%).

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. du site 2 a décelé la présence de 16 composés (Tab.12 et Fig.30[b]), parmi lesquels, on distingue des constituants majoritaires tels que: l'α-pinène (21,01%) et le β-caryophyllène (31,14%). Ces deux composés constituent plus de la moitié de la composition totale de cette huile. Cependant, d'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir le β-myrcène (9,3%), la sabinène (8,21%), l'α-terpinolène (9,43%) et le phényl-éthyl-isovalerate (3,9%)

Tableau12 : Composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.

composé	Tr (min)	Aire de présence (%)	
		Site 1	Site 2
α-thugène	3,18	-	0,63
α-pinène	3,72	24,41	21,01
β-pinène	4,74	2,13	-
Sabinène	4,79	3,42	8,21
β-myrcène	5,24	19,38	9,3
3-carène	5,45	1,33	2,17
α-terpinène	4,17	-	0,56
Terpinène 4-acétate	5,85	0,40	-
Limonène	6,09	1,35	1,59
α-phelandrène	6,31	0,66	0,94
β-cis-ocimène	6,78	1,13	1,18
γ-terpinène	7,07	6,69	1,02
α-terpinolène	7,97	5,27	9,43
Terpinène 4-ol	13,53	0,56	1,28
α-cubibène	18,56	0,46	0,59
β-caryophyllène	21,06	31,89	31,14
α-caryophyllène	22,55	4,76	4,68
Phényl-éthyl-isovalerate	26,84	1,61	3,9
Nombre total de composés identifiés		16	16
Aire de présence totale		99,43%	97,63%

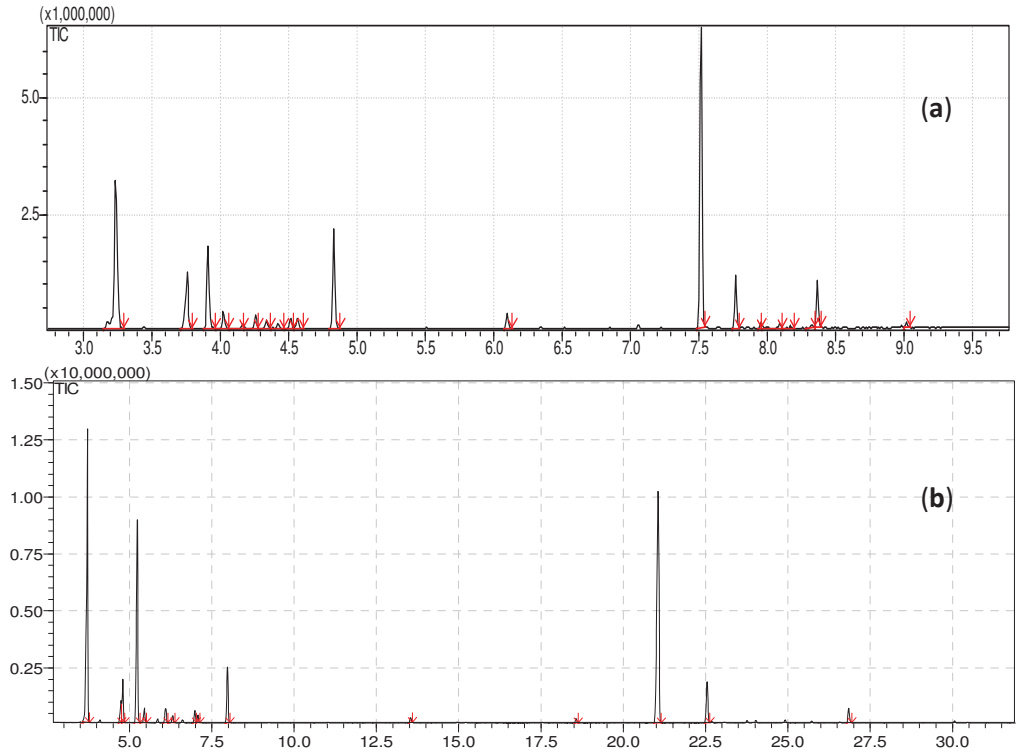


Figure30 : Chromatogrammes de l'huile essentielle de *P. halepensis* des sites 1 (**a**) et 2 (**b**)

Les résultats obtenus montrent qu'il existe des différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. des deux sites. Cette variation serait due principalement aux facteurs de l'environnement qui exercent une influence directe sur la composition et la production de cette huile.

Les investigations réalisées en Algérie sur la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. ont montré qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette même espèce. Les régions de Djelfa et Tissemsilt, sont caractérisées par le chémotype α-pinène (17,56%) et β-myrcène (8,45%), Sidi Fredj est représenté par le β-caryophyllène **(Dob et *al.*, 2005)**. Enfin, le chémotype de l'HE de la région de Ghazaouet est le caryophyllène oxyde avec un taux de 48%. La composition chimique de l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. en provenance du Maroc est de chémotype α-pinène (23,2%) et 4-ol caryophyllène (14,24%) **(Hmamouchi et *al.*, 2001)**. L'analyse menée par **Roussis et *al.* (1995)** sur la même espèce de Grèce, montre que la composition est dominée par l'α-pinène (13,4%), et le caryophyllène (19,05%), alors que celle de Tunisie est à dominance β-caryophyllène (33,9%) et β-pinène (10,76%). **Macchioni et *al.* (2003)** rapportent que les constituants majoritaires des aiguilles de pin d'Alep d'Italie sont, le myrcène (27,9%) et l'α-pinène (18,1%).

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent un pourcentage élevé dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep des sites 1 et 2. Ces taux sont respectivement de 59,07% et 57,58%. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont de 37,07% dans le site 1 et 37,16% dans le site 2. Les monoterpènes oxygénés ne sont présents que dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. du site 1 avec un taux de 0,56%. La présence d'autres composés chimiques dans l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. provenant des sites 1 et 2 représentent respectivement une aire de 2,93% et 4,04%. Nos résultats corroborent avec ceux de **Dob et *al.* (2005) et Hamamouchi et *al.* (2001),** qui mentionnent une prédominance des monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill.

2. Huiles essentielles de *Thymus ciliatus*

2.1. Rendement des HEs de *T. ciliatus*

Les rendements moyens en HE (w /w%) ont été déterminés par rapport à la matière sèche de la partie aérienne de *Thymus ciliatus* récoltée pendant les différents stades de croissance avant, début et après floraison sont : (0,54%), (0,78%) et (1,2%) respectivement (**Fig.31).** Le rendement le plus élevé est celui des échantillons récoltés après floraison, cependant plusieurs chercheurs indiquent que la plante accumule le plus d'HE au stade de floraison **(Bruneton, 2009 ; Mirjalili et *al.*, 2006 ; Boukhebti et *al.*, 2011 ; Belmalha et *al.*, 2015).**

Nos résultats sont inferieurs par rapport à d'autres travaux, le rendement des HEs de *T. ciliatus* de djebel Edough Annaba a été estimé à 3,2% (**Amrouni et *al.*, 2014**). Cependant **Ghorab et *al.* (2014**) ont trouvé un rendement très important des HEs de *T.ciliatus* provenant de Tlemcen à 5,1%, alors que dans les régions de Ain Mlila, Batna, Oum El Bouaghi, ils ont enregistré des teneurs de (2%), (2,1%), (2%) respectivement, tandis que des HEs de *T. ciliatus* prevenant du Maroc présentent des teneurs inferieures par rapport à celles enregistrées en Algérie, celle de la région Azrou (0,3%) et Imilchi (1,6%).

Selon une étude menée par **Bounatirou et *al.* (2007)** sur la variation de la composition chimique des HEs *Thymus capitatus* Hoff. et Link. de Tunisie durant les différentes phases de développement de la plante, il s'avère que le rendement le plus faible est celui du stade végétatif de la plante, alors que le stade de floraison il atteind le rendement le plus élevé.

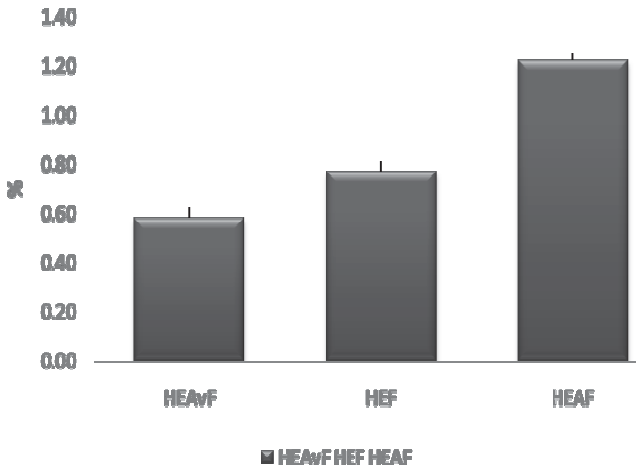


Figure 31 : Rendements des Huiles Essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*

HEAF avant floraison, HEDF : HE début floraison, HEF : HE après floraison

2.2. Composition chimique des HEs de *T. ciliatus*

Les résultats de la composition chimique de l'HE de *Thymus ciliatus* obtenue pendant trois périodes de l'année sont rapportés dans le tableau 13 ; les profils chromatographiques sont illustrés dans la figure32.

L'analyse chimique par CG/SM, nous a permis d'identifier 50 composés pour l'HE de *Thymus ciliatus* avant floraison, ce qui correspond à (98,62%) du total de l'HE de cette plante. Elle est constituée essentiellement par les monoterpènes phénoliques dont : Thymol (33,39%), carvacrol (24,16%) et d'autres constituants avec des taux moins importants, tel que γ-terpinène (08,89%), p-cimène (8,25%), α-terpinolène (7,36%).

En second, la CG/SM nous a permis de recenser 54 composés pour l'HE de *Thymus ciliatus* après floraison, ce qui correspond à (99,50%) du total de l'HE de cette plante. Elle est constituée essentiellement par les monoterpènes phénoliques dont : Thymol (29,52%), carvacrol (30,85%) et d'autres constituants avec des taux moins important tel que p-cimène (8,45%), α-terpinolène (7,71%) et γ-terpinène (05,58%).

Et finalement 55 constituants ont été retrouvés dans l'HE de *Thymus ciliatus* début floraison, ce qui correspond à (99,28%) du total de l'HE de cette plante. Elle est constituée essentiellement par les monoterpènes phénoliques dont : Thymol (21,02%), carvacrol(31,37%) et d'autres constituants avec des taux moins importants tel que γ-terpinène (10,95%),p-cimène (8,71%), α-terpinolène (6,11%) et α-pinène (5,18%).

Les Huiles Essentielles de *T. ciliatus* récolté pendant les différents stades de croissance , avant, début et après floraison sont constituées d'un mélange de plusieurs groupes chimiques, les monoterpènes oxygénés sont présents à plus de 50% de leur composition totale avec des taux (62,58%), (66,89%) et (56,69%) respectivement (Tab.13). Le taux des monoterpènes hydrocarbones le plus élevé est observé dans l'HE après floraison (36,29%), suivi de l'HE avant floraison (29,68%) et floraison (26,42%). Les sesquiterpènes sont les moins représentés dans la composition chimique des HEs analysées, on note des teneurs inferieures à 5%.

Cependant, les sesquiterpènes hydrocarbonés sont représentés avec un taux de (4,1%) dans les HEs obtenues avant et après floraison, suivi de l'HE floraison (3,72%), le groupe des sesquiterpènes oxygénés atteint (0,3%) dans la composition chimique des HEs obtenues avant et pendant floraison, alors qu'il est absent dans l'HE après floraison.

Tableau 13 : Composition chimique des huiles essentielle de *Thymus ciliatus ssp. coloratus*

Composé		Aire de présence (%)		
	Tr(min)	**Avant floraison**	**floraison**	**Après floraison**
isovaleric acide	**4,36**	0,02	0,02	0,05
α-thujène	**9,84**	0,78	0,45	0,88
α-pinène	**10,24**	1,41	1,63	5,18
Camphène	**11,05**	0,56	0 ,31	0 ,62
Verbenène	**11,39**	-	-	0,05
β-pinène	**12,75**	0,19	0,15	0,26
1octen 3ol	**13,12**	1,49	1, 6	1, 6
3octanone	**13,51**	0,14	0,17	0,17
β-myrcène	**13,70**	0,85	0,70	1,22
3-octanol	**14,102**	0,22	0,24	0,22
α-phellandrène	**14,57**	0,16	0,09	0,19
3-carène	**14,96**	0,04	0,03	0,06
α-terpinène	**15,46**	1,08	0,63	1,42
p-cymène	**16,17**	**8,25**	**8,45**	**8,71**
Limonène	**16,32**	0,50	0,68	1,07
Eucalyptol	**16,45**	0,13	0,12	0,09
β-ocimène	**17,72**	0,05	0,05	0,04
ï-terpinène	**18,54**	8,86	5,58	10,97
Linalool oxide	**19,37**	0,12	0,12	0,13
1-octen-3-ol	**19,99**	-	0,1	-
α-terpinolène	**21,72**	**7,36**	**7,71**	**6,11**
β-phellandrène	**22,82**	0,05	0,05	0,05
Trans –pinocarveol	**23,97**	0,11	0,02	0,10
Mentha-1 ,4,8-drienne	**24,46**	0,10	0,10	-
Z- citral	**24,45**	-	-	0,04
Borneol	**25,99**	2,26	2,98	1,78
Terpinène-4-ol	**26,82**	1,55	2,41	1,03
p-cymen-ol	**27,37**	-	0,15	0,17
α-terpinolène	**27,76**	-	0,08	0,04
b fenchyl alcohol	**28,63**	0,11	-	-
cis-dihydrocarvone	**29,13**	0,06	0,22	0,14
Methyl thymol ether	**30,92**	-	0,04	0,04
carvacrol methyl ether	**31,53**	0,07	-	0,03
3-carène	**31,86**	-	0,04	0,04
Carvone	**33,13**	-	0,05	0,03
Thymol	**35,63**	**33,39**	**29,52**	**21,02**

Carvacrol	**36,62**	**24,16**	**30,85**	**31,37**
Eugenol	**39,30**	0,04	0,14	0,03
α-copaène	**40,32**	0,21	0,15	0,25
β-bourbonène	**40,90**	0,29	0,29	0,34
Caryophyllène	**43,03**	0,23	0,29	0,32
β-cubebène	**43,67**	0,15	0,13	0,14
Aromadendrène	**45,56**	0,07	0,10	0,12
α-amorphène	**46,60**	0,39	0,31	0,40
germacrène d	**46,86**	0,61	0,23	0,28
β-selinène	**47,14**	0,06	0,07	0,07
α-cubebène	**47,70**	0,27	0,18	0,25
α-muurolène	**48,07**	0,13	0,12	0,14
β-bisabolène	**48,62**	0,11	0,11	0,06
ï-cadinène	**48,87**	0,33	0,28	0,42
Delta cadinène	**49,50**	1,04	1,02	1,02
α-cadinène	**50,24**	-	0,04	0,05
Calacorène	**50,54**	-	0,15	0,03
Ledene	**53,31**	-	0,08	0,05
Apiol	**55,29**	0,04	-	-
α-cadinol	**56,89**	0,28	0,30	0,14
Dehydroromadendrene	**58,60**	0,12	0,13	0,11
Cetanol	**68,73**	0,05	0,04	0,08
β- fernesène	**80,61**	0,09	0,04	0,06
Cuminol	**92,51**	0,04	-	-
Aire de présence totale		**98,62**	**99,50**	**99,28**
Groupes chimiques				
Mono terpènes hydrocarbones		**29,68**	**26,42**	**36,29**
Monoterpènes oxygénés		**62,58**	**66,89**	**56,69**
Sesquiterpènes hydrocarbones		**04,1**	**3,72**	**4,11**
Sesquiterpènes oxygénés		**0,32**	**0,3**	**-**
Autres		**1,94**	**2,17**	**2,19**
Nombre total de composés identifiés		**50**	**54**	**55**

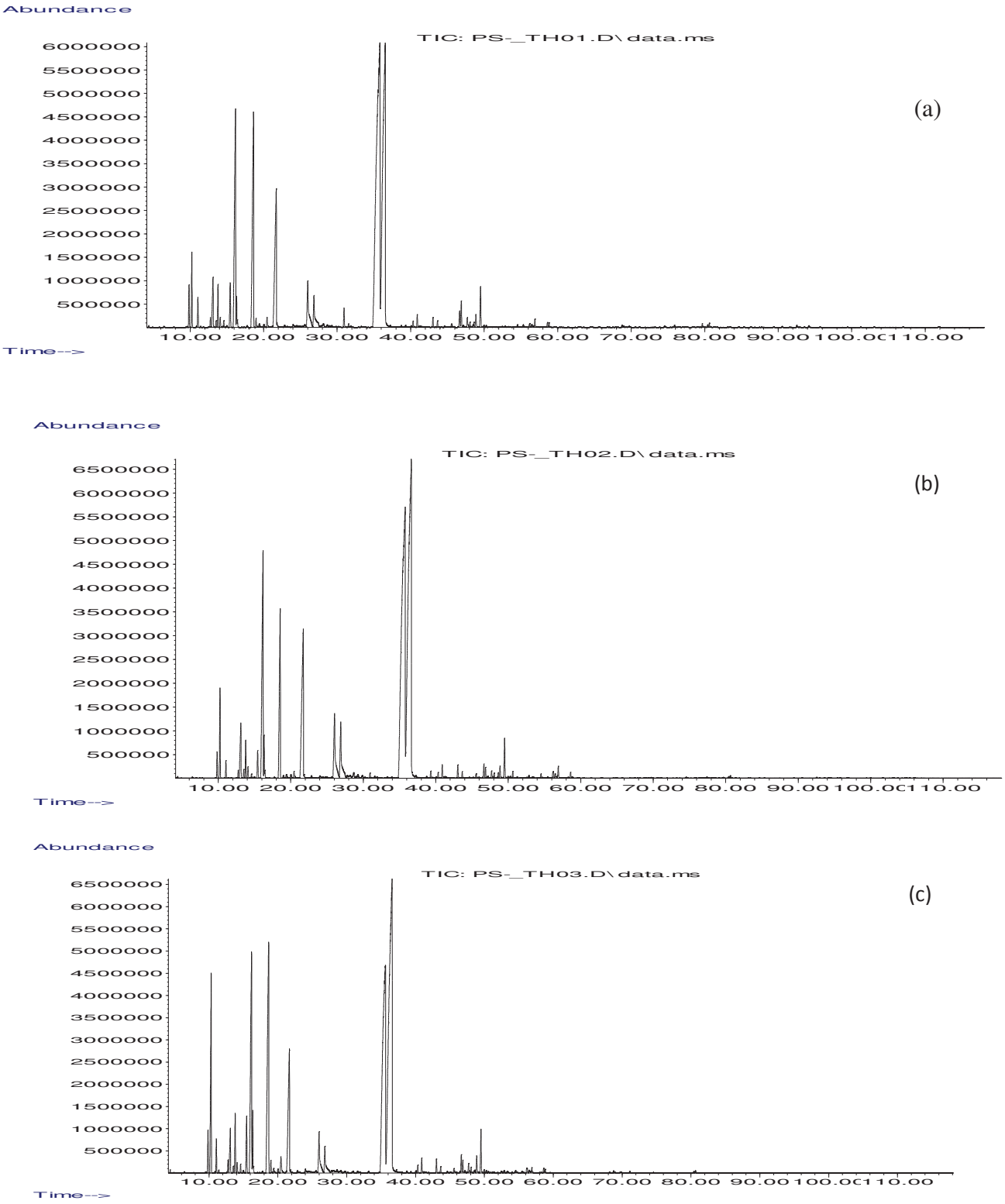


Figure32 : Chromatogrammes de l'huile essentielle de *T. ciliatus* obtenue (a) avant floraison (b) pendant floraison (c) après floraison

On remarque que les deux constituants qui dominent l'HE de *T. ciliatus* sont : Thymol et carvacrol, leurs teneurs varient selon la période de récolte de la plante, la teneur en ces deux composés Thymol /carvacrol est la plus importante en période après floraison avec un taux de 60%.

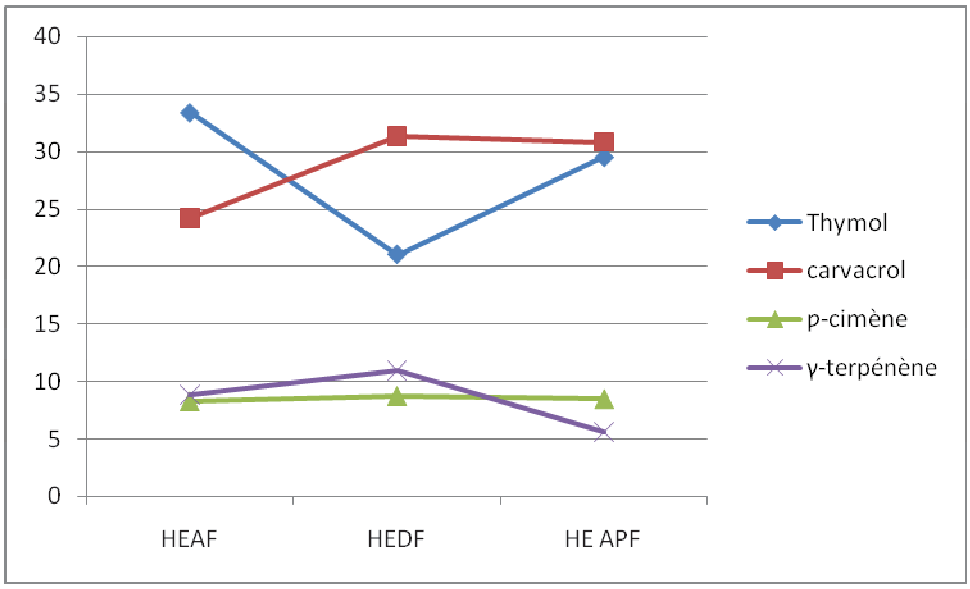


Figure 33 : Variation des composés majoritaires des HEs de *T. ciliatus* durant son cycle phénologique

HEAF avant floraison, HEDF : HE début floraison, HEAPF :HE après floraison

D'après la figure 33 la teneur en composé majoritaire de l'HE de *T. ciliatus* change d'un stade à un autre durant sa croissance. On observe une diminution de la teneur de Thymol au stade début de floraison, puis elle augmente au stade après floraison, le maximum a été enregistré au stade avant floraison (végétatif), tandis que le carvacrol contrairement au thymol, augmente au stade début floraison (floraison) puis diminue légèrement. Le p-cymène est présent dans les différents stades à des teneurs semblables. On observe qu'il n y a pas de relation entre les taux de carvacrol et p-cymène pendant les différentes périodes de récoltes, en outre nos résultats différent à ceux de **Bounatirou et *al.* (2007)** qui ont observé que le p-cymène est à son taux maximum lorsque le carvacrol est à son minimum, parce que le p-cymène est le précurseur du carvacrol. La teneur en γ-terpinène augmente au stade début floraison puis diminue pendant le stade après floraison. Le maximum a été enregistré au début de la floraison.

Le *p*-cymène (1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene) et γ-terpinène (1- methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-cyclohexadiene) sont deux précurseurs carvacrol (2-methyl-5-(1-methylethyl)- phénol) et thymol (5-methyl-2-(1-methylethyl)phenol), d'ailleurs selon **(Jerkovic et *al.*, 2001)** la somme des teneurs de ces quatre composés : thymol , carvacol, p- cymène γ-terpinène présents, reste stable dans les plantes récoltées pendant les différentes saisons. De même avec *Thymus vulgaris* d'Italie **(Marino et *al.*, 1999),** nos résultats confirment ces notations avec des sommes de (74,66%) avant floraison, (74,4 %) floraison, (72,67%) après floraison.

Nos résultats montrent que la composition chimique des HEs de *T. ciliatus,* présentent un polymorphisme chimique, d'ailleurs les investigations réalisées en Algérie, ont montré qu'il existe une variation dans la composition chimique. L'HE de *T. ciliatus* de Tlemcen est caractérisée principalement par le carvacrol (80,30%) et p-cymène (06,10%) **(Ghorab et *al.*, 2014)**. Cette dominance du carvacrol a été également signalée par **Bousmaha et *al.* (2007)** qui ont montré que la composition chimique de l'HE de *T. ciliatus* subsp *eucilliatus* de huit provenances de la région de Tlemcen est composée principalement par le carvacrol (72,4-80,3%) suivi de p-cymène (04,2-07,2%).

D'après les résultats obtenus par **Ghorab et *al.* (2014)** le profil chimique de l'HE de *T .ciliatus* de Batna est dominé principalement par le thymol (79,10%), p-cymène (05,60%), de même le thymol (54,98%) est le constituant majoritaire de l'HE de *T. ciliatus* de Ain Mlila suivi de γ–terpinène (07,33%) et p-cymène (06,66%).

L'HE de *T. ciliatus* de Guelma est également dominé par le thymol (60,52%) **(Giordani et *al.*, 2008)**, **Amrouni et *al.* (2014)** ont trouvé que le thymol (57,66%) est le constituant majoritaire d'HE de *T. ciliatus* de djebel Edough Annaba suivi, de carvacrol (16,19%).

Globalement l'HE de *T. ciliatus* Nord -est algérien est caractérisé par un chémotype Thymol alors que celui de l'Ouest- algérien est caractérisée par un chémotype carvacrol. Par contre les investigations réalisées par **Ghorab et *al.* (2014)** sur la composition chimique de l'HE de *T. ciliatus* de Oum El Bouaghi ne contenait aucun composé majoritaire commun avec *T. ciliatus* des autres régions et le composé majoritaire était le viridiflorol (16,12%) suivi de α-pinène (08,75%) et γ–terpinène (07,50%).

Les travaux effectués par **(Ghorab et *al.*, 2014)** sur la composition chimique des HEs de *T. ciliatus* du Maroc ont montré qu'il existe une variabilité de la composition chimique, d'ailleurs l'HE de *T. ciliatus* de Azrou est représentée par le chémotype (thymol, β-ociméne) avec des taux respectivement (44,20 et 25,8%), et celle de Imilchil est thymol (17,30%) et Carvacrol (26,20%). On note également, le même chémotype a été rapporté par **Amarti et *al.* (2013)** lors de l'investigation de l'HE de *T. ciliatus* de Azrou.

Les variations observées dans la composition chimique et les rendements des HEs de *T. ciliatus* issus de différentes régions d'Algérie et du Maroc sont liés à plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques, tels que les facteurs bioclimatiques, génétiques et géographiques **(Moghadem et *al.*, 2015 ; Amarti et *al.*, 2010)** et la période des récoltes **(Nezhadali et *al.*, 2014).**

En examinant la littérature relative à la composition chimique des HEs chez le genre Thymus, il en ressort que les monoterpènes oxygénés sont représentés majoritairement par les monoterpènes phénoliques qui sont des composés abondant dans le genre Thymus **(Al-Fatimi et *al.*, 2010)** , on constate aussi que les monoterpènes phénoliques peuvent être présents comme composants mineurs. La plupart des chercheurs ont rapporté que les HEs de ces espèces sont composées principalement de thymol et son isomère le carvacrol avec une moyenne de (3,3-66,3%) pour le thymol et (3-58,9%) pour le carvarol et ce avec *T. persicus*, *T. eriocalyx*, *T. tosevii*, *T. caramanicus*, *T. vulgaris*, *T. pallescens, T. capitatus* , et *T. pulegioides* **(Al-Fatimi et *al.*, 2010 ; Hazzit et *al.*, 2009 ; Amarti et *al.*, 2006).** D'autres ont signalé la présence de thymol et un faible pourcentage ou bien absence en carvacrol tel que dans l'HE de *T. ciliatus*, *T. bleicherianus*. *T. algeriensis* **(Giweli et *al.*, 2013 ; Amarti et *al.*, 2013).**Tandis que d'autres rapporteurs ont démontré au contraire la présence de carvacrol et l'absence, ou bien la présence à faible concentration de thymol , tel que dans la composition chimique de l' HE de *T. dreatensis*, *T. laevigatus*, *T. broussonetii*, *T. revolutus* Celak **(Hazzit et *al.*, 2009 ; Al-Fatimi et *al.*, 2010 ; El Ouariachi et *al.*, 2014 ; Karaman et *al.*, 2001).** On observe même l'absence de composé phénolique ou bien la présence à très faible concentration, telle que dans l'HE de *T. algeriensis* rapporté par **Hazzit et *al.*, 2009 ; Amarti et *al.*, 2010 ; El Ouariachi et *al.*, 2014 et** dans *T. camphoratus* et *T. mastichina* **(Miguel et *al.*, 2004).**

Généralement, la composition chimique des huiles essentielles de thym dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'origine, le stade de croissance, l'influence environnementale et patrimoine génétique **(Amartie et *al.,* 2006).**

2.3. Indices physico-chimiques des HEs de *T. ciliatus*

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE.

2.3.1. Caractéristiques organoleptiques :

A l'issue des distillations, l'HE obtenue est de couleur jaune avec une odeur prononcée de thymol. Les paramètres organoleptiques de nos HEs sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR(2000).

2.3.2. Caractéristiques physico-chimiques:

Les spécificités physico-chimiques de l'HE de *T. ciliatus* sont répertoriées dans le tableau 14. Les résultats obtenus indiquent que l'indice d'acide des huiles essentielles testées est le même avant, pendant et après la floraison (2,24), sachant qu'un Indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) **(Kanko et *al*., 2004).**

Le tableau 14 indique une variation des valeurs d'indice d'ester des huiles essentielles à différents stades, qui est due probablement à la variation de la composition chimique d'un stade à un autre ; on enregistre un indice élevé de l'HE floraison, alors qu'il est inferieur en période avant floraison et atteint son minimum après floraison. On a trouvé que les HEs de *T. ciliatus* sont miscible à l'éthanol avec 1*V*/2*V* d'éthanol.

La densité relative à 20°C se diffère d'un stade à un autre. Dans le 1er stade, elle est de (0,42), puis elle diminue dans le 2ème stade (0,3), tandis qu'au 3ème stade elle est de l'ordre de (0,9). D'après ces résultats on peut dire que l'Huile Essentielle de *Thymus ciliatus* après la floraison est plus dense que celles avant et en pleine floraison

La lecture obtenue à l'aide d'un réfractomètre montre que les valeurs d'indice de réfraction sont très proches des HEs à différents stades, « Avant floraison : 1,4815 », « Pendant la floraison : 1,4954 » et « après floraison : 1,4914 ». Selon **Kanko et *al.* (2004),** un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé.

Tableau 14 : Les caractéristiques physicochimiques des HEs de *T. ciliatus*.

Paramètres étudiés	**Huiles essentielles**		
	AvF	F	ApF
Indice d'acide (IA)	2,24	2,24	2,24
Indice d'ester (IE)	100,6	112,2	93,5
Miscibilité à l'EtOH (*V/V*)	1-2	1-2	1-2
Densité d_t^{20}	0,42	0,3	0,9
Indice de réfraction α_D^{25}	1,4815	1,4954	1,4914

AvF : avant floraison ; F : Floraison ; ApF : Floraison

A partir de ces valeurs, il en ressort que toutes ces constantes sont influencées par le cycle végétatif. Cependant et malgré ces fluctuations, nous remarquons que les paramètres physico-chimiques de nos HEs sont en accord avec ceux mentionnés par les normes.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux donnés par la littérature relative au genre thymus, on constate que la densité, l'indice de réfraction et la miscibilité à l'éthanol sont comparables à celles de *Thymus vulgaris L., T. fontanesii* Boiss& Reut et *T. serpillum* L**. (Garnero, 1991 ; Haddouchi et *al.*, 2009 et Patri et Silano, 2002**). Cependant, l'indice d'acide est largement inférieur aux valeurs données, des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* (8,4) **(Garnero, 1991),** par contre supérieur à celui de *T. serpillum* L. (0,73) **(Patri et Silano, 2002**). Tandis que l'indice ester est largement supérieur aux valeurs données, des huiles essentielles de *T. serpillum* L. (2,075) **(Patri et Silano, 2002).**

3. Teneur en eau, matière organique et cendre de *T. ciliatus*

D'après le tableau 15, nôtre plante *Thymus ciliatus* récoltée dans la zone de l'Edough,-Annaba renferme un taux d'humidité très élevé qui varie de 56±9,56 à 40,11±7,60%. Cela signifie que la plante est très riche en eau. Ce taux diminue avec l'augmentation de la température (saison), et l'âge de la plante (cycle végétatif). D'ailleurs on remarque que le taux le plus élevé est observé au stade végétatif (56±9,56%), tandis qu'au stade après floraison (en été) le taux atteint 40,11±7,60%. Ce taux est largement supérieur à ceux rapportés dans la **Pharmacopée européenne (2005)**, dont la teneur en eau du thym est de 27%.

La teneur en eau varie : selon les espèces; les conditions pédoclimatiques et le stade de développement. Nous constatons les mêmes résultats pour la matière sèche. La teneur en eau est proportionnelle au taux d'humidité. Elle est de l'ordre de 44±9,56 à 59,89±7,60 %.

Tableau 15 : La teneur en eau, matière organique et cendre de *T. ciliatus*

	H%	MS%	MO%	C%
Thy1	**56±9,56**	**44±9,56**	**96,93±1,26**	**3,06±±1,26**
Thy2	**45,78±7,90**	**54,22±7,90**	**95,52±5,43**	**4,48±5,43**
Thy3	**40,11±7,60**	**59,89±7,60**	**93,52±10,26**	**6,48±10,26**

Thy1 : avant floraison ; Thy2 :floraison ;Thy3 :après floraison

La teneur en cendres du *T. ciliatus* ssp.*coloratus* a été déterminée après incinération. La cendre grisâtre obtenue représente les diverses substances minérales. Elle est de 3,06±1,26 au stade végétatif et de 4,48±5,43au stade de floraison, après floraison de l'ordre de 6,48±10,26 (Tab.15). Ces taux ne dépassent pas les 15% ce qui corrobore avec la norme décrite dans la **pharmacopée européenne (2005)**. Les cendres totales traduisant la charge minérale des matières végétales **(Paris et Moyse, 1976).**

En plus, la poudre de *Thymus ciliatus* est très riche en matière organique, ceci se traduit par des pourcentages allant de 93,52 à 96,93% (Tab.15).

4. Screening phytochimique de *T. ciliatus*.

Le screening phychimique de la drogue de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* est mis en œuvre par des réactions en tube soit par précipitation, soit par coloration ou examen sous lumière UV. Ces réactions nous ont permis de caractériser la présence de certaines substances chimiques dans la drogue. Les résultats de screening phytochimique effectué sur la poudre de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* sont rapportés dans le Tableau 16

Tableau 16 : Caractérisation des groupes chimiques dans la poudre de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*

Les groupes chimiques	*Thy1*	*Thy2*	*Thy 3*
Tanins cathéchiques	+	+	+
Tanins galliques	-	-	-
Saponosides	-	-	-
Anthocyanes	+	+	+
Leuco-anthocyanes	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+
Cardinolides	-	-	-
Terpènes et stéroïdes	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-
Composés réducteurs	-	-	-
Coumarines	+	+	+

(+) : présence ; (-) absent ; Thy1 :avant floraison ; Thy2 :floraison ; Thy3 : après floraison

Les tests phytochimiques ont révélé la présence des flavonoïdes, des tanins cathéchiques, des coumarines, des anthocyanes et des terpènes et stéroïdes ; par contre il y a absence totale de cardinolïdes, alcaloïdes, composés réducteurs, leuco-anthocyanes et anthraquinones**.** L'indice de mousse calculé est de 60, Il est inférieur à 100 ce qui indique l'absence de saponoside (Tab.16). En comparant avec les travaux de **Kholkhal, (2013[b]),** le screening phytochimique

de la partie aérienne *de T. ciliatus* ssp. *coloratus* de la région de Tlemcen, a montré la présence de flavonoïdes, de tanins, de terpènes, ce qui est en accord avec nos constatations. Par contre celle des coumarines s'est révélée négatif, qui n'est pas dans nôtres cas. **Kouche, (2015)** témoigne également l'absence des coumarines lors de l'étude phytochimique de *Thymus numidicus* Poiret de la région d'Annaba. Par contre une autre espèce du même genre *Thymus vulgaris* est indiquée comme plante à coumarine **(Mpondo et *al*., 2015).**

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques du genre thymus ont démontré l'absence des anthocyanes **(Kouche, 2015 ; Sayout et *al*., 2015 ; Kholkhal, 2013[b])**
En outre, **Sayout et *al*. (2015)** ont indiqué lors de leur investigation (le screening chimique) de quatre espèces de thym au niveau de deux organes (tige et feuille), qu'il y a une variation dans la présence ou l'absence des différents groupes chimiques. Elle dépend de l'espèce et de la partie de la plante étudiée, ils dénotent la présence des tanins galliques et catéchiques, flavonoïdes, stéroïdes et triterpénoïdes, térpenoïds, quinones et sucres réducteurs dans l'ensemble des organes des plantes étudiées. Cependant la variation est observée au niveau des caroténoïdes, coumarines et saponosides.

Le screening phytochimique de la partie aérienne de *T.ciliatus* ssp. *coloratus* nous a permis d'expliquer en partie les propriétés thérapeutiques de nôtre plante. Elle est très riche en polyphénols (tanins, flavonoïdes, coumarines, anthocyanes) aux fonctions écologiques nombreuses, en rapport avec leur large spectre d'actions biologiques, qui confirme et justifie son utilisation en médecine traditionnelle par la population algérienne.

Les tanins avec leurs propriétés de former des complexes avec les macromolécules en particulier avec les protéines, présentent des propriétés anti diarrhétiques, antibactériennes et antifongiques **(Bruneton, 2009).**
Les flavonoïdes ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales, antioxydantes **(Iserin, 2001**), et des propriétés anti-inflammatoires, inhibitrices d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogénes, et effets protecteurs vasculaires **(Ghedira, 2005)** et antimicrobiens **(Cushnie et Lamb, 2005)**
Les anthocyanes issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavones) sont des puissants antioxydants **(Iserin, 2001).**

Les coumarines ont des propriétés antipyrétiques, analgésiques, sédatives, anti-œdémateuses et anti-convulsivantes, la capacité de favoriser l'expulsion des gaz intestinaux entraînant une diminution des ballonnements et des flatulences **(Mpondo et *al.*, 2015).**

5. Rendement des extraits bruts de *T. ciliatus*

Pour l'obtention des differents extraits bruts de la partie aérienne de *T.ciliatus* broyée, nous avons réalisé une macération hydroalcoolique (Methanol à 70%) au cours des différents mois : mars, avril, mai, juin, juillet. Le rendement a été déterminé par rapport au matériel végétal, il est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 34.

Les résultats des rendements en extrait brut au cours des différents stades de développement de la plante sont plus ou moins variables. Ce taux augmente progressivement pour atteindre son maximum (13,9%) durant début de floraison puis, elle diminue après la floraison (4,7%). Le rendement maximum est donc obtenu au mois de mai (période de floraison).

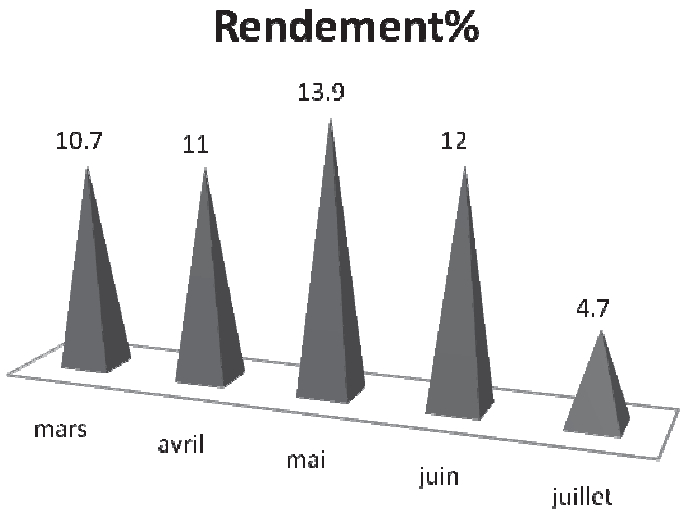


Figure 34 : Rendement en extraits bruts de *T.ciliatus* ssp.*coloratus*

La variation des taux d'extraits bruts au cours de différents stades de développement de la plante est liée aux facteurs climatiques et l'âge de la plante, Un rendement de 9,25%, de l'extrait brut a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce récoltée au mois de mai dans la région de Tlemcen, lors d'une étude entreprise par **Kholkhal (2013[b]).** C'est un pourcentage inférieur à celui obtenu dans notre étude (13,9%). Ceci pourrait être dû aux facteurs environnementaux.

6. Rendements des différentes extractions de *T. ciliatus*

L'extraction avec les solvants à polarité croissante a permis d'obtenir quatre extraits de *Thymus ciliatus* : l'extrait hexanique (EHex), l'extrait dichlorométhanolique (EDCM) et l'extrait méthanolique (EMeOH), l'extrait aqueux (après les solvants) (EAq AS), en plus un extrait aqueux (EAqu) a été obtenu suite à une macération avec de l'eau distillée, ces extractions ont été effectuées par macération et pendant les trois stades de développement de la plante (avant, pendant et après floraison). L'extraction avec des solvants à polarité croissante en utilisant comme technique d'extraction le soxhlet a permis également d'obtenir quatre extraits de *Thymus ciliatus* récolté pendant floraison (EHexF-S, EDCMF-S, EMeOHF-S, EAqASF-S). Le calcul des rendements par rapport au poids total de la poudre de la partie aérienne est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant (Tab.17).

Les résultats obtenus (Tab.17) montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, suivis de l'extrait hexanique et le dichlorométhanolique. Cela signifie que les extraits polaires (MeOH, Aqu) ont donnés les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits apolaires (Hex, DCM) pendant les différentes périodes.

La variation observée des rendements à différentes extractions peut être attribuée à la polarité des différents composés, comme il a été rapporté dans la littérature **(Ben El hadj ali et *al.*, 2014).** Cependant, nous avons remarqué que le rendement en extrait méthanolique de la période de floraison est le plus élevé (12,5%) par rapport aux autres extraits méthanoliques : végétative (10%) et après floraison (9,02%). Par contre les rendements d'extraits aqueux semblent être identiques durant les différentes extractions ; avant et pendant floraison (12,5%), après floraison (12%).

Tableau 17 : Aspects, couleur et rendement des extraits de différentes extractions de *Thymus ciliatus*

Période	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement(%)
	Extraction par Macération			
AvF	**Hex**	**Pâteux**	**Vert foncé**	**5,78**
	DCM	**Pâteux**	**Vert foncé**	**1,31**
	MeOH	**Pâteux**	**marron**	**10**
	Aqu	**Poudre**	**marron**	**12,5**
F	**Hex**	**Pâteux**	**Vert foné**	**1,96**
	DCM	**Pâteux**	**Vert foncé**	**1,77**
	MeOH	**Pâteux**	**marron**	**12,5**
	Aqu AS	**Poudre**	**marron**	**11,36**
	Aqu	**Poudre**	**marron**	**13**
ApF	**Hex**	**Pâteux**	**Vert foné**	**4,4**
	DCM	**Pâteux**	**Vert foncé**	**5,4**
	MeOH	**Poudre**	**miel**	**9,02**
	Aque	**Poudre**	**marron**	**12**
	Extraction par Soxhlet			
F	**Hex**	**Pâteux**	**Vert foncé**	**1,8**
	DCM	**Pâteux**	**Vert foncé**	**3**
	MeOH	**Pâteux**	**marron**	**11,07**
	Aqu AS	**Poudre**	**marron**	**5**

F : floraison ; AvF : avant floraison ; ApF :après floraison

Les extraits apolaires présentent des rendements qui varient de 1,31 à 5,78%. Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait hexanique avant floraison. Cependant après floraison et pendant la floraison, les rendements sont de l'ordre de (4,4%) et (1,96%) respectivement. Les rendements des extraits dichlorométhanoliques sont globalement les plus faibles, un taux de 5.4% est enregistré lors de l'extraction après floraison, qui est le plus élevé par rapport aux rendements obtenus pendant floraison (1,77%) et avant floraison (1,31%).

Les résultats démontrent l'effet de la période de récolte de la plante sur le rendement d'extraction, ceci est en relation avec sa composition chimique à différents stades de croissance, qui se traduit par des modifications du métabolisme secondaire tout au long du développement de la plante, d'autre part ceci peut être lié aux conditions climatiques (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols **(Fadili et *al*., 2015).**

La variation du rendement d'extraction a été également attribuée à la technique d'extraction. On observe que le rendement des extraits polaires : MeOH et Aqu obtenus par soxhlet sont de 11,07 et 5%, alors que ceux obtenus par macération sont : 12,5% et 11,36% respectivement. Par ailleurs mis à part l'extrait DCM obtenu par soxhlet, nos résultats révèlent que les plus importants rendements sont obtenus par macération par rapport à ceux obtenus par soxhlet. Ces constatations sont en accord avec les résultats rapportés par **Bourgou et *al.* (2016).**

7. Analyse quantitative des extraits de *T. ciliatus*

7.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique décrite par **Singleton et *al*., 1965** avec le réactif de Folin Ciocalteu. La courbe d'étalonnage est effectuée par ac gallique à différentes concentrations (Fig.35)

Le contenu des flavonoïdes totaux (Fl) a été déterminé par la méthode de Trichlorure Aluminium décrite par **Zhishen et *al.* (1999)**, la catéchine a été utilisée comme contrôle positif. La courbe d'étalonnage est effectuée par la catéchine à différentes concentrations (Fig.35)

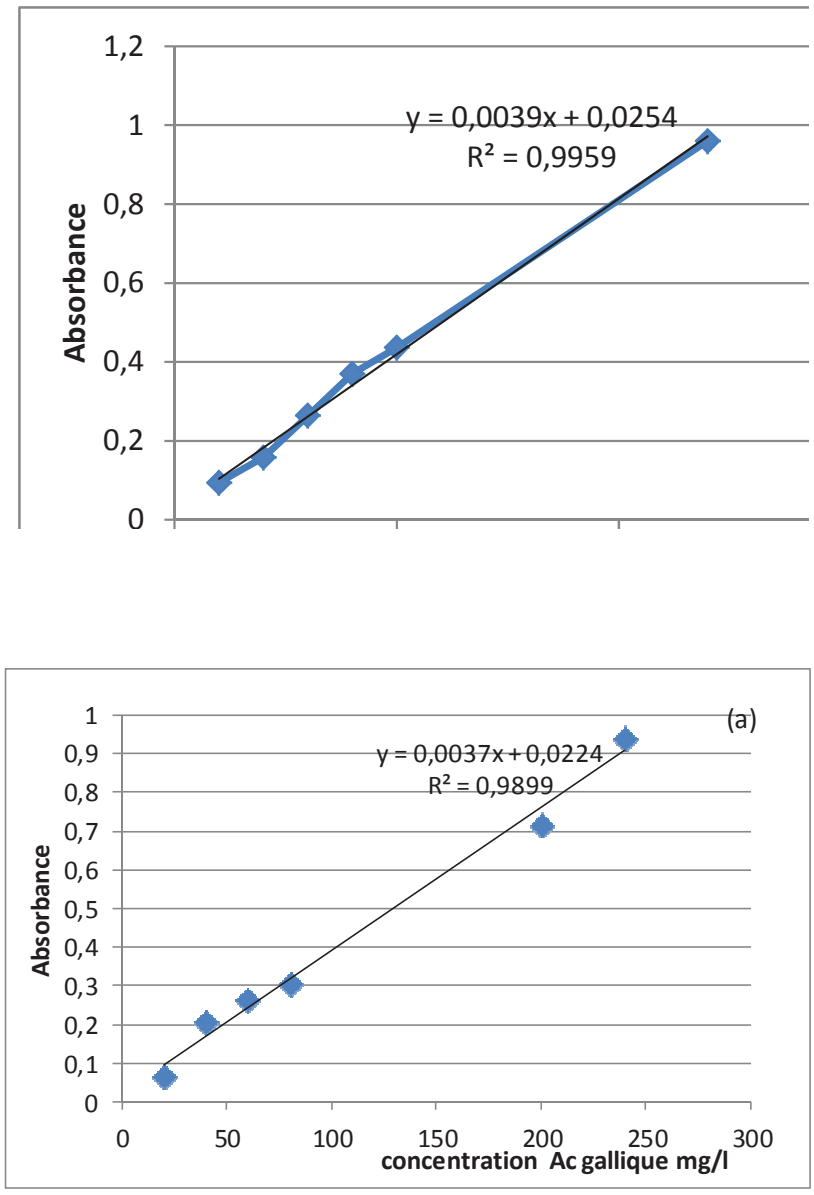


Figure 35 : Courbe d'étalonnage (a) acide gallique (b) catéchine

7.1.1. Extraits bruts de *T. ciliatus*

Les teneurs en polyphénols totaux dans la partie aérienne de *T. ciliatus* étudiées pour les différentes périodes Mars, avril, mai, juin, juillet estimées par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait brut a été rapportée en mg équivalent acide gallique /g de matière sèche (Fig.36). Les résultats indiquent que les teneurs en polyphénols varient significativement selon la période de récolte, la teneur la plus élevée est observée au mois de juin en pleine floraison avec une teneur de 44,22 ±1,13mg EAG/g MS, suivi du mois de mai (42,88±0,85 mg EAG/g MS), tandis que les teneurs les plus basses ont été enregistrées au mois de mars (28,94±0,87 mg EAG/g MS), avril (28,4±1,10 mg EAG/g MS), puis juillet (27,4±0,83 mg EAG/g MS). Ces résultats sont hautement différents avec $p \leq 0{,}001$, on peut les classer en deux groupes présentant un taux élevé en PPT (Mai, Juin), l'autre groupe ayant une teneur plus faible (Mars, Avril, Juillet).

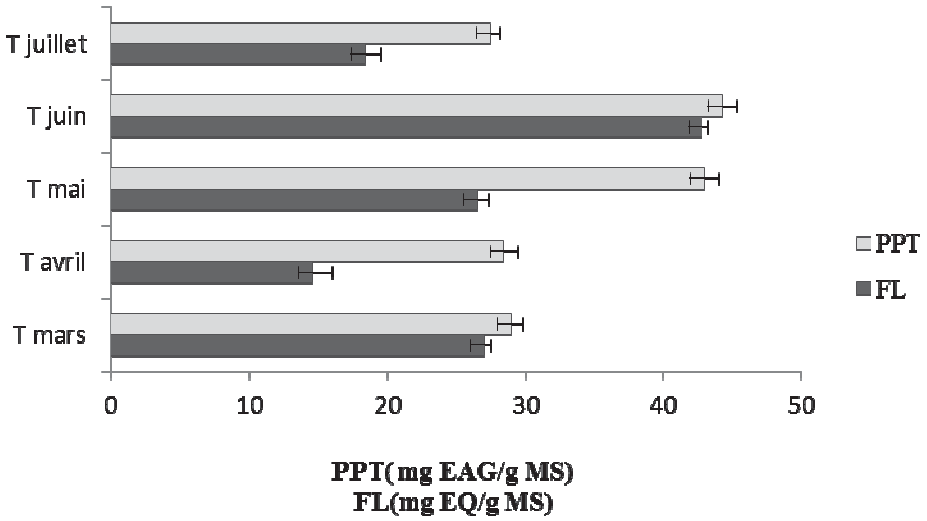


Figure 36 : Teneurs en PPT et Fl de *Thymus ciliatus*

Kholkhal, (2013[b]) ont trouvé dans leur étude de la partie aérienne de *T. ciliatus ssp coloratus* de Tlemcen une concentration en PPT de 606,9mg EAG/g MS, qui est plus élevée que nos résultats. En comparant la teneur en PPT de *T. ciliatus* trouvée dans notre travail avec celles rapportées par d'autres auteurs sur Thymus sp. , nos résultats ont montré des teneurs élevées en PPT que celles décrites par **Boulanouar et *al.* (2013)** dans *T. algeriensis* (18,73±4,59 mg/g MS).

La figure 36 représente les teneurs en flavonoïdes des parties aériennes de *Thymus ciliatus* récoltées aux différents mois : Mars, avril, mai, juin, juillet dans la région de l'Edough - Annaba. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g). Nous remarquons que les teneurs en flavonoïdes totaux sont variables et différentes de celles trouvées par **Kholkhal. (2013[b])** dont la concentration en flavonoïde pour l'extrait brut de *T. ciliatus* est de 62,4 mg EC/g MS.

Les teneurs en flavonoïdes de *T. ciliatus* présentent des différences hautement significatives (P≤0,001), la teneur est maximale en période de floraison le mois de juin 42,77 ±0,41mg EQ/g MS alors qu'elle est minimale au mois d'avril 14,55±1,47 mg EC/g MS, et elle est suivie de manière séquentielle de mois de juillet 18,35±1,25 mg EQ/g MS, mai 26,5 mg± EQ/g MS, et mars 29,97±0,51mg EQ/g MS.
De ce fait nous avons classé les différents mois selon leurs concentrations en Fl : juin >Mars > Mai > juillet> Avril.

D'après plusieurs auteurs *;* La teneur en PPT et Fl n'est pas stable, elle varie d'une plante à une autre et entre les espèces du même genre **(Djeridane et *al.*, 2006 ; Sayout et *al.*, 2015).** Selon l'origine géographique, le stade de développement **(Cosmulescu and Trandafir, 2011 ; Xie et *al.*, 2015),** selon l'organe de la plante **(Dif et *al.*, 2015 ; El Haci et *al.*, 2012),** la variabilité biologique **(Djeridane et *al.*, 2006),** la méthode d'extraction **(Bourgou et *al.*, 2016)** et elle dépend aussi des conditions climatiques **(Atanasova et *al.*, 2009).**

Ces résultats nous ont permis de conclure que la teneur est maximale en période de floraison. Cette teneur élevée en PPT du *T. ciliatus* pourrait contribuer à une meilleure activité antioxydante. En effet, plusieurs rapporteurs ont signalé que l'activité antioxydante de matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques **(Saeed et *al.*, 2012 ; Gonçalves et *al.*, 2013).** les changements observés dans la teneur en PPT à différentes périodes de récolte, sont liés aux changements climatiques, et il semble que l'augmentation de la T°, et l'effet des jours long favorisent l'accumulation des PPT**.** Ceci est en accord avec plusieurs auteurs qui ont observé l'effet des conditions environnementales sur la qualité des principes actifs (PPT) dans plusieurs plantes **(Cosmulescu et *al.*, 2011).**

On note que les PPT des extraits étudiés présentent une bonne corrélation linéaire positive avec les teneurs en flavonoïde avec un coefficient de corrélation R^2=0,611(Fig.37).

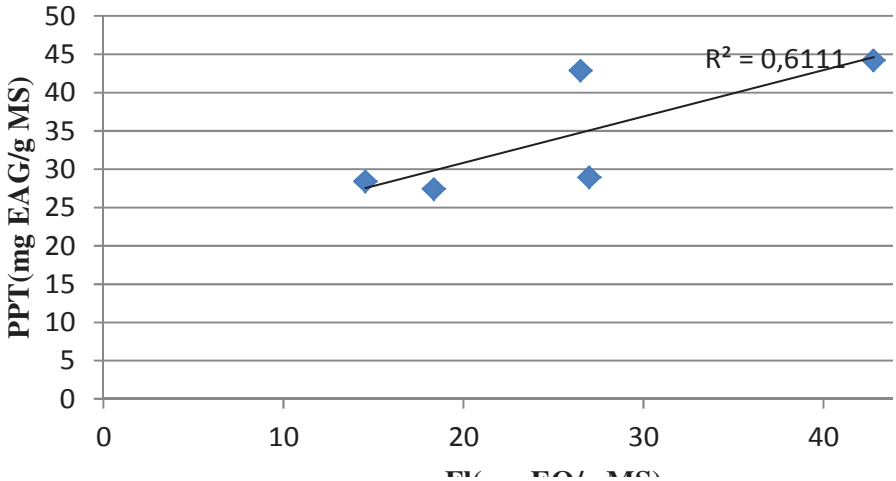


Figure 37 : Corrélation entre les teneurs en PPT et Fl de *T. ciliatus*

7.1.2. Extraits organiques de *T. ciliatus*

Les concentrations moyennes en flavonoïdes totaux obtenues de *T. ciliatus* ont été évaluées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (Fig.35) et sont exprimées en mg équivalent catéchine par cent gramme d'extraits (EQ/100g d'extrait), ainsi que les concentrations moyennes en polyphénols totaux obtenues de *T. ciliatus* ont été évaluées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Fig.35)et sont exprimées par mg équivalent ac gallique par gramme d'extraits (EAG/100g d'extrait)

D'après le tableau 18, les teneurs en polyphénols totaux (PPT) enregistrées en équivalent d'acide gallique en mg par 100g d'extrait présentent des valeurs moyennes très variables, elles varient d'une période à une autres et d'un extrait à un autres, allant de 0,949 à 991,35 EAG/100g d'extrait, on note que les extraits obtenus pendant la floraison montrent les proportions les plus élevées en PPT, et ceci avec les deux méthodes d'extraction utilisées.

En plus, l'extraction par soxhlet a donné de meilleures teneurs enregistrées en PPT comparativement avec celles obtenues par macération. Elles varient de 43,39±12,09 à 991,35 mg EAG/100g d'extrait.

Les teneurs les plus élevées ont été enregistrées pour l'EAqAS (991,35±00 mg EAG/100g d'extrait), et l'EMeOH (75,32±2,83 mg EAG/100g d'extrait), suivi de L'EDCM et l'EHex avec des teneurs respectives de (58,86±1,76 mg EAG/100g d'extrait) et (43,59±12,05 mg EAG/100g d'extrait).

En second, les extraits obtenus par macération ont présenté également des teneurs élevées en PPT, parmi les quatre extraits testés, l'EAqAS a été enregistré comme le plus riche avec une teneur égale à (331,35±14,00 mg EAG/100g d'extrait), suivie de l'EDCM et l'EHex ont présenté (24,36±0,08 EAG/100g d'extrait) et (21,79±0,015 mg EAG/100g d'extrait) respectivement, l'extrait Aqu est de (21,34±1,01 EAG/100g d'extrait), cependant l'EMeOH (19,93±9,04 mg EAG100/g d'extrait).

Parmi les trois périodes de récoltes de *T. ciliatus*, nous avons remarqué que la période végétative est la plus pauvre en PPT dosés dans les différents extraits (Tab.18). On observe des teneurs qui varient de 0,949 à 17,17mg EAG/100g d'extrait, l'extrait le plus riche et le MeOH (17,17±7,95 mg EAG/100g d'extrait), suivi de DCM et Hex avec des teneurs (8,84±0,14 mg EAG/100g d'extrait) et (6,95±0,04 mg EAG/100g d'extrait) respectivement. L'extrait aqueux représente la plus faible valeur en PPT (0,949±0,03 mg EAG/100g d'extrait)

.

Tableau 18 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits de *Thymus ciliatus*

Période	**Extrait**	**Teneur PPT en** mgEAG/100g d'extrait	**TeneurFl** mgEQ/100g d'extrait
Macération			
Avant floraison	Hex	$6.95\pm0,04^{fgh}$	3.65 ± 0.03^{c}
	DCM	$8.84\pm0,14^{efgh}$	2.79 ± 0.03^{c}
	MeOH	$17.17\pm7,95^{efg}$	16.05 ± 0.18^{c}
	Aqu AS	ND	ND
	Aqu	$0,949\pm0,03^{h}$	$0,12\pm0,01^{c}$
Pendant floraison	Hex	$21,79\pm0,15^{ef}$	$9,33\pm0,01^{c}$
	DCM	$24,36\pm0,08^{e}$	$14.45\pm0,22^{c}$
	MeOH	$19,93\pm09,04^{ef}$	$12,34\pm0,02^{c}$
	Aqu AS	$331,35\pm14,00^{b}$	$142,52\pm0,03^{b}$
	Aqu	$21,34\pm1,01^{ef}$	$1,47\pm0,01^{c}$
Après floraison	Hex	$9,86\pm0,11^{efgh}$	$0,83\pm0,04^{c}$
	DCM	$9,66\pm0,05^{efgh}$	$7,49\pm0,11^{c}$
	MeOH	$16,09\pm6,55^{efgh}$	$8,02\pm0,03^{c}$
	Aqu AS	ND	ND
	Aqu	$3,16\pm0,02^{gh}$	$0,08\pm0,04^{c}$
Soxhlet			
Floraison	Hex	$43.49\pm12,09^{d}$	16.99 ± 0.07^{c}
	DCM	$58.86\pm1,79^{d}$	9.32 ± 0.02^{c}
	MeOH	$75.32\pm2,38^{c}$	34.18 ± 0.04^{c}
	Aqu AS	991.35 ± 00^{a}	$632,79\pm0.11^{a}$

Dans chaque colonne ; Les valeurs sont une moyenne de trois essais±SD et portant différentes lettres dans chaque colonne sont significativement différentes ($p < 0,001$) avec le test de Tukey

Concernant la période après floraison (Tab.18), elle présente aussi des teneurs faibles en PPT, elles varient de 3,16 à 16,09 mg EAG/100g d'extrait. L'extrait qui présente la teneur la plus élevée est le MeOH 16,09±6,55 mg EAG/100g d'extrait et la plus basse est l'extrait Aqu 3,16±0,02mg EAG/100g d'extrait. Les extraits Hex et DCM présentent des teneurs de 9,86±0,11 et 9,66±0,005 EAG/100g d'extrait respectivement.

On peut classer la richesse de nos extraits en PPT selon la période de récolte : floraison, après floraison, végétative, tandis que selon les extraits qui présentent les teneurs en PPT les plus élevées et les suivants : AquAS, MeOH, DCM, Hex, Aqu, selon la méthode d'extraction comme suit : soxhlet, macération.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Sarikurkcu et *al.* (2009)**, ils ont démontré que l'AquAS était nettement supérieur en PPT que les extraits : MetOH, DCM, Hex. rapportés dans *Vitex agnus castus* L.
Dans une étude faite sur *T. numidicus* Poiret **(Djeddi et *al.*, 2015).** Ils ont dosé des PPT dans les extraits de dichlorométhane, méthanol et méthanol-eau, et l'infusé, les résultats indiquent que les deux extraits de méthanol et méthanol-eau étaient les échantillons les plus riches en polyphénols avec des teneurs de 513,40 60 mg GAEs/g d'extrait et de 377,40 mg GAEs/g d'extrait, respectivement. Ces résultats sont supérieurs aux nôtres en comparaison avec les extraits de méthanol.

En outre, les teneurs en PPT des extraits Aqu sont faibles pendant les différentes périodes par rapport aux autres extraits, dans la présente étude. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par **(Djeddi et *al.*, 2015).** Ils ont montré que l'infusé aqueux de *T.numidicus* Poiret a présenté la plus faible teneur en PPT par rapport aux extaits : DCM, MeOH, MeOH-eau 5:1 v/v dosés. De même, **Kulšic et ses collaborateurs 2006**, ont démontré que l'infusé aqueux préparée à partir d'herbe de *Thymus vulgaris L. et Thymus serpyllum L.* sont moins riche en polyphénols totaux. Toutefois, les travaux de **Köksal et *al.* (2016),** ont trouvé des teneurs élevées en PPT dans le décocté aqueux préparée des feuilles de *Thymus vulgaris* par rapport à l'extrait de l'éthanol, cela peut être expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules, facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules **(Albano et Miguel, 2011).**

Le tableau 18 représente les teneurs en flavonoïdes totaux (Fl) exprimée par mg EQ/100g de la partie aérienne de *Thymus ciliatus* récoltée aux différentes périodes dans la région de l'Edough -Annaba. Nous remarquons que les teneurs en flavonoïdes totaux sont variables et varient entre 0,12 à 632,79mg EQ/100g.

Les extraits obtenus pendant la période de floraison de la partie aérienne de *T. ciliatus* présentent des teneurs les plus élevées dans l'intervalle de 9,32±0,02 à 632,79mg EQ/100g obtenus par soxhlet, suivi des extraits obtenus par macération, avec des teneurs qui varient de 1,47±0.01 à 142,52±0,03 mg EQ/100g. En second les extraits obtenus pendant la période végétative de *T. ciliatus* ont enregistré des teneurs de 0,08±0,01 à 16,05±0,18 mg EQ/100g, et en dernier les extraits obtenus pendant la phase après floraison du cycle du développement de *T. ciliatus*, semble être moins riche en Fl avec des teneurs enregistrées de 0,1±0,04 à 8,01±0,04 mg EQ/100g.

Les extraits qui ont donné des teneurs élevées en Fl pour chaque période sont ; l'EAqu AS avec les deux méthodes d'extraction soxhlet (632,79±0,11mg EQ/100g) et macération (142,52mg ±0,03EQ/100g), suivi des extraits MeOH obtenus pendant le stade végétatif (16,05mg EQ/100g) et floraison (12,34mg EQ/100g) puis celui obtenu pendant le stade après floraison (8,01mg EQ/100g).

les extraits DCM dosés ont montré des teneurs en Fl variables selon le stade de développement de la plante allant de 2,80 à 14,45mg EQ/100g, la teneur la plus élevée a été observée pendant la floraison (14,45±0,22mg EQ/100g) et la plus basse en période végétative (2,79±0,03 EQ/100g), cependant l'extrait hexanique a montré presque absence des Fl ; on a enregistré des valeurs qui varient de 0,83 à 16,99mg EQ/100g, et la teneur la plus élevée a été observée dans l'extraits obtenus pendant la floraison.

Le classement des extraits selon leurs concentrations Fl est le suivant : Aqu AS, MeOH, DCM, Hex, Aqu.

Il ressort de ces résultats que la quantification des PPT et Fl a été influencée par : le stade de croissance de la plante, dans notre cas la période de floraison, également l'effet du solvant d'extraction (EAqS) ainsi que la méthode d'extraction (Soxhlet) Donc, on peut conclure à partir de ces résultats que les extraits polaires avaient plus de composés phénoliques que les extraits apolaires, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Ben El Hadj Ali et *al.* (2014)** pour une autre espèce du même genre *Thymus numidicus* Poir., et pour une autre espèce de la même famille *Marrubium deserti* de Noé **(Ghedadba et *al.*, 2015).**

Selon une étude menée par **Benmeziane et *al.* (2014)** sur l'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques des grappes de *Vitis vinifera,* ils ont démontré que la nature du solvant, le temps et la température d'extraction ont un effet significatif sur le taux des PPT et Fl. Les résultats ont révélé que le méthanol était de meilleur solvant que les autres (Hex, DCM, Aqu) dans l'extraction des polyphénols, des flavonoïdes, en raison de leur polarité et une bonne solubilité pour les composants phénoliques du matériel végétal.

Plusieurs auteurs rapportent que la solubilité des composés phénoliques est influencée par le solvant utilisé et par le procédé d'extraction **(Ben El Hadj Ali et *al.*, 2014 ; Al Jadidi et *al.*, 2015 ; Djeddi et *al.*, 2015).** En plus, la polarité du solvant jouera un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques **(Naczk et Shahidi, 2006).**

En outre, la détermination de la teneur en phénols totaux et flavonoïdes totaux donne une idée sur le potentiel antioxydant des extraits. La plupart des études expliquent la variation du potentiel antioxydant en fonction des solvants d'extraction selon leur polarité (**Tepe et *al.*, 2005[b]** ; **Tamert et Latreche, 2015).**

8. Activité antibactérienne

L'aspect qualitatif de l'activité antibactérienne de l'HE sur les souches étudiées à été déterminé par la méthode de diffusion des disques en milieu solide MH similaire à l'antibiogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques (halo).

8.1. Aromatogramme de l'Huile Essentielle de *P. helepensis*

La lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque disque. La présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits testés. Selon une échelle de notation symbolique allant de – à +++ et dont la lecture d'après **Meena et Sethi, (1994)** se fait comme suit :

- Ø < 10 mm : huile essentielle (HE) sans action inhibitrice (-)
- 16 > Ø ≥ 10 mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire (+)
- 25 > Ø ≥16 mm : HE à une action inhibitrice importante (++)
- Ø≥25 mm : HE à une action inhibitrice très efficace (+++)

Tableau 19 : Activité inhibitrice de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. et anti biotique pour les trois souches bactériennes.

Souches	HEm	HEm'	HEm''	HEz	HEz'	HEz''	antibiotiques		
							PIP	CAZ	OXA
E. coli	-	-	+	+	-	+	nd	nd	R
P. aeruginosa	+	+	+	-	-	-	S	R	nd
S. aureus	+	+	+	+	+	-	R	R	nd

HE: huile essentielle brute; HE': HE diluée à ½ (v/v); HE'': CAZ: ceftazidine ; PIP :pipéracilline OXA :oxacilline ; R :résistante ;S :sensible HE diluée à ¼ (v/v); m:lac Mellah; z: Zaarouria ; nd : non déterminée

L'évaluation *In vitro* de l'activité antibactérienne, des huiles essentielles testées, est effectuée par la méthode de disques. La mesure en millimètre, du diamètre des zones d'inhibition des cultures, permet d'évaluer l'efficacité ou non de l'huile essentielle sur les germes testés. D'une manière générale, les huiles essentielles testées ont exercé une activité antibactérienne plus accrue que celle enregistrée en présence des antibiotiques testés.

A travers nos résultats (Tab.19), l'huile essentielle brute des aiguilles de pin du lac Mellah a montré un effet inhibiteur contre les souches testées. Cet effet est similaire à celui provoqué par l'HE des aiguilles provenant de Zaarouria. La souche *S. aureus*, Gram(+), est plus sensible qu'*E. coli* et *P. aeruginosa*, Gram(-), sous l'action des extraits testés. Plusieurs travaux ont rapporté que les bactéries Gram(+) sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram(-) **(Xianfei et *al.*, 2007).**

8.2. Aromatogramme de l'HE de *T. ciliatus*

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* de Ain Barber (Seraidi-Annaba) a été effectuée par la méthode de diffusion en milieu solide (aromatogramme), qui est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm autour du disque, afin de vérifier si l'HE testée présente un effet sur la croissance bactérienne, la quantité des HEs brutes déposée sur les disques est de 6 µl. Les souches bactériennes étudiées proviennent du laboratoire de l'Hôpital Ibn Rochd.

Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *T. ciliatus* à différents stades de croissance sont regroupés dans le tableau 20 (Annexe2). D'après les valeurs enregistrées, toutes les souches bactériennes testées ont montré une sensibilité à l'HE qui varie significativement ($p<0,005$).

En effet, la variation de l'activité antibactérienne en terme de diamètre d'inhibition est en fonction de l'HE (selon la période de récolte) et en fonction de la souche bactérienne.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition qu'exprimait l'HE avant floraison de *Thymus ciliatus* donnait des valeurs moyennes extrêmes de 28 à 61,6 mm. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus aureus*(3) (61,6 mm), et le plus petit

avec *Staphylococcus aureus*(1) (28 mm). L'activité antibactérienne de l'HE avant floraison est plus importante contre *Staphylococcus aureus*(3) (61,6 mm), *Staphylococcus aureus ATCC25923* (58,3 mm) et *Escherichia coli* (51,6 mm) suivi de *Proteus mirabilis* (47 mm).

Les résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles début floraison sont représentés dans le tableau 20. La mesure des diamètres des halos d'inhibition qu'exprimait l'HE de *Thymus ciliatus* donnait des valeurs moyennes qui varient significativement ($p<0,0001$) de (07 mm) à (50,8 mm). Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus aureus*(4) (50,8 mm), et le plus petit avec *Proteus mirabilis* (07 mm). On note une activité très efficace contre *Staphylococcus aureus* (4), (3) et (2) ainsi que *Klebsiella oxytoca* avec des zones d'inhibition de (50,8 mm), (46 mm), (43 mm) et (45,6 mm) respectivement, par contre elle est moindre contre les autres souches *Klebsiella pneumoniae ATCC700603* (24,5 mm) suivi de *Pseudomonas aeruginosa ATCC27853* (12,2 mm).

Concernant l'HE après floraison, les résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne sont consignés dans le tableau 20. L'étude a révélé une grande sensibilité des souches vis-à-vis de l'HE (après floraison), et les plus sensibles sont *Staphylococcus aureus*(1), *Staphylococcus aureus*(4) et *Klebsiella oxytoca* avec des diamètres des zones d'inhibition (66,3 mm), (68 mm) et (65,3 mm) respectivement. On constate que le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus aureus*(4) (68 mm) et le plus petit avec *Pseudomonas aeruginosa ATTC27853* (16,8 mm).

Tableau 20 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de *Thymus ciliatus*

Nom de la souche	Diamètre des zones d'inhibition en mm			Antibiotique	
	HEAvF	HEF	HEApF	GEN	OFX
Gram(-)					
K. oxytoca	46,1±0,3^{ab}	45,6±2,69^{a}	65,3±0,50^{a}	ND	10±1,41^{bc}
C. freundii	30±0,70^{ab}	28±0,76^{abc}	24,8±0,17^{bc}	00±00^{e}	00±00^{c}
P. mirabilis	47±1,07^{ab}	07±0,17^{c}	55±1,52^{ab}	ND	00±00^{c}
E. coli ATCC25922	51,6±1,71^{ab}	34,7±0,98^{abc}	55,1±1,68^{ab}	14,5±0,70^{c}	10±00^{bc}
P. aeruginosa ATCC27853	29±0,45^{b}	12,2±0,15^{bc}	16,8±0,99^{c}	00±00^{e}	17,35±1.34^{b}
K. pneumoniae ATCC700603	39±0,28^{ab}	24,5±0,48^{abc}	51±0,51^{ab}	9,50±0,70^{d}	20,3±0,42^{b}
Gram(+)					
S. aureus (1)	28±0,61^{b}	27,7±0,83^{abc}	66,3±1,26^{a}	10,00±00^{d}	19,4±0,28^{b}
S. aureus (2)	49,3±0,77^{ab}	43±00^{a}	61,1±1,78^{a}	18,00±1,41^{b}	23,35±0,35^{b}
S. aureus(3)	61,6±0,14^{a}	46±00^{a}	56,3±0,43^{ab}	00±00^{e}	20,00±00^{b}
S. aureus(4)	51,5±1,02^{ab}	50,8±1,43^{a}	68±0,75^{a}	19,05±0,24^{b}	23,60±0,14^{b}
S. aureus(5)	30,7±1,89^{ab}	24,5±1,13^{abc}	55±1,52^{ab}	00±00^{e}	00±00^{c}
S. aureus ATCC25923	58,3±0,76^{ab}	37,5±00^{ab}	64,6±0,62^{a}	23,00±1,69^{a}	30,90±12,7^{a}

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de trois essais±SD et Les valeurs marquées par lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,001$) avec le test de Tukey (HE2, 3) et($p < 0,005$) avec le test de Tukey (HE1) ; ND : Non déterminée ; AvF : avant floraison ; AF: Après floraison ; F : pendant floraison ; GEN :Gentamicine ; OFX :Ofloxacine ; nd : non déterminée.

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. ciliatus* a démontré que l'HE après floraison est la plus efficace par rapport aux autres HEs testées, nos résultats rejoignent ceux de **Marino et *al.* (1999),** qui attestent que les HEs obtenues à partir des plantes récoltées pendant ou après floraison possèdent la plus forte activité antibactérienne.

Bounatirou et *al.* (2007), ont montré également que le stade de développement de la plante pourrait avoir un effet sur son activité antibactérienne, lors d'une étude menée sur l'HE de *T. capitatus*. Après avoir été modeste au stade végétatif, l'activité antibactérienne de l'espèce a été remarquablement forte après floraison.

Les trois HEs testées ont présenté un large spectre d'action agissant aussi bien sur les bactéries à Gram(+) que sur les bactéries à Gram(-), en plus les zones d'inhibition sont supérieures que celles obtenues avec la gentamicine et l'ofloxacine (Tab.20).

Dans cette étude on constate que les souches Gram(-) apparaissent plus résistantes que les Gram(+) *vis-à-vis* des HEs testées. Cette constatation est en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté comme étant que de nombreuses HEs exercent *in vitro*, des effets négatifs sur la croissance des bactéries, elle est plus importante sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif **(Okoh et *al.*, 2010 ; Illic et *al.*, 2014 ; Cimanga et *al.*, 2002).**

L'ensemble des résultats montre que les HEs testées sont très actives vis-à-vis des souches bactériennes testées**,** donnant des diamètres d'inhibition nettement supérieurs à 20mm (**Rota et *al.*, 2008**), le grand pouvoir bioactif observé des HEs étudiées est attribué principalement à leur composition chimique et particulièrement à leurs teneurs élevées en phénols terpéniques (thymol et carvacrol), HEAvF (33,39-24,16%), HEF(29,52-30,85%), HEApF(21,02-31,37%).

D'une façon générale, l'activité antimicrobienne des HEs selon leur constituant majoritaire a été classée par plusieurs auteurs dans l'ordre décroissant suivant : phénol > alcools > aldhéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > ésters **(Boukhebti et *al.*, 2011 ; Gabriel et *al.*, 2013).**

Plusieurs travaux ont montré que les HEs de différentes espèces de thym riche en composés phénoliques, ont un large spectre d'inhibition *vis-à-vis* des bactéries Gram(+) et Gram(-) **(Illic et *al.*, 2014 ; Burt, 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Giordani et *al.*, 2008).** D'ailleurs les composés phénoliques possèdent le plus large spectre d'activité antibactérienne et pourraient être des agents bactériostatiques ou bactéricides en foncions de leur concentration utilisée **(Dorman et Deans, 2000),** leur effet est lié à leur groupement hydroxyle libre qui permet une bonne solubilisation dans le milieu, leur mécanisme d'action serait lié a leur caractère hydrophobe avec un système d'électrons délocalisés de leur structure moléculaire **(Ben Arfa et *al.*, 2006)** et plus spécifiquement ces composés agissent sur la perméabilité membranaire **(Lambert, 2001)**.

Le thymol et le carvacrol font partie des terpènes les plus efficaces contre les bactéries, surtout les bactéries pathogènes **(Lee et *al.*, 2004)**, selon l'étude de **Ultee, (2000).** Le thymol peut causer des perturbations de la membrane cytoplasmique des bactéries (la pompe à proton), et il induit une coagulation du cytoplasme **(Bakkali et *al.*, 2006),** une fuite des ions et des autres constituants de la cellule a été mise en évidence en présence de thymol **(Tassou et *al.*, 2000) ;** il peut aussi inhiber les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ATP.

D'ailleurs, le carvacrol également (comme le thymol) cause des dommages au niveau de la structure et fonction de la membrane cytoplasmique en augmentant sa perméabilité **(Ben Arfa et *al.*, 2006)**, De plus, sur les bactéries à Gram(-), le carvacrol et le thymol pourraient aussi entrainer une désintégration de la membrane externe et un relargage des matériaux de cette membrane (lipopolysaccharide LPS, protéines, lipides) **(Helander et *al.*, 1998).** Il a été aussi démontré que le carvacrol inhibe la formation des flagelles chez Escherichia coli **(Hyldgaard et *al.*, 2012).** Cependant la position relative du groupement hydroxyle sur le noyau phénolique ne semble pas influer fortement sur le degré d'activité du thymol et carvacrol **(Xu et *al.*, 2008),** sachant qu' il a été démontré que ces derniers agissent différemment contre des espèces Gram(+) et Gram(-) **(Goetz et Ghedira, 2012 ; Burt, 2004; Dorman et Deans, 2000).**

Les valeurs exprimées des trois HEs étudiées indiquaient une bonne activité anti-*Pseudomonas*. Cette action antibactérienne serait attribuée aux dérivés phénoliques qui les caractérisent (carvacrol et thymol). Ces derniers peuvent déstabiliser la membrane cytoplasmique interférant ainsi avec le métabolisme énergétique et l'intégrité cellulaire **(Goetz et Ghedira, 2012)** en augmentant la perméabilité membranaire, induisant le collapse du potentiel membranaire et en inhibant l'activité respiratoire conduisant ainsi à une perte de la viabilité cellulaire **(Bouhdid et *al*., 2012).**

8.3. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'HE de *T. ciliatus*.

La méthode de macro-dilution en milieu liquide est réalisée pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en exposant les souches à diverses concentrations d'HEs. Les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec l'aromatogramme **(Xianfei et *al*., 2007 ; Sandri et *al*., 2007 ; Aouni et *al*., 2013),** cependant les huiles essentielles qui présentaient de grandes zones d'inhibition pour une bactérie donnée ont montré la plus faible valeur de CMI (Tab.21), sachant que la CMI correspond à la première dilution où la croissance est négative (pas de culture visible) par évaluation macroscopique (**Al-Reza et *al*., 2010).**

Tableau 21 : Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) de l'HE de *T. ciliatus*

Nom de la souche	**CMI mg /ml**		
	HEAvF	**HEF**	**HEApF**
***Gram*(-)**			
Klebsiella oxytoca	**1,25**	**2,5**	**1,25**
Citrobacter freundii	**2,5**	**2,5**	**2,5**
Proteus mirabilis	**1,25**	**2,5**	**0,623**
Escherichia coli ATTC25922	**1,25**	**1,25**	**0,3**
Pseudomonas aeruginosa ATTC27853	**>5**	**>5**	**>5**
Klebsiella pneumoniae ATTC700603	**1,25**	**2,5**	**1,25**
***Gram*(+)**			
Staphylococcus aureus (1)	**2,5**	**2,5**	**2,5**
Staphylococcus aureus (2)	**ND**	**1,25**	**ND**
Staphylococcus aureus(3)	**ND**	**1,25**	**ND**
Staphylococcus aureus(4)	**2,5**	**2,5**	**1,25**
Staphylococcus aureus(5)	**1,25**	**2,5**	**1,25**
Staphylococcus aureus ATTC25923	**0,635**	**1,25**	**0,3**

Les valeurs représentent la moyenne écart type (n=2), ND : Non déterminée ; AvF : avant floraison ; ApF: Après floraison ; F : pendant floraison

Le tableau 21 montre que l'HE avant floraison a inhibé la croissance bactérienne de toutes les souches testées sauf *Pseudomonas aeruginosa ATTC27853* qui s'est montré résistante, les valeurs moyennes de CMI obtenues varient entre 0,635 et 2,5 mg /ml, la valeur de la CMI la plus élevée a été observée avec *Citrobacter freundii et Staphylococcus aureus*(1) et la plus faible donc meilleure activité avec *Staphylococcus aureus ATTC25923.*

L'HE pendant floraison a manifesté un effet inhibiteur, dont les valeurs de la CMI varient entre 1,25 et 2,5 mg /ml vis-à-vis des souches testées sauf *P. aeruginosa* (Tab.14). La plus faible valeur 1,25 mg/ ml a été observée chez *S. aureus ATTC25923, S. aureus(2), S. aureus(3), E. coli ATTC25922,* la valeur 2,5 mg /ml a été enregistrée chez *S. aureus(1), (4) (5) et P. mirabilis. K. pneumoniae ATTC700603 ; K. oxytoca.*

Staphylococcus aureus ATTC25923 s'est montré le plus sensible, dont la croissance a été inhibée à partir de la concentration de 0,3 mg/ml, suivi de *Proteus mirabilis* avec une CMI de 0,625 mg/ml et ce vis-à-vis d'HE après floraison, d'autres valeurs plus élevées ont été enregistrées avec une CMI de 1,25 mg/ml chez *E. coli ATTC25922, K. oxytoca, K. pneumoniae ATTC700603, Staphylococcus aureus,* tandis que la CMI de 2,5 mg/ml a été enregistrée chez *S. aureus(1), (4), C. freundii, P. mirabilis* , on note une résistance de *P. aeruginosa* vis-à-vis de HE après floraison(Tab.21)

Les résultats obtenus montrent que les HEs de *T. ciliatus* ont exercé une importante activité inhibitrice *vis-à-vis* des bactéries testées, sauf pour *Pseudomonas aeruginosa ATTC27853,* s'est révélé plus résistante ; En effet, La résistance de *P. aeruginosa* a été signalée dans plusieurs recherches **(Viljoen et *al.*, 2003 ; Kouch et *al.*, 2014 ; Ghedira et Goetz, 2012).** En plus, cette bactérie a une capacité à former un biofilm, une organisation complexe composée de différentes couches, dans laquelle les bactéries se trouvent dans des conditions physiologiques spécifiques à leur situation **(Randrianarivelo et *al.*, 2009).**

.

Plusieurs travaux ont rapporté que les bactéries Gram(+) sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram(-) (**Wan et *al.*, 1998 ; Benchabane et *al.*, 2015 ; Kheyar et *al.*, 2014; Sadou et *al.*, 2015).** La résistance élevée des bactéries Gram(-) est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à leur revêtement lipo-polysaccharide. L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram(+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique **(Okoh et *al.*, 2010).**

Les souches bactériennes testées et la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne peuvent également être la cause de divergences dans les résultats **(Hammer et *al.*, 1999).**

Une interprétation plus précise a été apportée par **Sartoratto et *al.* (2004)**, selon eux l'extrait étudié possèderait une forte inhibition si sa CMI est inférieure à 0,5 mg/ml, elle serait modérée si elle est comprise entre 0,6 et 1,5 mg/ml et enfin faible si elle est supérieure à 1,6 mg/ml. Dans notre cas, l'HEApF a présenté l'activité inhibitrice la plus

élevée en comparaison avec toutes les HEs testées, on dénote une forte inhibition vis-à-vis de deux souches de référence *E. coli ATTC25922 et Staphylococcus aureus ATTC25923* (Tab.21). Néanmoins leur effet n'exercent qu'une activité faible a modérée sur les autres souches.

L'effet inhibiteur et l'activité antibactérienne de l'HE de *T. ciliatus* de la région de Annaba a chémotype (thymol /carvacrol, 57,66/16,19%), plus précisément de Berahel a été également testée contre des souches *P. aeruginosa* résistantes carbapénène, la CMI obtenue est de (1,78 mg/ml) **(Amrouni et *al.*, 2014)** , dans la même étude d'autres souches de références ont été testées *P. aeruginosa ATCC27853* (1,83 mg/ml) , *E. coli ATCC25922* (0,46 mg / ml) et *S. aureus* ATCC29213 (0,23 mg/ml). Ces valeurs de CMI sont inférieures à nos résultats, tandis que les diamètres des zones d'inhibition obtenus n'ont pas dépassé 37,5 mm. Ils sont inférieurs aux nôtres.

Bekhechi et *al.* (2007) ont testé l'HE de *T. ciliatus* à chémotype carvacrol (72,4-80,3%) de huit provenances de Tlemcen et ils ont trouvé un très fort pouvoir inhibiteur contre des bactéries pathogènes, dont les CMI sont comprises entre (920-1000µg/ml), tandis que inactive contre *P. aeruginosa* ATCC27853.

Ghorab et *al.* (2013) ont étudié le pouvoir antibactérien des HEs de *T. ciliatus* à chémotype (thymol, 54,58%) sur plusieurs souches notamment *Staphylococcus aureus ATCC43300 , P. aeruginosa ATCC27853 , P. mirabilis, E. coli ATCC25922, K . oxytoca, K. pneumoniae, S. aureus, E. aerogenes, P. mirabilis.* Ils ont trouvé des zones d'inhibition comprises entre 17 et 20 mm, ces valeurs ne dépassent pas celles trouvées dans notre étude (12,2- 68mm), cependant la croissance bactérienne a été inhibée dans une gamme de concentration 10,8 à 27 µg/ml .

Par ailleurs ; l'HE de *T. ciliatus* du Maroc à chémotype (thymol, 44,2%) a également été étudiée pour son action sur quatre bactéries par **Amarti et *al.* (2010)**. L'HE a été très efficace contre les souches testées, une sensibilité plus importante vis-à-vis de S. *aureus, B. subtilis* que *E. coli, M. luteus* avec des CMI de 1/5000 et 1/3000 v/v respectivement.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'**Illic et ses collaborateurs (2014)** , qui ont déterminé la CMI de l'HE de *T. glabrescens* à chémotype (géraniol/thymol, 23,33/13,79%) sur 13 souches bactériennes notamment : *Staphylococcus aureus* ATCC29213(2508,4µg/ml), *P. aeruginosa ATCC27853* (5016,8 µg/ml), *E. coli ATCC25922* (2508,4µg/ml), *K. pneumoniae ATTC700603* (5016,8 µg/ml) et également avec composé isolé (thymol) contre *Staphylococcus aureus ATCC29213* (780,8µg/ml), *P. aeruginosa ATCC27853* (3123,2 µg/ml), *E. coli ATCC25922* (2508,4µg/ml), *K. pneumoniae* (1561,6 µg/ml). Ces valeurs sont élevées par rapport aux valeurs enregistrées dans l'activité antibactérienne de l'HE (thymol/carvacrol) dans notre étude. On constate que nos résultats corroborent à ceux d'autres recherches qui ont montré que l'activité antibactérienne de l'HE de thym est supérieure à celle de son composé majoritaire thymol testé séparément.

Dans la même étude menée par **Illic et *al.* (2014),** ils ont rapporté que l'activité de l'HE de *T. glabrescens* associe avec un antibiotique chloramphénicol et thymol/ chloramphénicol ont montré un effet synergique, avec diminution de la CMI par rapport chloramphénicol seul de 5 à 10 fois sur toutes les souches testées sauf *S. aureus*.
Par ailleurs, l'activité antibactérienne de nos HEs peut aussi, être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles. Les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires. Ceci est confirmé par plusieurs études **(Burt, 2004 ; Randrianarivelo et *al.,* 2009).**

Lambert et *al.* (2001) ont démontré que l'action de thymol/ carvacrol ne présente aucune synergie ni antagonisme (composant majoritaire d'origan) sur la membrane bactérienne. Les composes mineurs favorisent le transport des composant majeurs pour fixation sur les parois et membranes cellulaires, ou d'aider à la distribution cellulaire créant ainsi un effet synergique. Étant donné que les composants mineurs jouent également un rôle critique dans l'activité antibactérienne **(Bekkali et *al.*, 2008 ; Rota et *al.*, 2008).** Effectivement, des études ont démontré qu'il existe un effet de synergie entre le carvacrol et son précurseur, le p-cymène, lorsqu'il est testé seul. Il exerce une faible activité

antibactérienne ; mais il entraîne une expansion de la membrane plasmique plus que le carvacrol. Il facilite, par conséquent, au carvacrol l'entrée dans la cellule bactérienne (**Ultee et *al*., 2000).**

On conclut que la variation de la composition chimique entre les échantillons de l'HE est suffisante pour être à l'origine de la variabilité dans le degré de sensibilité des bactéries Gram(+) et (-) testées. Ceci s'explique par le fait que les constituants des HEs présentent différents degrés d'activité. Il est connu que la composition chimique de l'HE d'une espèce peut varier selon l'origine géographique et la période de récolte…etc

Nos résultats sont difficilement comparables avec ceux de la bibliographie étant donné que les méthodes utilisées sont différentes. Ceci limite la comparaison entre les études et pourrait conduire à la duplication des travaux **(Burt, 2004).**

L'activité antibactérienne des HEs du genre thymus a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, dont plusieurs ont noté la forte activité de ces HEs **(Nabavi et *al*., 2015 ; Rota et *al*., 2008)**, nos résultats confirment ces notations.

8.4. Concentration Minimal Bactéricide (CMB) de l'HE de *T. ciliatus*

L'inoculation sur milieu gélosé est nécessaire pour déterminer la nature de l'activité antimicrobienne (bactéricide ou bactériostatique), les suspensions de cellules (0,1 ml) à partir des tubes ne présentant pas de croissance, puis ont été repiquées sur gélose afin de déterminer si l'inhibition est réversible ou permanente. La CMB a été déterminée comme la dilution la plus élevée (concentration la plus faible) pour laquelle il n'y a pas de croissance qui est produite sur de gélose **(Randrianarivelo et *al*., 2009),** les CMB des HEs de *T. ciliatus* testées sont présentées dans le tableau 22 Bien que les résultats des CMI et CMB sont variés entre les organismes, dans la plupart des cas la CMI était équivalente à la CMB, ce qui indique une action bactéricide des HEs testées.

Les HEs ont présenté des CMB moyennes entre 0,6 et 5mg/ml sauf pour *P. aeruginosa* qui s'est montré plus résistante. L'HE avant floraison a montré un effet bactéricide, dont les valeurs de la CMB varient entre 1,25 à 5 mg/ml vis-à-vis des souches testées sauf *P. aeruginosa* (Tab.22). La plus faible valeur 1,25 mg/ml a été observée chez *Klebsiella*

pneumoniae ATTC700603, Escherichia coli ATTC25922 et *Klebsiella oxytoca* pour l'HEAvF**.** L'HE pendant floraison a également manifesté un effet bactéricide, dont les valeurs de la CMB varient entre 1,25 à 5 mg/ml vis-à-vis des souches testées, sauf *P. aeruginosa* (Tab.15). La plus faible valeur 1,25 mg/ml a été observée chez *S. aureus ATTC25923.* Cependant, l'HE après floraison a manifesté un effet bactéricide plus important, dont les valeurs varient entre 0,6 à 2,5 mg/ml vis-à-vis des souches testées sauf *P. aeruginosa aureus. ATTC25922,* La plus faible valeur 0,6 mg/ml a été observée chez *Escherichia coli ATTC25922.*

Tableau 22: Concentration Minimal Bactéricide (CMB) de l'HE de *T. ciliatus*

Nom de la souche	**CMB mg /ml**		
	HEAvF	**HEF**	**HEApF**
***Gram*(-)**			
Klebsiella oxytoca	**1,25**	**2,5**	**1,25**
Citrobacter freundii	**5**	**2,5**	**1,25**
Proteus mirabilis	**2,5**	**>5**	**1,25**
Escherichia coli ATTC25922	**1,25**	**2,5**	**0,6**
Pseudomonas aeruginosa ATTC27853	**>5**	**>5**	**>5**
Klebsiella pneumoniae ATTC700603	**1,25**	**5**	**1,25**
***Gram*(+)**			
Staphylococcus aureus (1)	**5**	**2,5**	**2,5**
Staphylococcus aureus (2)	**ND**	**2,5**	**ND**
Staphylococcus aureus(3)	**ND**	**5**	**ND**
Staphylococcus aureus(4)	**2,5**	**5**	**5**
Staphylococcus aureus(5)	**2,5**	**5**	**1,25**
Staphylococcus aureus ATTC25923	**2,5**	**1,25**	**2,5**

ND : Non déterminée ; AvF : avant floraison ; ApF: Après floraison ; F : pendant floraison

Il existe deux profils d'activité antimicrobienne, une activité dite létale avec un effet bactéricide et une activité d'inhibition de la croissance avec un effet bactériostatique. De plus en plus d'études montrent que les HEs possèdent, outre un effet bactériostatique qui est généralement admis, un effet bactéricide en particulier en raison de certains de leurs composés (**Aouni et *al.*, 2013**). L'étude de l'effet bactéricide des HEs est intéressante pour lutter contre la faculté des micro-organismes à développer une biorésistance ou une multi résistance vis-à-vis des agents classiquement utilisés. En effet, la richesse des HEs en plusieurs composés biochimiques actifs leur confère un large spectre d'effet antimicrobien et limite ainsi le risque de résistance des souches en raison de la synergie des composés actifs encore majorée par l'association de plusieurs HEs (**Bouhdid et *al.*, 2012**). Ainsi, la diversité des composés actifs à pouvoir antimicrobien au niveau d'une HE rend la résistance difficile, voire impossible puisque les souches microbiennes ne peuvent pas développer des mutations conduisant à des résistances simultanées vis-à-vis de toutes les molécules bioactives.

8.5. Extraits organiques de *T. ciliatus*

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits de *Thymus ciliatus* par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits, les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits sont rapportés dans le tableau 23

Tableau 23 : Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de *T. ciliatus* ssp. c*oloratus* (mm)

Nom des souches	**EAvF**			**EF**					**EApF**		
	Hex	Dich	MeOH	Hex	Dich	MeOH	AQS	AQ	Hex	Dich	MeOH
Klebsiella oxytoca	ND	ND	ND	-	7±0,1	12±0,3	8±00	ND	ND	ND	ND
Escherichia coli ATTC25922	-	-	8±00	9±0,1	-	-	7±00	9,5±0,70	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATTC27853	-	-	9±0,11	11±0,3	-	-	-	-	11±0,28	10±1,64	-
Klebsiella pneumoniae ATTC700603	-	-	-	-	-	7±05	-	8,66±2,88	-	-	-
Staphylococcus aureus ATTC25923	-	8±0,05	-	9±0,64	8±1,68	8±1,73	7±0,57	10±00	-	8±0,15	7±0,16

Tous les valeurs sont la moyenne de trois essais, - : absence de zone d'inhibition ; ND : non déterminé ; EAvF : extrait avant floraison ; EF :extrait pendant florison ; EApF : extrait après floraison ; Hex : extrait hexanique ; Dich :Dichlorométhanolique ; Meoh : Méthanolique ; AGS :aqueux après solvants ; AQ :extrait aqueux

Selon les résultats obtenus, les extraits de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis des germes testés.

Les extraits testés ont présenté un large spectre d'action, agissent aussi bien sur les Gram(-) que sur les Gram(+), les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 7 et 12 mm, et la zone d'inhibition la plus élevée a été enregistrée avec l'extrait méthanolique obtenu pendant la floraison.

La souche *S. aureus* montre une sensibilité *vis-à-vis* des extraits testés, dont les diamètres d'inhibition varient de 7 à 9mm, le diamètre le plus élevé a été enregistré avec EHex obtenu pendant la floraison, nos résultats sont en accord avec ceux de **Abu-Shanab et *al.* (2004**), ils ont montré lors de l'étude de l'activité antibactérienne des extraits secs de quelques plantes médicinales, à savoir *Thymus vulgaris*, une sensibilité des bactéries Gram(+).

Quant à la souche *Klebsiella pneumoniae ATTC700603,* elle a manifesté une résistance *vis-à-vis* des extraits testés excepte avec l'extrait méthanolique obtenu pendant floraison.
Les extraits hexaniques pendant et après floraison montrent une activité antimicrobienne *vis-à-vis de P. aeruginosa***,** Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent les plus résistantes, cela est liée à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, l'action antimicrobienne démontrée par l'extrait l'hexanique de *T. ciliatus* est probablement en relation avec sa teneur élevée en huile essentielle, qui contient les composés phénoliques majoritaires thymol et carvacrol. Cependant les valeurs enregistrées restent largement inférieures à ceux obtenues par les huiles essentielles pures de cette plante (Tab.20).

En effet, **Al-Fatimi et *al.* (2010)** signalent qu'EDCM et EMeOH de la partie aérienne de *T .laevigatus* exercent une forte activité sur les souches : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) avec des diamètres d'inhibition compris entre 15 et 35mm. Ces valeurs sont supérieures aux nôtres.

La variation de la composition chimique d'une période à une autre explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits de *T. ciliatus*. Les propriétés antibactériennes des extraits sont attribuées à leur richesse en principe actif, les huiles essentielles, les flavonoïdes et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs **(Essawi et Srour, 2000).**
En plus, l'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait **(Sarker et *al.*, 2005).** En plus, le pouvoir antibactérien dépend également de la nature de la souche **(Djahra et *al.*, 2013**). Les résultats obtenus confirment l'efficacité des extraits de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et leur pouvoir antiseptique.

9. Activité antioxydante

9.1. Huiles essentielles de *T. ciliatus*

Dans la présente étude, deux méthodes ont été utilisées afin de témoigner l'activité anti-oxydante des huiles essentielles de *T. ciliatus*, il s'agit de : le piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$ et la réduction du fer.

9.1.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$

L'activité antioxydante des huiles essentielles obtenues pendant les différentes phases de développement de *T. ciliatus* a été évaluée au moyen du test DPPH (effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$). Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage de nos huiles essentielles grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations **(Yi et *al*., 2008).** En effet le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu **(Sanchez-Moreno, 2002).**

L'activité anti-radicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH à 517nm **(Sharififar et *al*., 2009).** Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\bullet}$ en fonction des concentrations d'HE, à partir de la courbe ; les concentrations qui fournissent 50% d'inhibition (IC_{50}) sont déterminées pour chaque HE. Notons qu'une faible valeur d'IC_{50} signifie la forte activité antioxydante **(Viuda-Martos et *al*., 2011)**. Les courbes illustrées dans les figures (39, 40, 41) nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH$^{\bullet}$ au cours du temps et en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical.

La cinétique de réduction du radical libre DPPH$^{\bullet}$ obtenue pour chaque concentration d'acide ascorbique est présentée dans la figure 38. On observe une diminution rapide dans l'absorbance dans les premières minutes, suivie d'une étape plus lente, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, on distingue alors deux zones : une zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des cinq premières minutes et une deuxième zone à

faible cinétique de piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ ou zone de tendance vers l'équilibre constatée, au-delà de 5 minutes pour toutes les concentrations de l'acide ascorbique.

D'après les figures 39, 40, 41 : on constate que l'action des trois huiles essentielles dans la réduction du radical DPPH$^{\bullet}$ est régressive au cours du temps réactionnel, avec toutes les concentrations et au bout de 20 minutes, on constate que la réaction atteint un équilibre, ce temps est très lent par rapport à celui de l'acide ascorbique. Ces résultats sont similaire à ceux de **Boughendjioua et *al.* (2014),** ils ont signalé une forte cinétique de piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ par l'acide ascorbique comparativement à l'HE de *T. numidicus* Poiret. L'activité antioxydante est tributaire à la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH$^{\bullet}$, l'atome H est transféré sur ce dernier qui devient stable sous sa forme DPPHH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à épuisement de la capacité de l'antioxydant donneur d'hydrogène **(Laib, 2012 ; Barkat et Laib, 2011).**

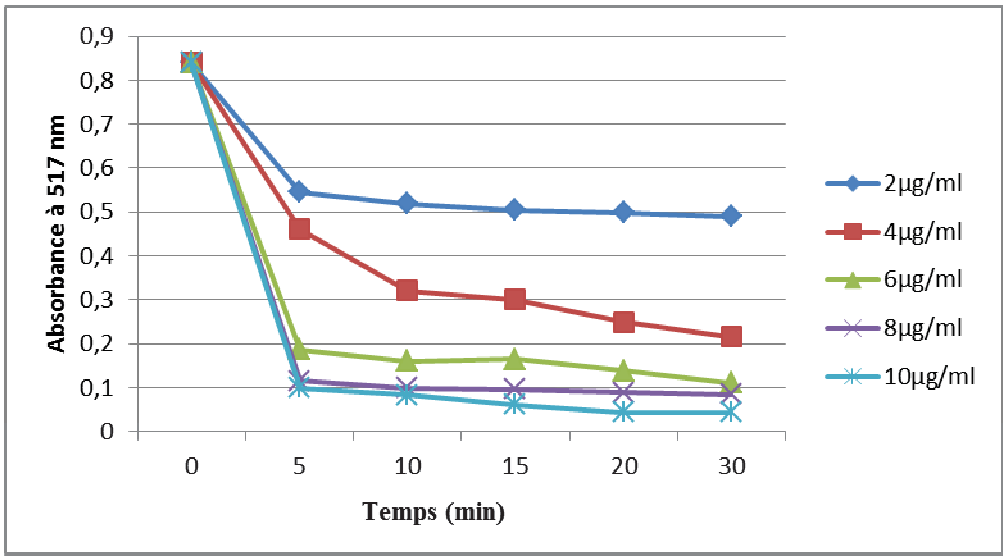


Figure 38 : Cinétique de réduction du radical DPPH en présence d'acide ascorbique

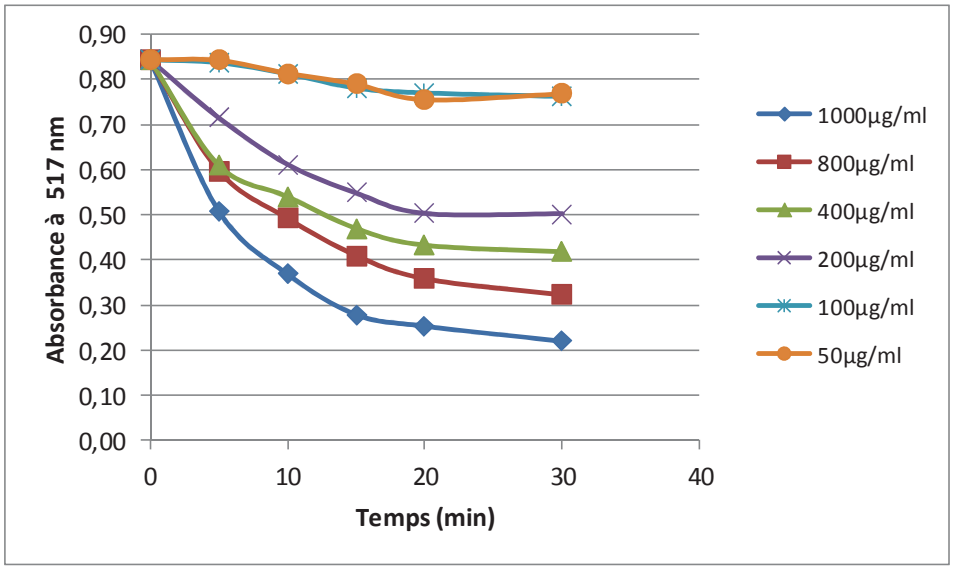


Figure 39 : Cinétique de réduction du radical DPPH en présence d'HE avant floraison

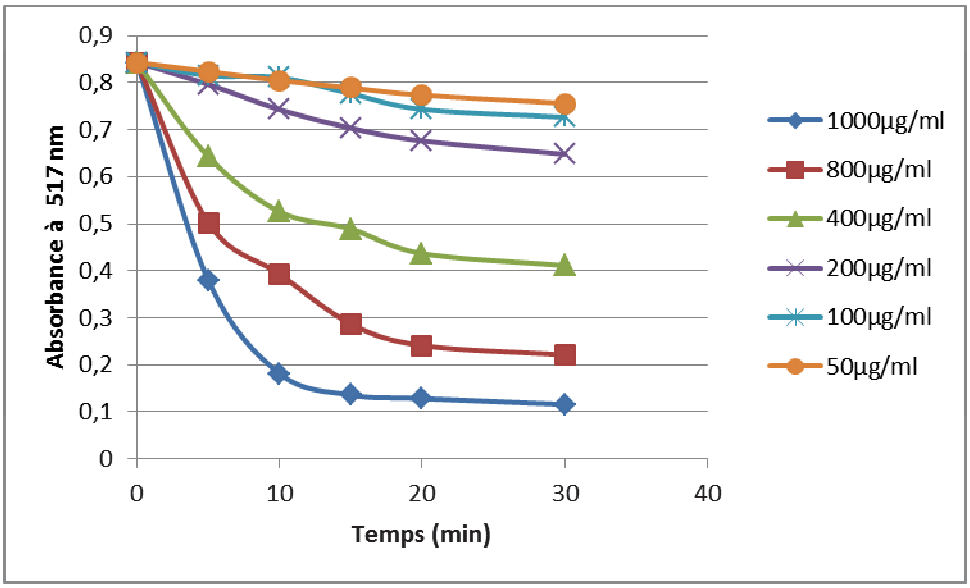


Figure 40 : Cinétique de réduction du radical DPPH en présence d'HE floraison

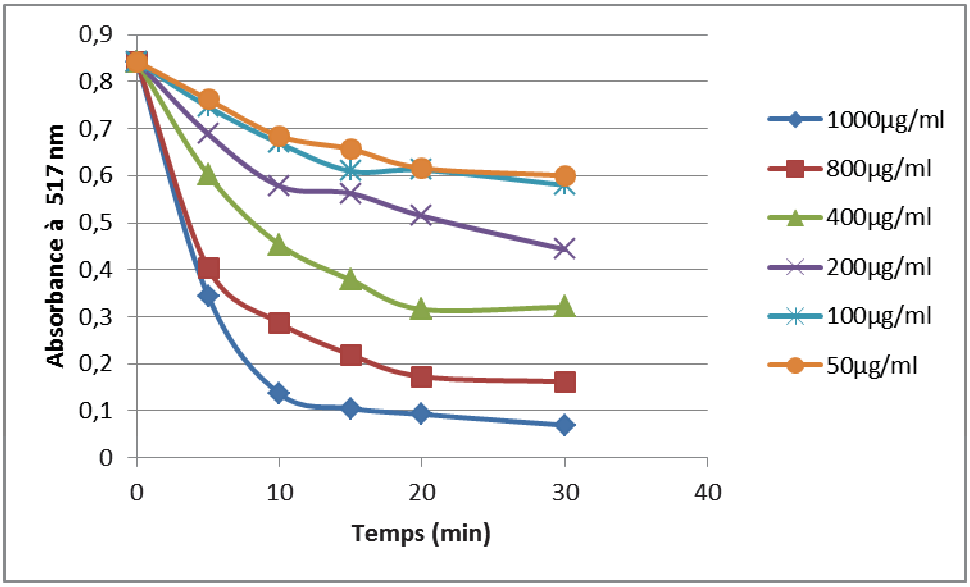


Figure 41 : Cinétique de réduction du radical DPPH en présence d'HE après floraison

Les résultats obtenus révèlent que les différents extraits de l'HE possèdent une activité anti-radicalaire dose-dépendante, car elle augmente avec l'accroissement des concentrations des huiles essentielles.

Selon le tableau 24, les trois HEs ont présenté, aux faibles concentrations, des pourcentages d'inhibition faibles. À une concentration de 100 µg/ml les pourcentages d'inhibition sont de l'ordre de 8,65±0,29, 23±3,81 et de 28,747±3,284 pour les HEs obtenues pendant le stade végétatif, floraison et après floraison respectivement. Néanmoins l'huile essentielle après floraison a manifesté la plus forte aptitude à inhiber le radical DPPH$^{\bullet}$ avec un pourcentage d'inhibition égal à 91,735%, suivie de l'huile essentielle floraison et avant floraison dont les taux sont de 88,21 et 73,92 % respectivement, à la concentration 1000 µg/ml.

Tableau 24 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH˙ en fonction des différentes concentrations des HEs et d'acide ascorbique

	Concentrations (µg/ml)	**Effet d'inhibition DPPH(%)**		
T. ciliatus		Avant floraison	Floraison	Après floraison
	100	8,65±0,29	10,123±3,81	28,747±3,284
	200	9,65±0,168	13,405±0,544	31,198±2,272
	400	40,45±0,821	23,17±0,695	47,449±1,648
	600	50,523±0,446	51,245±1,347	61,056±6,521
	800	58,71±5,363	73,7±2,803	80,742±0,138
	1000	73,922±0,615	88,21±0,298	91,735±1,045
acide ascorbique				
	2	41,835±0,548		
	4	74,546±0,274		
	6	86,951±1,054		
	8	89,917±0,593		
	10	94,859±0,362		

Les valeurs sont une moyenne de trois essais±SD.

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH˙ en présence d'acide ascorbique reste supérieur à celui des HEs étudiées avec une IC_{50} égale à 2,48 ±0,02µg/ml (Tab.24). Cependant, parmi ces trois HEs étudiées, l'HE après floraison présente la plus grande activité antioxydante avec une IC50 de l'ordre de 438±9,07µg/ml, l'HE début floraison possède également un important pouvoir antioxydant avec une IC_{50} de l'ordre de 580±1,15 µg/ml, suivie de l'huile essentielle de la phase végétative avec une IC_{50} égale à 590±8,62µg/ml (Tab.25).

Tableau 25 : Valeurs de l'IC50 des huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* et d'acide ascorbique

	acide ascorbique	**HEAvF**	**HEF**	**HEApF**
IC_{50} µg/ml	2,48 ±0,02	590±8,62	580±1,15	438±9,07

Les valeurs sont une moyenne de trois essais±SD. AvF : avant floraison, ApF : après floraison, F : Floraison ; HE :huile essentielle

Bounatirou et *al.* (2007) ont signalé que les HEs *T. capitatus* de Tunisie obtenues pendant la période de floraison et après floraison jouissent d'une plus grande activité antioxydante en comparaison à celle de la période végétative dont les valeurs d'IC_{50} entre 500 à 1000 µg/ml.

L'activité antioxydante de l'HE de *T. ciliatus* est inférieure à celle d'**Amarti et *al*, (2006),** qui ont trouvé un potentiel antioxydant moyen, avec IC_{50} de l'ordre de 74,025 µg/ml, pour les HEs de *T. ciliatus* du Maroc. La forte activité antioxydante des HEs d'espèces de Thym d'Algérie avec une grande quantité de carvacrol et de thymol a été rapportée par **Hazzit et *al.* (2009).** Cette forte capacité de réduction des radicaux libres des trois HEs étudiées peut être aussi due à leurs profils chimiques, riches en phénols (thymol et carvacrol). En effet ces deux derniers constituants phénoliques ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant **(Amarti et *al*., 2011 ; Tepe et *al*., 2005).**

Les composés phénoliques grâce à leur propriété d'oxydo-réduction agissent comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de l'oxygène singulier **(Rice-Evans et *al*., 1995).** En plus, on ne peut pas attribuer le pouvoir antioxydant d'une HE a son composant principal, en effet malgré la faible teneur en composés thymol /carvacrol (52,39%) dans la composition de l'HEAp F, il présente une meilleure activité anti- radicalaire par rapport à l'HEF et l'HEAvF dans les teneurs respectives (60,37%) et (57,55%).

D'autre part, l'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne des résultats inférieurs, comparés à l'activité de la totalité de l'huile essentielle. **Giweli et *al.* (2013)** ont évalué l'activité antioxydante de l'HE de *Thymus algeriensis* à chémotype thymol /carvacrol dont l'ensemble forme un taux de 43,19 % du total de l'HE. Les résultats obtenus ont montré que la capacité de réduction du DPPH est très importante avec une IC50 de l'ordre de 0,299 mg/ml, cependant l'activité antioxydante des composés thymol /carvacrol testés séparément a donné des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'huile essentielle avec des IC_{50} de l'ordre de : thymol (0,403 mg/ml) et carvacrol (0,105 mg/ml).

Les interactions synergiques ou antagonistes entre les différents constituants d'une huile essentielle sont également à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important. En effet, certains chercheurs ont montré que les composés non phénoliques possèdent aussi une forte activité antioxydante **(Deba et *al*., 2007),** tels que le γ-terpinène **(Ruberto et Barrata, 2000).** Une autre étude a montré que l'efficacité anti- radicalaire de l'HE de *T. broussonetii* est de 20 fois supérieure à celle de *T. algeriensis*, cette efficacité a été attribuée à la présence de carvacrol (15,7%) dans la composition de l'HE de *T. broussonetii*, le faible potentiel anti-radicalaire de l'HE *T. algeriensis* ; il peut donc être expliqué par l'absence de composés phénoliques **(El Ouariachi et *al*., 2014)**.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des HEs de *T. ciliatus* d'Algérie. À ce jour-là, seul un article, traite l'activité antioxydante des HEs par la méthode de l'oxydation du β-carotène. À travers ces résultats, l'huile essentielle a manifesté la plus forte aptitude à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique avec un pourcentage d'inhibition égal à 75,68% **(Ghorab et *al*., 2013).**

9.1.2. Réduction du fer

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter **(Gourine et *al*., 2010 ; Politeo et *al*., 2007).** Cette méthode est basée sur la capacité des HEs à apporter des électrons afin de réduire le fer ferrique Fe^3+ en fer ferreux Fe^2+. présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$; la réduction de Fe^{3+} est un indicateur de l'activité donatrice d'électron, qui est un important mécanisme antioxydant **(Gonçalves et *al*., 2013).**

Lors de cette étude, nous avons opté pour tester par cette méthode les différents HEs obtenues pendant différents stades de développement de *T. ciliatus*. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque HE. Les résultats représentés dans la figure42 montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

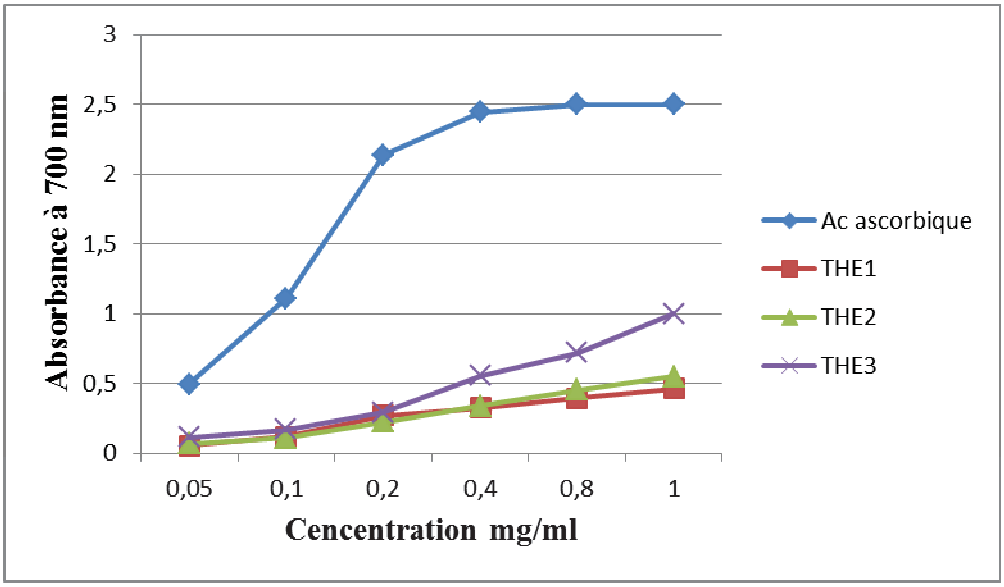


Figure 42 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *T. ciliatus* et l'acide ascorbique.

D'après les graphes de la figure 42, L'acide ascorbique, antioxydant de référence, a présenté une activité la plus élevée par rapport aux HEs, Le pouvoir réducteur des trois huiles essentielles de *T. ciliatus* (avant floraison, floraison, après floraison) s'élèvent de 0,465± 0,002, 0,551±0,003 et 1,001±0,005 à la concentration 1 mg/ml respectivement, seule l'HE après floraison DO (1,001) présente une forte activité par rapport aux autres HEs. Néanmoins elle reste faible par rapport à l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus montrent que les HEs de *T. ciliatus* possèdent une activité antioxydante intéressante. Nous pouvons classer la réduction du fer des échantillons comme suit : acide ascorbique> HE après floraison> HE floraison> HE végétative.

L'activité antioxydante des huiles essentielles a souvent été attribuée à la présence de composés phénoliques, en particulier thymol et / ou carvacrol. Selon **Hazzit et *al.* (2009)** le pouvoir des HEs de Thym pauvres en thymol ou carvacrol était nettement plus faible que celles des huiles essentielles riches en ces deux phénols. Ces deux composés phénoliques sont des puissants réducteurs, en raison des substitutions hydroxyles dans le

cycle aromatique, qui a la capacité de céder l'hydrogène tel que décrit par **Shimada et *al.* (1992).** Néanmoins, d'autres composés semblent également jouer un rôle important.

Les résultats obtenus révèlent l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en HE et l'activité antioxydante, en effet les HEApF et HEF ont montré des rendements élevés et ont été également enregistrés comme les extraits qui possèdent la plus grande activité réductrice de DPPH, et du fer.

Globalement, les résultats obtenus démontrent, qu'il existe une relation entre la composition chimique des huiles essentielle et l'activité antioxydante et la variabilité observée est probablement due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique des HEs ainsi que sur leurs activités antioxydantes (**Gourine et *al.*, 2010 ; Bounatirou et *al.*, 2007**).

9.2. Activité antioxydante des extraits de *T. ciliatus*

L'activité antioxydante *in-vitro* de nos extraits a été évaluée par deux méthodes différentes : le piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$ et la réduction du fer.

9.2.1. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$

La méthode de piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$ a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de *T. ciliatus*, le standard utilisé était (acide ascorbique). Le DPPH est un radical libre stable, qui accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable **(Yang et *al.*, 2014).**

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ en fonction des concentrations des extraits. A partir des courbes, nous avons déterminé pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH$^{\bullet}$ (IC_{50}); notons qu'une valeur faible d'IC_{50} implique une forte activité antioxydante **(Roby et *al.*, 2013).**

9.2.1.1 Extraits hexaniques

D'après la figure 43 nous avons constaté, que les extraits hexaniques aux différentes périodes de croissance de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*, ont montré des pouvoirs de piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ dose dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait. La comparaison des extraits hexaniques révèle que l'extrait hexanique (EHex F) pendant la floraison obtenu par macération, représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} égale à 4,69±0,007mg/ml, suivi de l'extrait après floraison (EHex ApF) avec une IC_{50} de l'ordre de 21,43±0,11mg/ml, cependant EHex avant floraison (EHex AvF) représente l'activité antioxydante la plus faible à piégé le radical DPPH$^{\bullet}$ avec une IC_{50} égale à 36,22±2,37 mg/ml.

En outre, tous les EHex ont une activité antioxydante inferieure au témoin positif l'acide ascorbique (IC_{50} = 2,48 ±0,02µg/ml). L'activité antioxydante de l'extrait Hex floraison obtenu par soxhlet n'a pas pu être quantifiée, car aux concentrations maximales testées, elle ne représente que 26,17% d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$. Cependant à une concentration de 10mg/ml, l'EHex floraison a atteint le pourcentage d'inhibition le plus important 57,39%, alors que l'EHex avant floraison, après floraison, et floraison

(soxhlet) présentent de faibles pourcentages à cette même concentration de 29,42%, 28,56%, et 16,01% respectivement.

Nous pouvons, les classer selon un ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : acideascorbique> EHex floraison> EHex avant floraison> EHex après floraison> EHex floraison (obtenu par soxhlet).

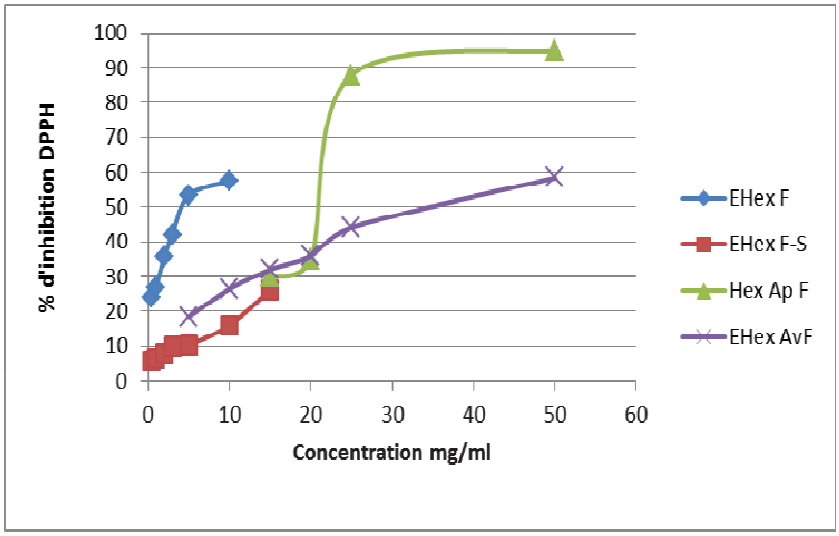


Figure 43: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ des extraits hexaniques aux différents stades de croissance de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*

9.2.1.2. Extraits dichlorométhanoliques

D'après les courbes dans la figure 44, on observe qu'à la concentration (5mg/ml), le pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ des extraits dichlorométhanoliques de *T. ciliatus* est presque similaire, il est de 37,34% pour EDCMF, 33,72% pour EDCM ApF et pour EDCM AvF 31,48%, alors que l'extrait DCM floraison obtenu par soxhlet (EDCM F-S) est de 53,09% à la même concentration. Tous les extraits dichlorométhanoliques obtenus à différentes périodes de récolte ont montré des valeurs d'IC_{50} différentes, elles varient de 4,35 à 11,5mg/ml (Tab.26).

L'EDCM floraison obtenu par soxhlet a révélé une activité antioxydante plus importante par rapport aux autres EDCM évalués. La valeur d'IC_{50} enregistrée est de 4,35±0,01 mg/ml, suivi des EDCM floraison et avant floraison dont les IC_{50} sont 7,64±0,18 et 8,65±0,11 mg/ml respectivement, tandis que l'extrait DCM après floraison a présenté l'activité la plus faible, avec une IC_{50} de l'ordre de 11,5±0,04 mg/ml. Nous notons aussi que tous les extraits ont une activité antioxydante inférieure au témoin positif acide ascorbique (IC_{50} de 2,48±0,02µg/ml). Les extraits peuvent être classés par ordres décroissants du pouvoir anti-radicalaire comme suit : acide ascorbique> DCM floraison soxhlet> DCM floraison> DCM avant floraison> DCM après floraison.

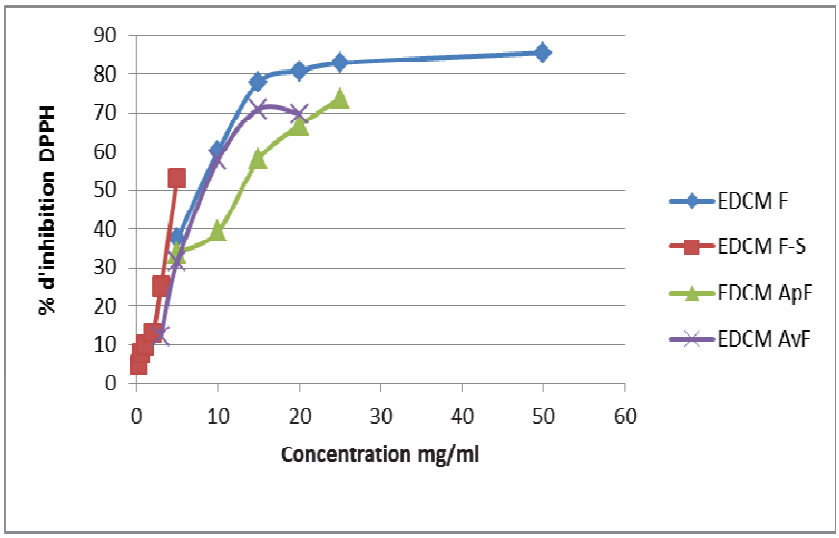


Figure 44 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ des extraits DCM aux différents stades de croissance de *T. ciliatus* ssp *coloratus*

9.2.1.3. Extraits méthanoliques

La figure 45, rapporte que les pourcentages d'inhibition sont importants aux faibles concentrations, ce qui reflète un pouvoir trés important de piégeage du radical DPPH$^{\bullet}$ des extraits méthanoliques (EMeOH). En effet ; à la concentration de 1mg/ml on a enregistré des pourcentages d'inhibition de 88,31% pour l'EMeOH floraison obtenu par soxhlet suivi de l'EMeOH après floraison avec 81,44%, puis l'EMeOH avant floraison 55,96%, et en dernier l'EMeOH floraison avec un taux de 38,74%. On constate que l'EMeOH floraison obtenu par soxhlet a montré des pourcentages d'inhibition élevés du radical libre DPPH$^{\bullet}$ avec de faibles concentrations. L'IC_{50} observée est de 0,37±0,01 mg/ml, suivi de l'extraits

MeOH avant et après floraison avec des IC_{50} de 0,87±0,03 et 0,82±0,01 mg/ml respectivement. Cependant l'extrait MeOH floraison a présenté la plus faible activité antioxydante du radical DPPH$^{\bullet}$ avec IC_{50} à 1,27 mg/ml. Nous remarquons aussi que tous les extraits ont une activité antioxydante inférieure à acide ascorbique avec IC_{50} = 2,48 ±0,02µg/ml (Tab.27).

Le classement des extraits selon leur pouvoir anti-radicalaire est par ordre décroissant comme suit : acide ascorbique> EMeOH floraison soxhlet > EMeOH aprés floraison > EMeOH avant floraison> EMeOH floraison.

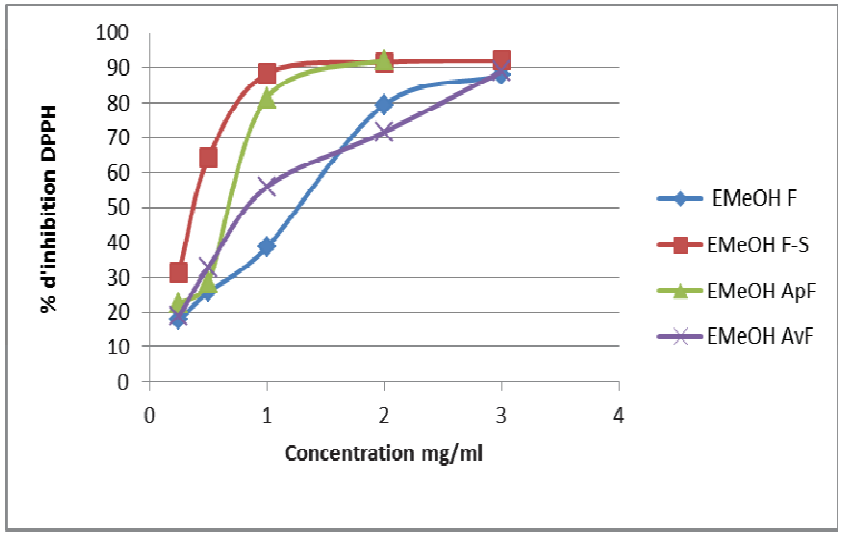


Figure 45 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ des extraits MeOH aux différents stades de croissance de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*

9.2.1.4. Extrait aqueux

La figue 46 montre que l'extrait aqueux (EAqAS) de la periode de floraison a atteint 50% d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ à une concentration très faible egale à 0,318±0,003 mg/ml, , elle est également inférieure au témoin positif l'acide ascorbique (IC_{50} = 2,48 ±0,02µg/ml)

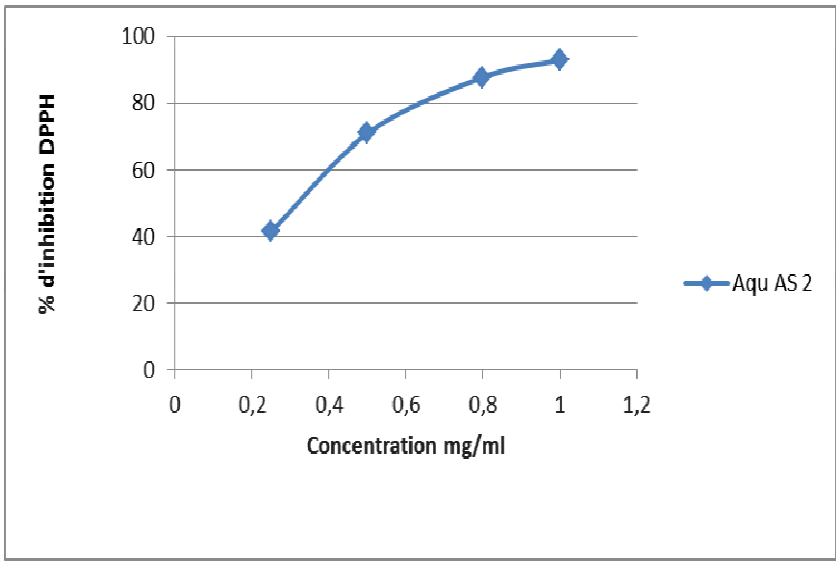


Figure 46 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH$^{\bullet}$ de l'extrait Aqu AS, pendant floraison

Tableau 26: Valeurs de l'IC_{50} déterminées par le test DPPH des extraits de *T. ciliatus* ssp. *coloratus*

	DPPH IC_{50} (mg /ml)			
Période	**EHex**	**EDCM**	**EMeOH**	**EAqu AS**
Av floraison	**36,22±2,37 ^{a}**	**8,66±0,11^{b}**	**0,872±0,004^{b}**	**ND**
Floraison S	**NA**	**4,35±0,01^{d}**	**0,369±0,001^{d}**	**ND**
Floraison	**4,69±0,007^{c}**	**7,64±0,19^{c}**	**1,26±0,013^{a}**	**0,318±0,003**
Ap floraison	**21,43±0,11^{b}**	**11,50±0,044^{a}**	**0,818±0,005^{c}**	**ND**

Dans chaque colonne ; Les valeurs sont une moyenne de trois essais±SD et portant différentes lettres significativement différentes ($p < 0,001$) avec le test de Tukey, ND : Non déterminée. Av : avant, Ap : après, S : extraction par soxhlet

Les résultats de l'activité anti-radicalaire mettent en évidence une grande variabilité entre les différents extraits. En effet, le tableau 26 montre que les IC_{50} varient significativement en fonction du type d'extraits, de la période de récolte et de la méthode d'extraction. Les IC_{50} de l'ensemble des extraits étudiés varient de 0,31±0,003 à 36,22±2,3 mg/ml. Parmi ces extraits, l'extrait aqueux après solvant (IC_{50} 0,318±0,003) et l'extrait méthanolique pendant floraison, obtenu par soxhlet (IC_{50} 0,37±0,01 mg/ml) sont les plus actifs. On peut les classer selon un ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : acide ascorbique >EAq AS F>EMeOH F-S> EMeOH AvF> EMeOH AF> EMeOH F>EDCM F-S>EHexF> EDCM F> EDCM AvF> EDCM AF> EHex AF> EHex AvF. Nous remarquons aussi que tous les extraits ont une activité antioxydante inferieure au témoin positif acide ascorbique (IC_{50} = 2,48 ±0,02µg/ml).

Nos extraits polaires montrent des pourcentages d'inhibition élevés avec des faibles concentrations, par rapport aux extraits à faible polarité ; ceci est en accord avec plusieurs auteurs **(Ben El Hadj Ali et *al*., 2014 ; Roby et *al*., 2013 ; Sarikurkcu et *al*., 2009 ; Djeddi et *al*., 2015 ; Ozturk et *al*., 2007)** dont l'extrait le plus actif est le plus polaire. Une étude faite par **Kang et *al*, (2003)** a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antioxydante. La plupart des études expliquent la variation du potentiel antioxydant d'un extrait est en fonction des solvants d'extraction et selon leur polarité (**Teh et *al*., 2014 ; Yang et *al*., 2014 ; Bidgoli et *al*., 2014).**

En effet, l'étude *In vitro* menée par **Al fatimi et *al*, (2010)** sur l'activité antioxydante des différents extraits MeOH, DCM, Eau obtenus à partir des feuilles de *Thymus laevigatus* a également révélé que l'extrait méthanolique présente une meilleure activité a piégé le radical $DPPH^{\bullet}$ avec une IC50 égale à 14,9µg/ml, DCM (IC_{50} = 28µg/ml) et Eau (IC_{50}> 1000µg/ml).

D'autres les travaux menés sur les différents extraits (Ether de pétrole, Dichlorométhane, Butanol, Méthanol) de *Marrubium deserti* de Noé appartenant à la même famille de *T .ciliatus*, montrent que l'extrait méthanolique a exhibé une forte capacité à piéger le radical $DPPH^{\bullet}$ avec une IC_{50} de l'ordre de 15,1µg/ml **(Ghedadba et *al*., 2015)** , ces valeurs d'IC_{50} sont très faibles, donc meilleures par rapport à nos extraits.

Nos extraits polaires EAq AS et MeOH possèdent des capacités réductrices du radical libre DPPH$^{\bullet}$ intéressantes, puisqu'ils agissent à faible dose. L'activité anti-radicalaire de ces extraits est attribuée à la présence du taux relativement élevé en polyphénols, dont l'extrait Aqu AS possède la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols, flavonoïdes) Tab. 27, suivie par l'extrait MeOH.

En plus, d'un point de vue qualité de propriété antioxydante, on constate que les extraits préparés par soxhlet ont montré des activités antioxydantes, plus élevés que celles obtenus par macération. Cependant selon les travaux de **Bidgoli et *al*, (2014),** la méthode de macération offre des extraits de grande qualité d'un point de vue propriétés antioxydantes par rapport aux extraits préparés par méthode sous reflux, et soxhlet des feuilles de *Artemisia aucheri* ; cela pourrait être expliqué par le fait que la basse température de fonctionnement de ce procédé provoque moins de dommage à la structure moléculaire des composants actifs extraits.

D'un autre côté, nous constatons qu'il y a une corrélation négative entre la teneur des extraits polaires en polyphénols totaux, en flavonoïdes et l'activité antioxydante, avec des coefficients de corrélations (R^2 = 0,484 et 0,472) respectivement ($p>0,05$), ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Cela est en accord avec plusieurs auteurs, qui ont trouvé une corrélation entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante **(Djeridane et *al*., 2006 ; Fadili et *al*., 2015 ; Boulanouar et *al*., 2013 ; Gonçalves et *al*., 2013).**

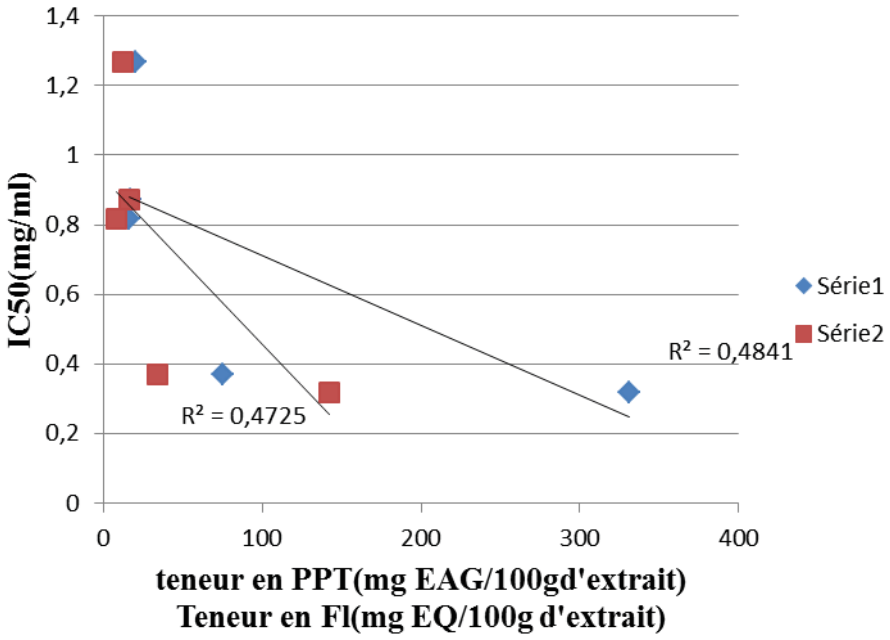


Figure 47 : Corrélation entre activité anti radicalaire au DPPH et teneurs en polyphénols totaux (PPT) et teneurs en flavonoïdes (Fl).

Une corrélation plus importante a été trouvée par d'autres chercheurs entre la concentration en PPT, Fl et l'activité antioxydante (*β*- carotène) avec r = 0,870 et r = 0,83 respectivement, des extraits polaires de *Marrubium deserti* de Noé **(Ghedadba et *al.*, 2015),** contrairement à d'autres**,** ils n'ont pas trouvé de corrélation entre les polyphénols et l'activité antioxydante, il est admis que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en PPT exhibe une activité antioxydante puissante **(Sayout et *al.*, 2015 ; Benhammou et *al.*, 2009).**

Les différences observées dans les valeurs absolues des activités antioxydantes peuvent être attribuées aux différences de composition qualitative et quantitative en polyphénols. En effet, **Dimajo et *al*, (2008)** ont montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les composés phénoliques ont des réponses différentes en fonction du nombre de groupements OH et OCH_3; d'ailleurs un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (**Torres de Pinedo et *al.*, 2007).** Egalement les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la

potentialité antioxydante **(Köksal et *al.*, 2016 ; Yi et *al.*, 2008[b]).** En outre, la synergie entre les antioxydants contenus dans le mélange rend l'activité anti-oxydante dépendante non seulement de la concentration, et la structure, mais aussi de l'interaction entre les antioxydants **(Djeridane et *al.*, 2006 ; Spiridon et *al.*, 2011).**

L'activité antioxydante des polyphénols réside dans le fait que ces derniers ont la capacité de donner des atomes d'hydrogène aux radicaux libres, du fait de la présence de nombreux hydroxyles qui peuvent réagir avec les radicaux libres, plusieurs flavonoïdes et polyphénols isolés à partir des extraits, ont montré une forte activité antioxydante au DPPH **(Lee et *al.*, 1998 ; Yang et *al.*, 2008**),

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyles, et plus particulièrement du C_3-OH fortement réactif **(Ghedira, 2005).** Aussi les flavonoïdes les plus puissants sont ceux qui comportent le groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C_2-C_3. La présence de la double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo est aussi connue comme responsable de la délocalisation des électrons du cycle B et augmenterait ainsi la capacité du piégeage d'un radical. Une meilleure activité requière essentiellement la structure 3',4'-ortho-dihydroxy sur le cycle B et le groupement 4-carbonyl sur le cycle C qui confère la stabilité au radical flavonoxy (A.) **(Harborne et Williams, 2000 ; Sharififar et *al.*, 2009).**

En outre, les études faites sur les extraits des différentes espèces végétales montrent que la famille des Lamiaceae possède les activités antioxydantes les plus fortes (**Tamert et Latreche, 2015 ; Spiridon et *al.*, 2011 ; Ben El Hadj Ali et *al.*, 2014 ; Nickavar et *al.*, 2008).**

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Kholkhal et *al*, (2013)** qui ont testé l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne de *T.ciliatus ssp coloratus* vis-à-vis du radical $DPPH^{\bullet}$. Ils rapportent que la fraction acétate d'ethyle et les tanins représentent les extraits les plus actifs avec des IC_{50} de l'ordre de 0,85 et 0,36 mg/ml respectivement, suivi de la fraction butanolique (IC_{50} = 1,5 mg/ml) et l'extrait brut (IC_{50} = 1,07mg/ml).

Une activité antioxydante similaire a été trouvée par **Sayout et *al.* (2015)** sur des extraits méthanoliques des tiges de *T. broussenetti* Boiss, *T. pallidus* Batt, *T. leptobotrys* Marb avec

des IC_{50} respectifs de 0,132±0,034 mg /ml, 0,373±0,07 mg /ml et 0,430±mg /ml. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophénol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène **(Bougandoura et Bendimerad, 2013).** D'ailleurs l'effet scavenger du radical DPPH de l'extrait flavonoide de *T. ciliatus* a indiqué que les flavonoïdes présentent une grande activité avec une IC_{50} de 5,39±0,10 µg/ml (**Gaamoune et *al*., 2015).**

Selon les travaux de **Kulšic et *al*, (2006),** la présence des constituants phénoliques dont l'acide rosmarinique, lutéoline 7-O-β-glucuronide et glucoside- lutéoline dans les extraits aqueux de *Thymus serpyllum* L. et *Thymus vulgaris* est probablement responsable de l'activité antioxydante du radical $DPPH^{\bullet}$, ils dénotent des IC_{50} de l'ordre de 0,3mg/ml pour *Thymus vulgaris* et 0,45 mg/ml pour *Thymus serpyllum,* la cinétique de réduction du radical $DPPH^{\bullet}$ par l'acide rosmarinique a été démontré (**Gadowvon et *al*., 1997 ; Koleva et *al*., 2000).**

9.2.2. Réduction du fer

Lors de notre recherche, nous avons testé l'activité antioxydante des différents extraits de la partie aérienne de *Thymus ciliatus* récolté à différents stades de croissance, par la méthode de réduction du fer (FRAP). L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence, Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les figures (48, 49, 50, 51) nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons. Le pouvoir réducteur est utilisé comme indicateur très significatif du potentiel antioxydant proposé, pour tester l'activité antioxydante. L'EC_{50} est la concentration qui correspond a l'absorbance (0,5), elle est déterminée graphiquement, l'abscisse représente la concentration de extrait et en ordonné l'absorbance à 700nm (**Zengin et *al*., 2011 ; Gaamoune et *al*., 2015),** Une faible valeur d'EC_{50} indique le fort pouvoir réducteur du fer **(Benhammou et *al*., 2009[b]).**

9.2.2.1. Extraits avant floraison

D'après les graphes de la figure 48, l'extrait méthanolique obtenu par macération avant floraison a présenté la plus grande activité pour réduire le fer par rapport aux extraits Hex, DCM et Aqu qui ont présenté une faible activité, avec des valeurs de DO respectives (0,363 ±0,01), (0,549±0,05), (0,234±0,06) à une concentration de 1 mg/ml.

Nous remarquons aussi, que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'extrait. L'acide ascorbique, antioxydant de référence, a présenté une activité plus élevée par rapport aux extraits, avec les mêmes concentrations utilisées. Nous pouvons classer la réduction du fer des échantillons comme suit : acide ascorbique>extrait MeOH> DCM>Hex>Aqu.

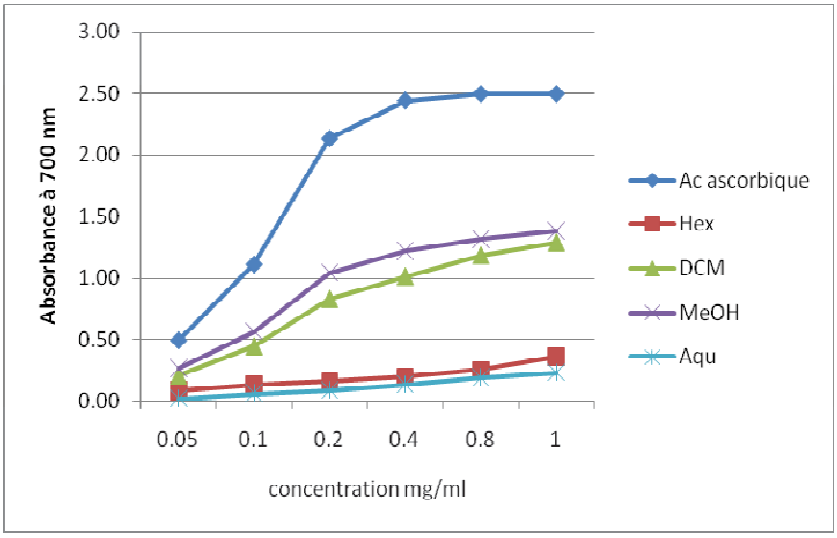


Figure 48 : Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* avant floraison et de l'acide ascorbique.

9.2.2.2. Extraits pendant la floraison

Les résultats obtenus (Fig.49) montrent que la capacité à réduire le fer est plus élevée pour les extraits polaires que les extraits apolaires ; l'extrait Hex et DCM ont présenté une très faible activité à réduire le fer avec des valeurs observées de DO qui ne dépassent pas le 1, elle est de 0,635±0,02 et 0,9±0,01 respectivement à une concentration de 1 mg/ml, les mêmes extraits obtenus par soxhlet présentent une faible activité à réduire le fer avec des

valeurs de DO de 0,645±0,05 pour EHex et 0,621±0,05 pour EDCM à la concentration de 1mg/ml.

L'extrait méthanolique obtenu par extraction au soxhlet présente une capacité intéressante à réduire le fer avec une densité optique supérieure à 2,5 à une concentration de 1 mg/ml, similaire à celle de l'acide ascorbique, de même l'extrait méthanolique obtenu par macération a montré une activité très intéressante, mais avec des valeurs observées de DO= 1,95 ±0,07 à la concentration 1 mg/ml.

Nous remarquons aussi que l'extrait aqueux (après solvants), obtenu par macération a exercé une activité remarquable pour réduire le fer, avec une densité optique maximale de 2,37 à une concentration de 1 mg/ml, elle est plus ou moins similaire à celle de l'acide ascorbique qui présente une densité optique 2,5. Cependant l'extrait aqueux après solvants obtenu par soxhlet a présenté une activité très intéressante pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 1,95±0,06 à une concentration de 1 mg/ml.

Nous observons aussi que la capacité à réduire le fer est très faible pour l'extrait aqueux par macération, avec des valeurs observées de densités optiques (DO) qui ne dépasse pas 0,358 ± 0,01 à la concentration de 1 mg/ml.

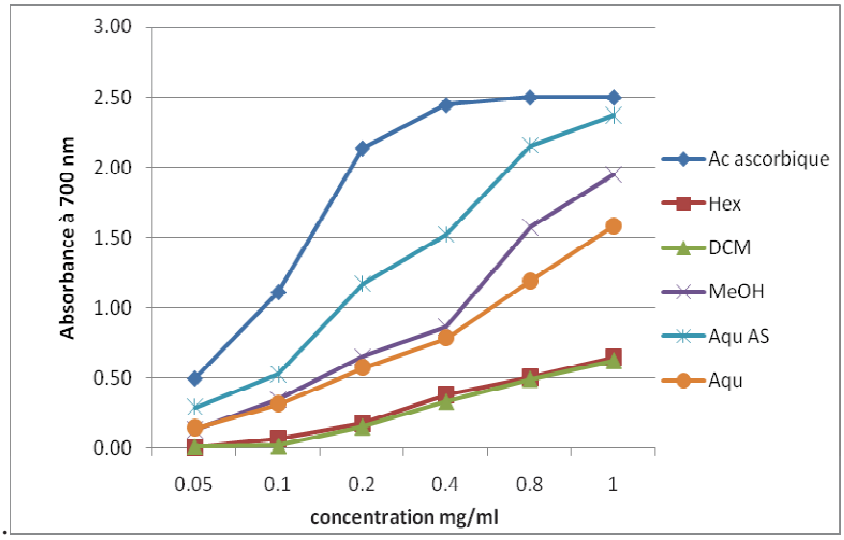


Figure 49 : Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* pendant floraison (obtenus par macération) et de l'acide ascorbique.

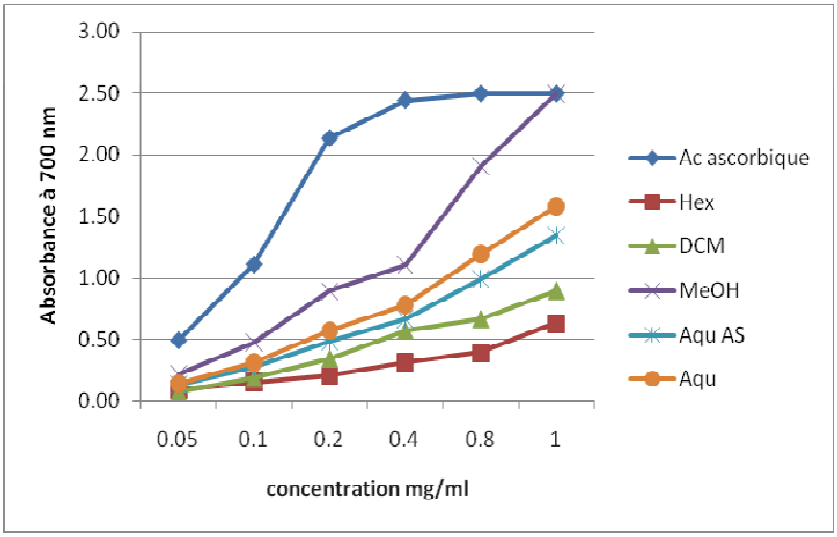


Figure 50 : Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* avant floraison, (obtenus par soxhlet) et de l'acide ascorbique.

9.2.2.3. Extraits aprés floraison

D'après la figure 51, nous constatons que l'extrait méthanolique de la plante récoltée après floraison et obtenu par macération a présenté une activité beaucoup plus prononcée pour réduire le fer, par rapport aux autres extraits avec une densité optique de l'ordre de 1,62±0,05 à la concentration 1mg/ml. L'EHex et DCM ont présenté une faible activité à réduire le fer, avec des valeurs de densité optique égales à 0,19±0,01 et 0,85±0,02 respectivement pour une concentration de 1mg/ml. Nous notons que l'extrait aqueux n'exerce pas une activité remarquable pour réduire le fer, reflétée par les DO très faibles obtenues à différentes concentrations, malgré sa polarité élevée. Tous nos extraits de la plante recueillie après la floraison présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle de l'acide ascorbique.

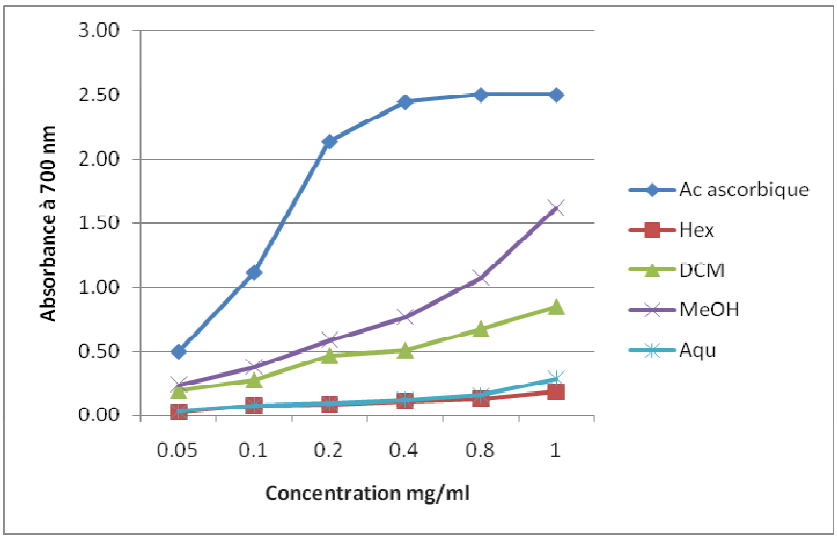


Figure 51 : Pouvoir réducteur des extraits de *T. ciliatus* après floraison et de l'acide ascorbique.

Tableau 27 : Valeurs de l'EC_{50} déterminées par le test Réduction du fer, des extraits de *T. ciliatus* ssp. *coloratus.*

	EC_{50} (mg /ml)			
Extraits	**Av floraison**	**Floraison**		**Ap floraison**
		M	**S**	
Hex	>1	0,791±0,015^{b}	0,888±0,024^{a}	>1
DCM	0,818±0,065^{a}	0,916±0,004^{a}	0,339±0,029^{b}	0,365±0,053^{a}
MeOH	0,084±0,007^{b}	0,153±0,001^{c}	0,069±0,008^{d}	0,164±0,01^{b}
Aqu AS	ND	0,094±0,005^{d}	0,292±0,037^{c}	ND
Aqu	>1	>1	ND	>1
Acide ascorbique	0,05±0,004			

Dans chaque colonne ; Les valeurs sont une moyenne de trois essais±SD et portant différentes lettres sont significativement différentes (p < 0,001)avec le test de Tukey, ND : Non déterminée. Av : avant, Ap : après, S :extraction par soxhlet M :extraction par Macération

L'analyse de la variance a montré une différence significative entre les différents extraits dans chaque période de récolte et la méthode d'extraction ($p < 0,001$) (Tab. 27); il ressort également de nos résultats concernant la comparaison des EC_{50} obtenues pour chaque extrait, que l'EMeOH est celui qui possède l'activité réductrice la plus élevée que l'EHex, l'EDCM et l'EAqu dans les différentes périodes, L'EC_{50} est de 0,069±0,008 mg/ml pour EMeOH F-S, l'EMeOH AvF(0,084±0,007 mg/ml), l'EMeOH F(0,153±0,001 mg/ml) et pour l'EMeOH ApF(0,164±0,01 mg/ml).
Un bon pouvoir réducteur a été enregistré également avec l'extrait AqAS F (EC_{50} égale à 0,094±0,005 mg/ml) plus important que l'EMeOHF, on suggère que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux espèces réactives, les convertissant en espèces non réactives plus stables et, terminant ainsi la réaction en chaine.

Le pouvoir réducteur des EMeOH et EAq AS est peut- être expliqué par la présence des polyphénols et flavonoïdes qui peuvent jouer un rôle important dans la réduction du fer, et ceci grâce au groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**). En effet la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle **(Yang et *al.*, 2014) ;** et qu'il y a une corrélation entre les activités antioxydantes et le pouvoir réducteur des constituants de quelques plantes **(Yildirim et *al.*, 2001 ; Benhammou et *al.*, 2009).**

Nos résultats indiquent que l'extrait aqueux pour chaque période de récolte présentent un faible pouvoir réducteur (Tab.11), ceci est en parfaite concordance avec les résultats de **Bougandoura et Bendimerad. (2013)** qui ont constaté que le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de *Satureja calamintha* est largement supérieur par rapport à l'extrait aqueux, ceci peut-être dû à la présence des composés phénoliques en faibles teneurs dans les extraits aqueux par rapport aux extraits méthanoliques, ces mêmes constatations sont signalées par **Saeed et *al.* (2012).**

Kholkhal et *al.* (2013[b]) ont rapporté que les tanins de la partie aérienne de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* ont présenté une activité pour réduire le fer avec des valeurs de DO (1,764) supérieure à celle de l'acide ascorbique (0,710), et BHA (0,745), les flavonoïdes dont la

fraction acétate d'éthyle (0,865) et l'extrait brut (0,810) à la concentration de 1,25mg/ml. Cependant l'extrait brut, la fraction acétate d'éthyle et la fraction butanolique de la partie racinaire, ainsi que les tanins ont présenté une très faible activité avec des valeurs des DO qui ne dépassent pas 0,4 à la concentration de 1,25mg/ml, ces valeurs sont inférieures à celles de notre étude.

Dans une autre étude menée par **Gaamoune et *al.* (2015),** ils indiquent que le pouvoir réducteur de l'extrait flavonoïde de *T. ciliatus* (Desf.) Benth. d'Algérie, détient une bonne capacité à réduire le fer avec EC_{50} de l'ordre de 33,71±0,22µg/ml, cela peut être expliqué par le fait que les polyphénols, notamment les flavonoïdes, jouent un rôle très important dans la chélation des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton (formation des radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène) **(Ghedadba et *al.*, 2015).**

En examinant la littérature relative à l'activité antioxydante des espèces du genre Thymus par le test de réduction du fer, on constate qu'elle est rare, cependant **Boulanouar et *al.* (2013)** ont trouvé une EC50 de l'ordre de 0,025±0,006 mg/ml de *T. algeriensis* Boiss et Reut. Cette valeur reste inférieure à nos résultats. Une autre recherche effectuée sur une espèce de la même famille de thym (Lamiaceae), a montré que l'extrait de *Centaurea urvillei* DC**.** présente une forte capacité à réduire le fer avec EC_{50} égale à 0,64 mg/ml (**Zengin et *al.*, 2011**).

Globalement, les résultats de l'activité antioxydante des extraits de *T. ciliatus* par les deux méthodes (DPPH et réduction du fer) dont le mécanisme est diffèrent, ont révélé que les extraits testés présentent un pouvoir réducteur du fer (transfert d'électron) très intéressant par rapport au teste DPPH (céder un proton), cela peut-être expliqué par le fait que les mêmes composés phénoliques peuvent avoir une cinétique d'oxydation différente, selon le test utilisé **(Ozgen et *al.*, 2006).** En plus un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre **(Miliauskas et *al.*, 2004) ;** or d'autres composés dans la structure non phénolique peuvent expliquer en partie l'activité antioxydante trouvée dans ces extraits **(Nickavar et *al.*, 2008).**

Le coefficient de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols totaux des extraits polaires de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* est de R^2=0,621(p>0,05) (Fig.52), de

même la teneur en flavonoïdes totaux et le pouvoir réducteur ont présenté un coefficient de R^2=0,689, (p>0,05).

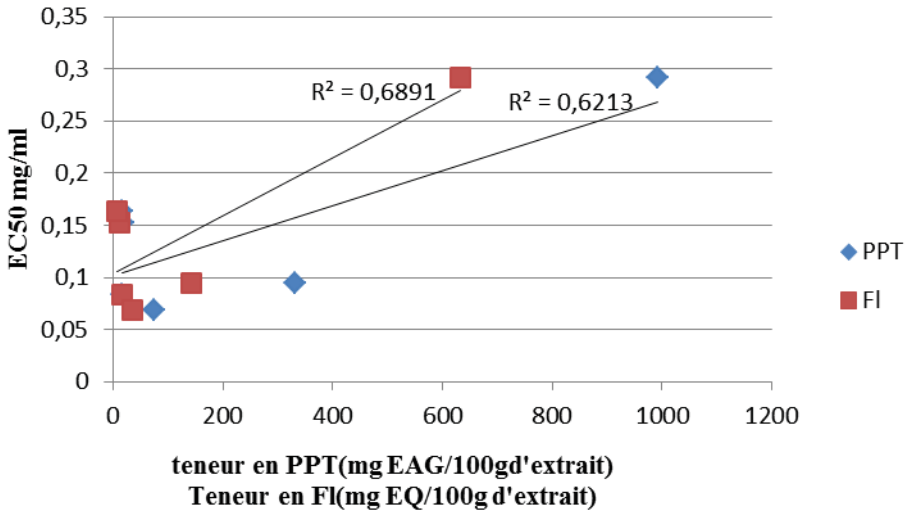


Figure 52 : Corrélation entre pouvoir réducteur et teneurs en polyphénols totaux (PPT) et teneurs en flavonoïdes (Fl) de *T. ciliatus* ssp *coloratus*.

Le pouvoir réducteur de quelques plantes médicinales présente une corrélation linéaire négative avec les teneurs en PPT, le coefficient de corrélation R^2=0,492, rapporté par **Boulanouar et *al.* (2013).** Cependant **Gonçalves et *al.* (2013)** ont noté que le pouvoir réducteur de dix plantes médicinales et méditerranéennes présente une bonne corrélation linéaire positive avec les teneurs en PPT R^2=0,875, ce qui indique que ces substances contribuent à l'activité antioxydante.

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de *T. ciliatus*, indiquent que cette plante possède des composés phénoliques à activités antioxydantes importantes, justifiée par les utilisations traditionnelles du thym (**Tamert et Latreche, 2015).**

10. Chromatographie sur Couche Mince des EMeOH de *T. ciliatus*

Les chromatogrammes des EMeOH (à différents stade de croissance) de *Thymus ciliatus* ont été obtenus avec un système de migration B.A.W. : butanol/ acide acétique/ eau (60 : 15 : 25) (v/v/v) (Annexe 3).

La révélation a été effectuée par lumière UV à 254 nm et à 365 nm, et avec des révélateurs chimiques tel que $AlCl_3$, DPPH ont été employés à cet effet. Les résultats de l'analyse par Chromatographie sur Couche Mince de nos extraits sont résumés dans le tableau 28.

La pulvérisation du chromatogramme des extraits par $AlCl_3$ à 2% a révélé la présence des flavonoïdes, sous forme de spots jaunes. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. Donc ces résultats affirment l'existence de flavonoïdes dans les différents extraits méthanoliques. Après révélation par une solution de DPPH, les extraits MeOH ont montré des zones d'activités, traduite par une couleur jaune sur fond violet, nous ont permis de déduire que les extraitsMeOH renferment des composés susceptibles de piéger les radicaux libres.

Les profils CCM de ces extraits montrent que l'extrait MeOHF est plus riche en composés comparativement aux deux autres extraits MeOHAvF et ApF (Tab.28). La présence des taches visibles et séparables et actives au DPPH pour l'extrait MeOH F rend aussi ce dernier intéressant, ce qui nous a motivé à son investigation phytochimique.

Tableau 28 : Résultats de la séparation par CCM des extraits MeOH de *T. ciliatus* dans le système de solvant :B.A.W. (60 : 15 : 25) (v/v/v)

Extraits	Rf	254 nm	365 nm	$AlCl_3$	DPPH
MeOHAvF	0.30	_	Jaune pale	_	_
	0,37	_	Jaune pale	_	_
	0.49	_	Bleu blanc fluorescent	_	Jaune blanc
	0.58	_	Jaune pale	_	Jaune blanc
	0,61	_	Jaune pale	_	_
	0.73	_	Jaune pale	_	_
	0.82	_	Bleu blanc fluorescent	_	-
	0.92	Visible	Bleu blanc fluorescent		Jaune blanc
MeOHF	0.29	Visible	Rose claire	Jaune	Jaune blanc
	0.35	Visible	Bleu blanc fluorescent	Jaune claire	Jaune blanc
	0.47	Visible	Jaune pale	Jaune	-
	0.54	Visible	Jaune pale	_	Jaune blanc
	0.63	Visible	Rose claire	_	-
	0.71	Visible	Bleu blanc fluorescent	_	Jaune blanc
	0.82	Visible	Bleu blanc fluorescent		Jaune blanc
	0.89	Visible	Bleu blanc fluorescent	Jaune claire	Jaune blanc
MeOHApF	0.16	Visible	Rose claire	Jaune claire	-
	0.30	Visible	Rose claire	Jaune claire	-
	0.37	Visible	Rose claire	_	-
	0.48	Visible	Bleu blanc fluorescent	Jaune claire	Jaune blanc
	0.59	Visible	Bleu claire	-	Jaune blanc
	0.64		Rose claire	-	-
	0.69		Jaune pale	-	Jaune blanc
	0.73		Rose claire	-	-
	0.82		Bleu blanc fluorescent	-	-
	0.88		Bleu blanc fluorescent	Jaune claire	Jaune blanc

11. Analyse par HPLC des extraits méthanoliques de *T. ciliatus*

Les extraits méthanoliques (EMeOH) de *T. ciliatus* obtenus à différents stade de croissance (par macération), ont été analysés par HPLC, afin de comparer leur profil chromatographique.

Les profils chromatographiques des extraits méthanoliques sont représentés dans la figure 53.

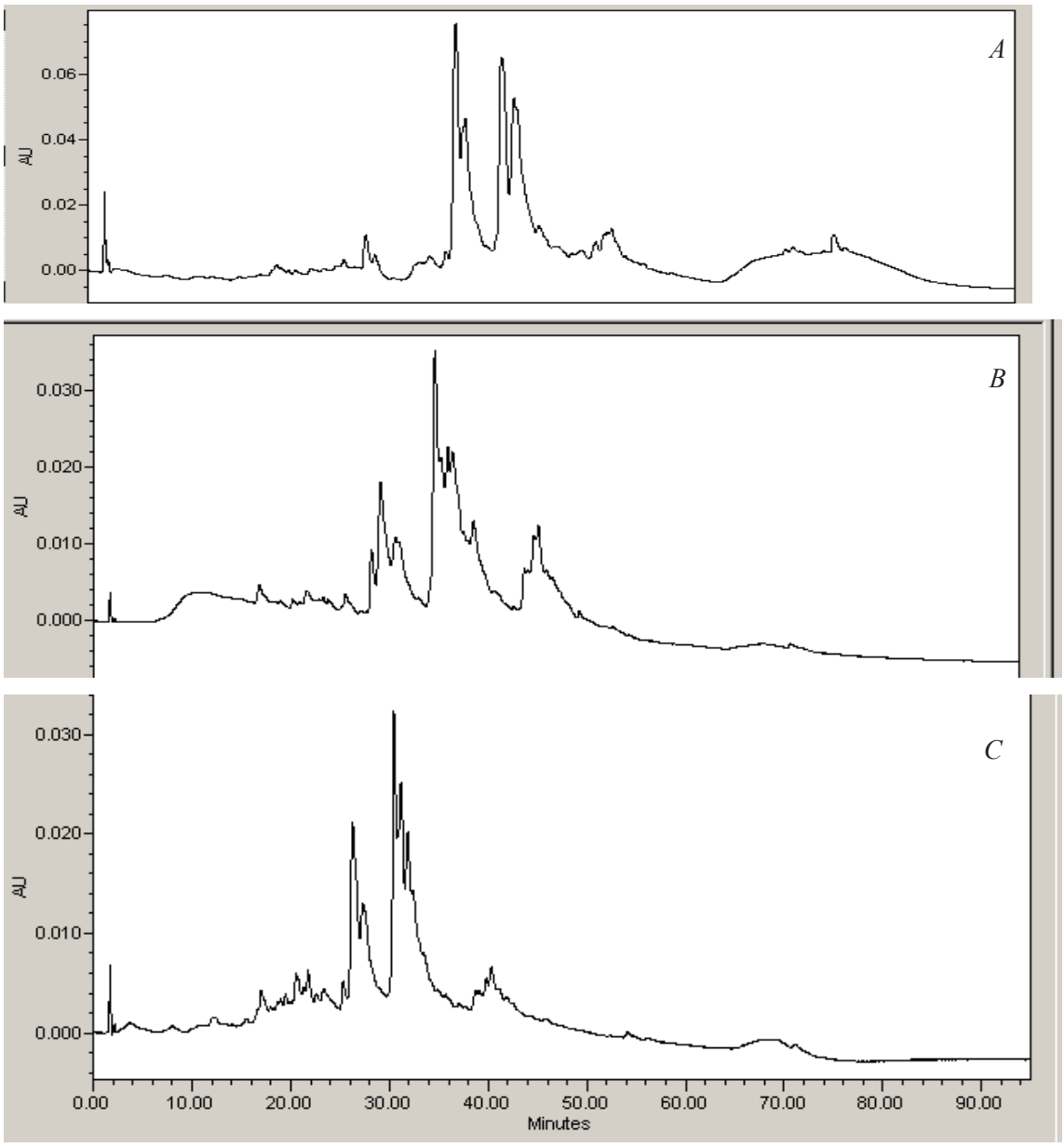


Figure 53 : Profils chromatographiques des extraits méthanoliques par HPLC

A : avant floraison ; B : floraison ; C : après floraison

Chaque profil chromatographique a révélé la présence de plusieurs molécules (quatorze) dans nos extraits avec des différents temps de rétention. Cette variation dans la composition peut justifier en partie les résultats obtenus (PPT et activité antioxydante).
La comparaison des temps de rétention des standards (Annexe 4), avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes a permis l'identification probable d'un flavonoïde (Quercétine) dans EMeOH après floraison (Tr : 40mn).
On dénote également la dominance de cinq pics majorirtaires avec des différents temps de rétention ; cependant un pic majeur a été retrouvé dans l'EMeOH AvF et l'EMeOHF (Tr : 38,5mn), un autre pic majeur retrouvé dans l'EMeOHF et l'EMeOHApF avec Tr : 31mn. L'analyse qualitative des extraits méthanoliques sera complétée ultérieurement.

12. Analyse des composés isolés par RMN.

Les investigations phytochimiques menées sur les deux extraits méthanoliques (EMeOH F et EMeOH F-S) sélectionnés suite à un criblage biologique, ont permis d'isolé deux molécules CMA et CMB

- CMPA : a été obtenu sous forme de poudre jaunâtre, soluble dans le Méthanol et se colore sur CCM en orange après révélation au réactif de NEU.
- CMPB : a été obtenu sous forme de poudre blanchâtre, soluble dans l'eau, et se colore en jaune fluorescence après révélation au réactif de NEU.

Afin d'élucider la structure de ces composés des analyses ont été effectuées dans le laboratoire de Chimie général, Organique de l'Université de Mons-Belgique.
Les spectres RMN (^{1}H ; ^{13}C ; Cosy ; HSQC) du composé CMA sont représentés dans les figures(54,55).Les spectres RMN (^{1}H ; ^{13}C (DEPT) ; Cosy ; HSQC) du composé CMB sont illustrés dans les figures(56,57). L'analyse des données sera compléter ultérieurement.

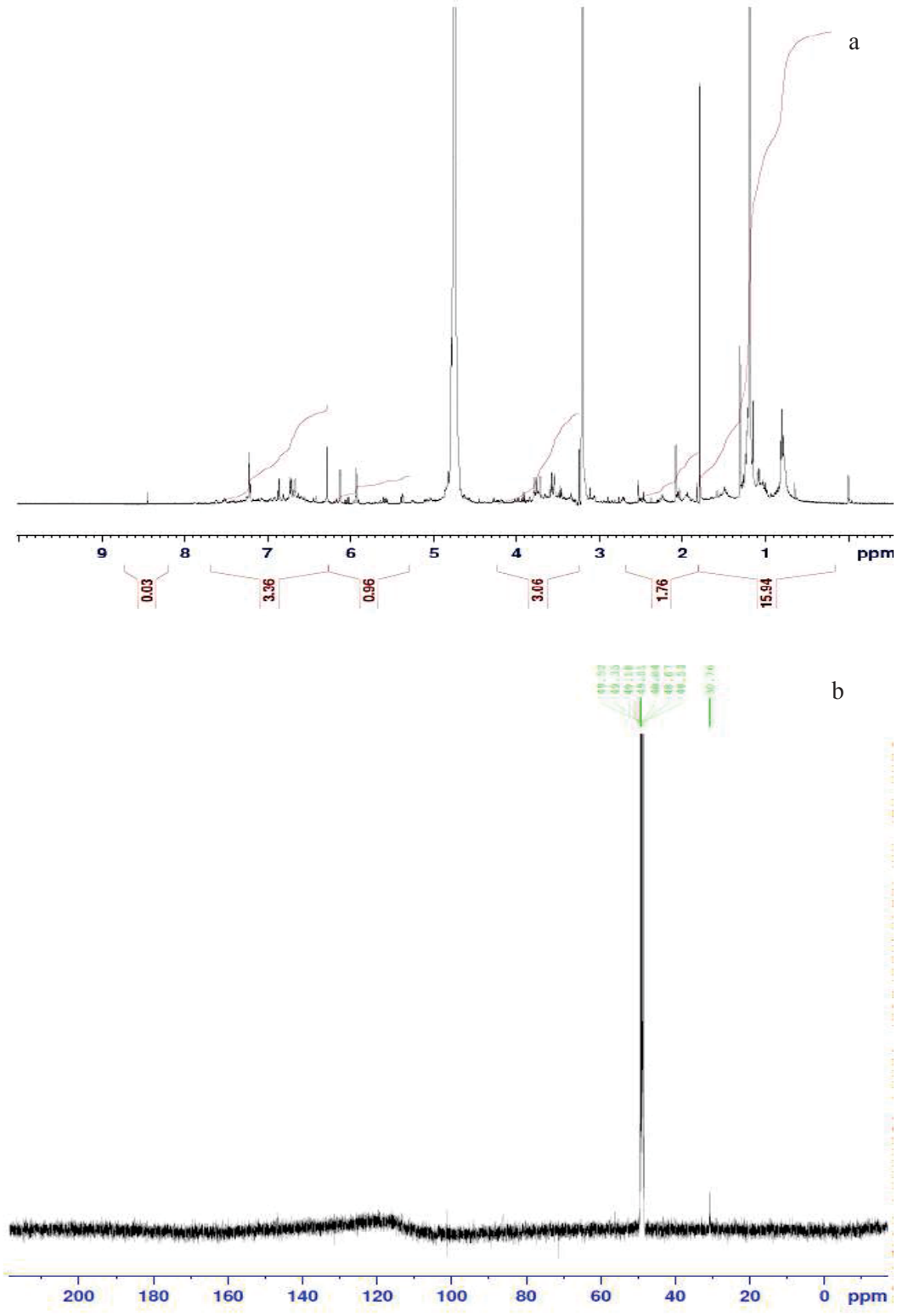


Figure 54 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz- MeOH-*d*) **(a)** ; Spectre RMN ^{13}C (125 MHz-MeOH-*d*) (b) du composé CMA

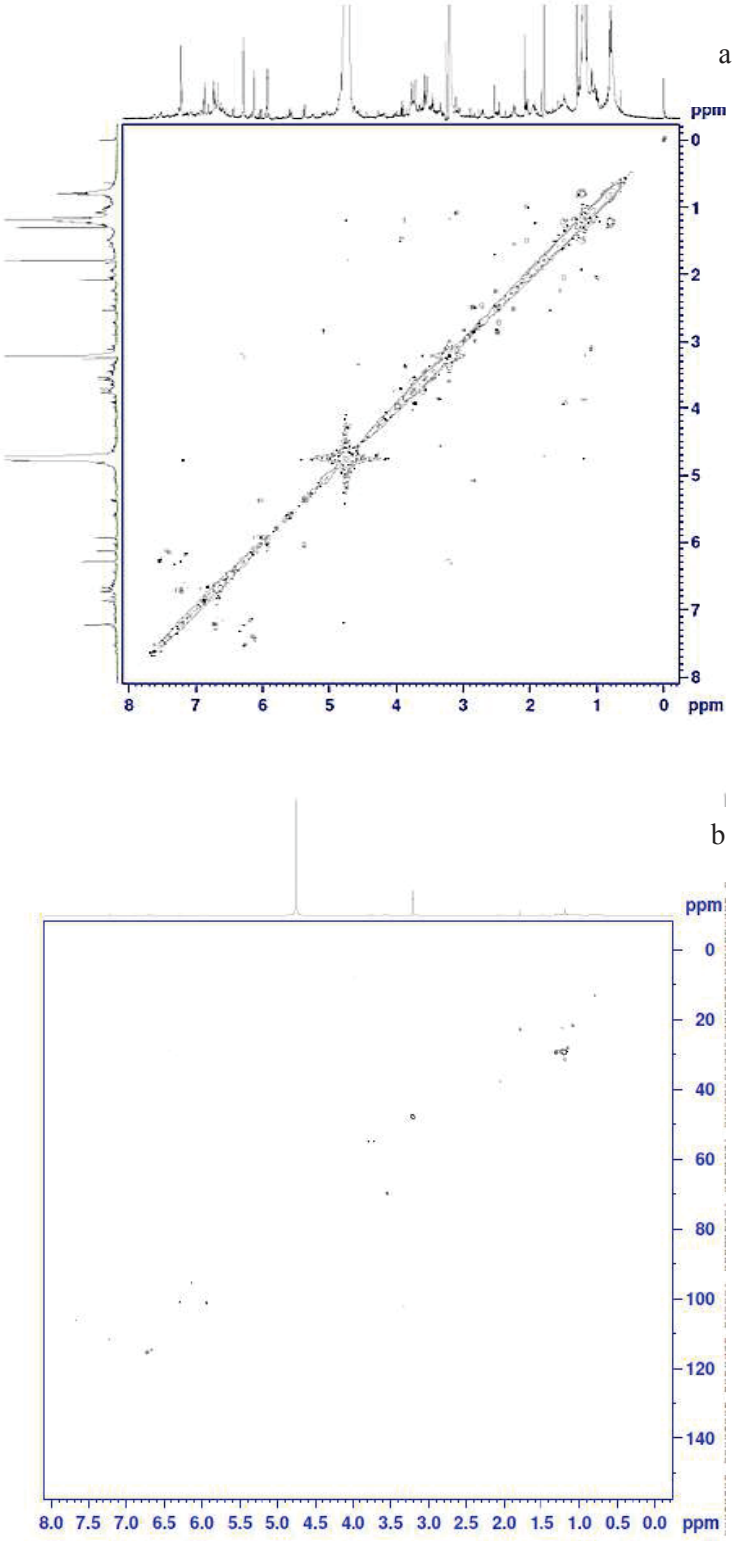


Figure 55 : Spectre de corrélation Cosy (a); HSQC du composé CMA(b)

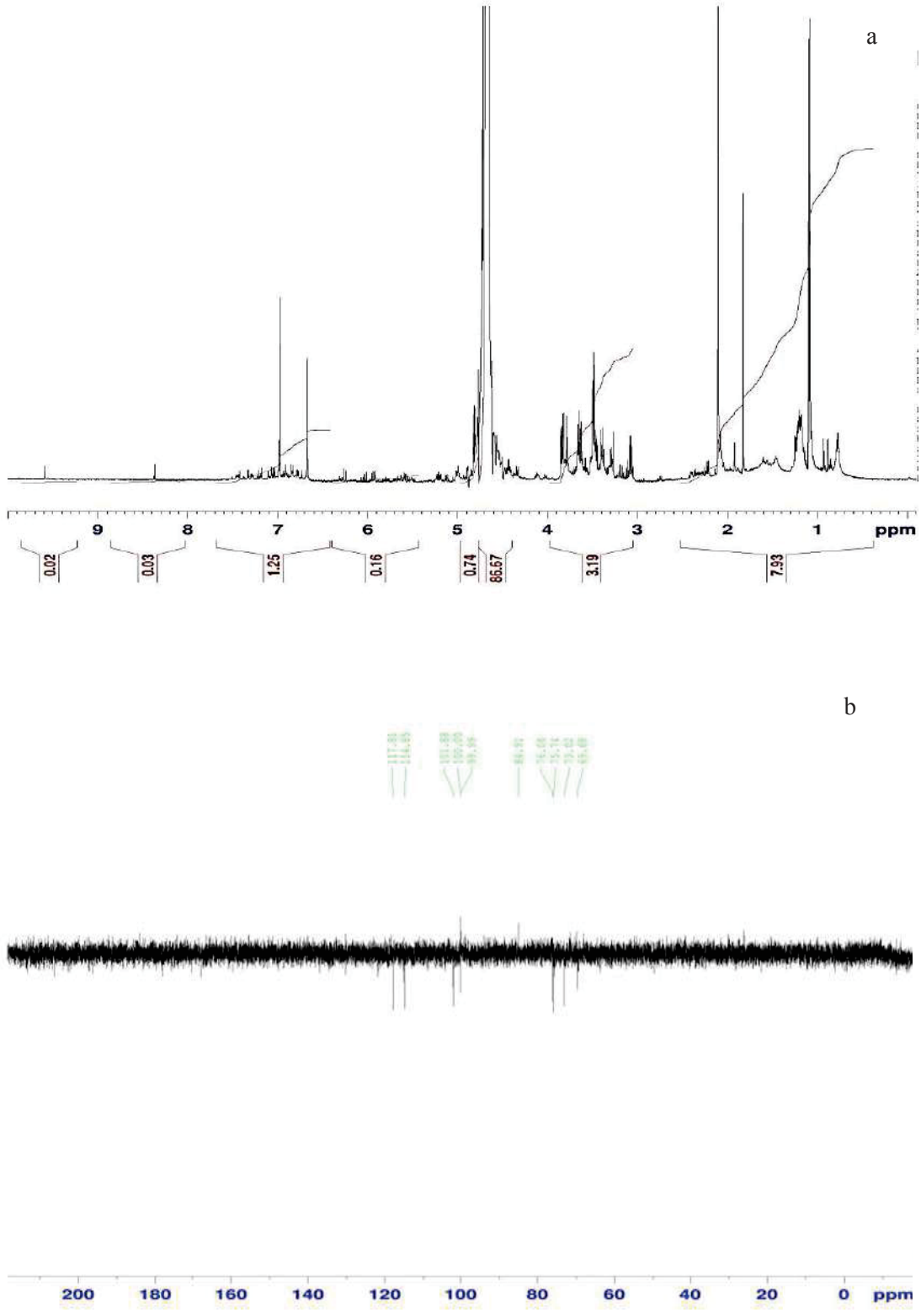


Figure 56 : Spectre RMN ^{1}H (500 MHz- H_2O-*d*) **(a)**; Spectre RMN ^{13}C (DEPT) (125 MHz- H_2O-*d*) (b) du composé CMB

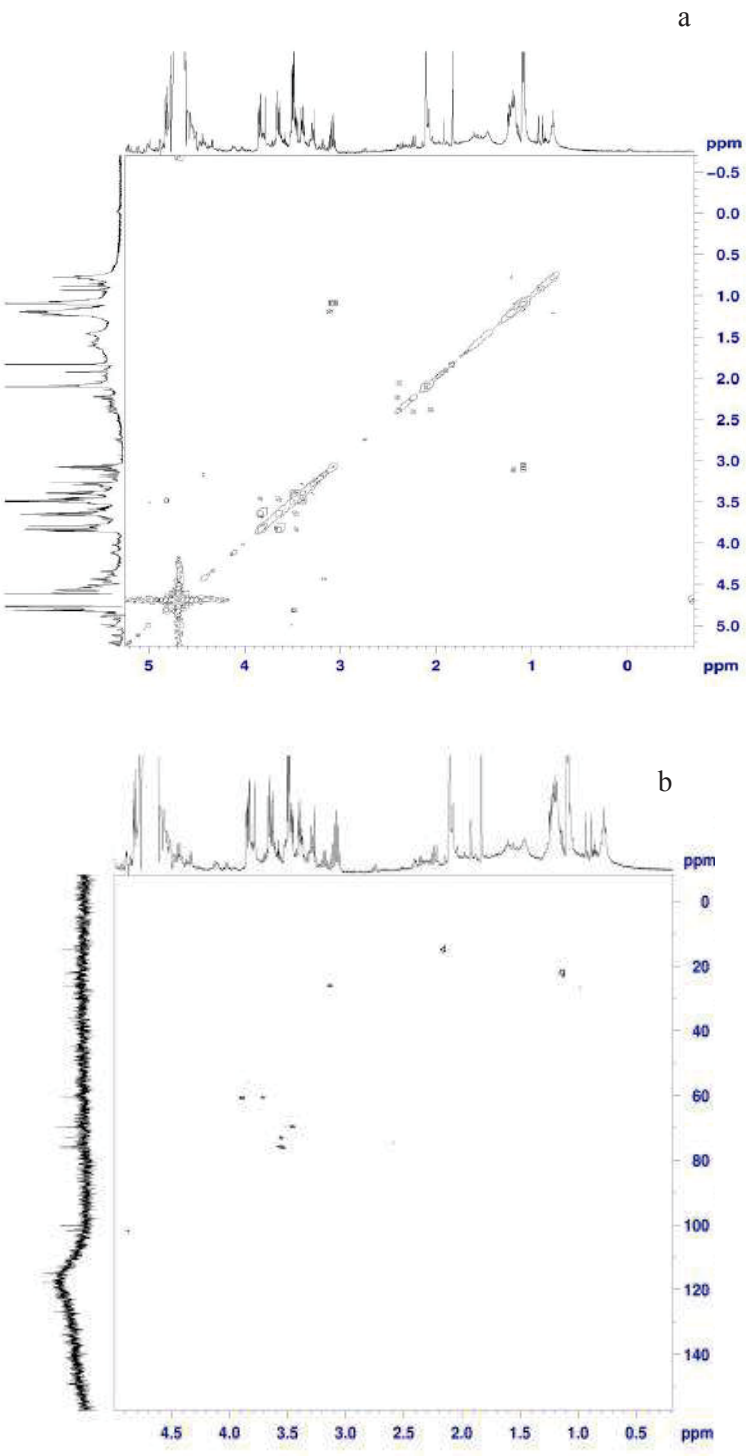


Figure57 : Spectre de corrélation Cosy (a); Spectre HSQC (b) du composé CMB

13. Histologie de *T. ciliatus*

A fin de compléter l'identification de *T. ciliatus*, nous avons effectuées une étude anatomique pour localisé les organes de sécrétions des huiles essentielles.

13.1. Tige de *T. ciliatus*

L'observation des coupes transversales de tige de *Thymus ciliatus* aux différents stades « avant floraison, pendant floraison et après floraison » au microscope optique à différents grossissements (X100 et X400) (Fig.58), nous a permis de ne distinguer aucune différence sur le plan anatomique, d'ailleurs on a distingué la forme quadrangulaire qui caractérise les tiges des labiées **(Speranza et Calzoni, 2005).** On observe de l'extérieur vers l'intérieur les tissus caractéristiques d'une tige secondaire à symétrie axiale, on constate deux zones : la zone d'écorce et le cylindre central. Ce dernier est la partie qui prédomine avec le xylème.

Le revêtement de la tige est constitué d'une strate de tissu épidermique (EP) qui possède une épaisseur plus ou moins large en raison de son importance pour la protection des tissus internes. Il est constitué par une seule assise de cellules plongées et jointives. Ce tissu est protégé par la cutine qui le rend imperméable au contact avec le milieu externe. L'épiderme porte de nombreux poils tecteurs pluricellulaires (PT), qui sont à l'origine d'une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation. **Speranza et Calzoni, (2005)** rapportent que les poils de protection sont constituées de cellules mortes et, de ce fait, ils ne contiennent que de l'air. Leur masse soyeuse réfléchit en grande partie les rayons solaires et leur enchevêtrement dense réussit à retenir, à l'abri de l'épiderme, une couche d'air qui se sature lentement d'humidité au lieu d'être rapidement renouvelée. Contrairement à la feuille ; l'épiderme de la tige porte de rares poils sécréteurs.

La zone corticale est occupée par un tissu de parenchyme appelé parenchyme cortical (PC), nous notons la présence de paquet de collenchyme aux quatre angles de la tige, ce qui lui donne l'aspect quadrangulaire, c'est un tissu de soutien du type collenchymateux (Co) constitué des cellules de forme arrondie à parois cellulosique. A partir de strate de l'endoderme (Ed) commence le cylindre central, l'endoderme correspond à la partie la plus interne du cortex (écorce) dans les jeunes tiges constituées d'une seule couche de cellule. Plus la plante devient âgée, plus l'endoderme se lignifie.

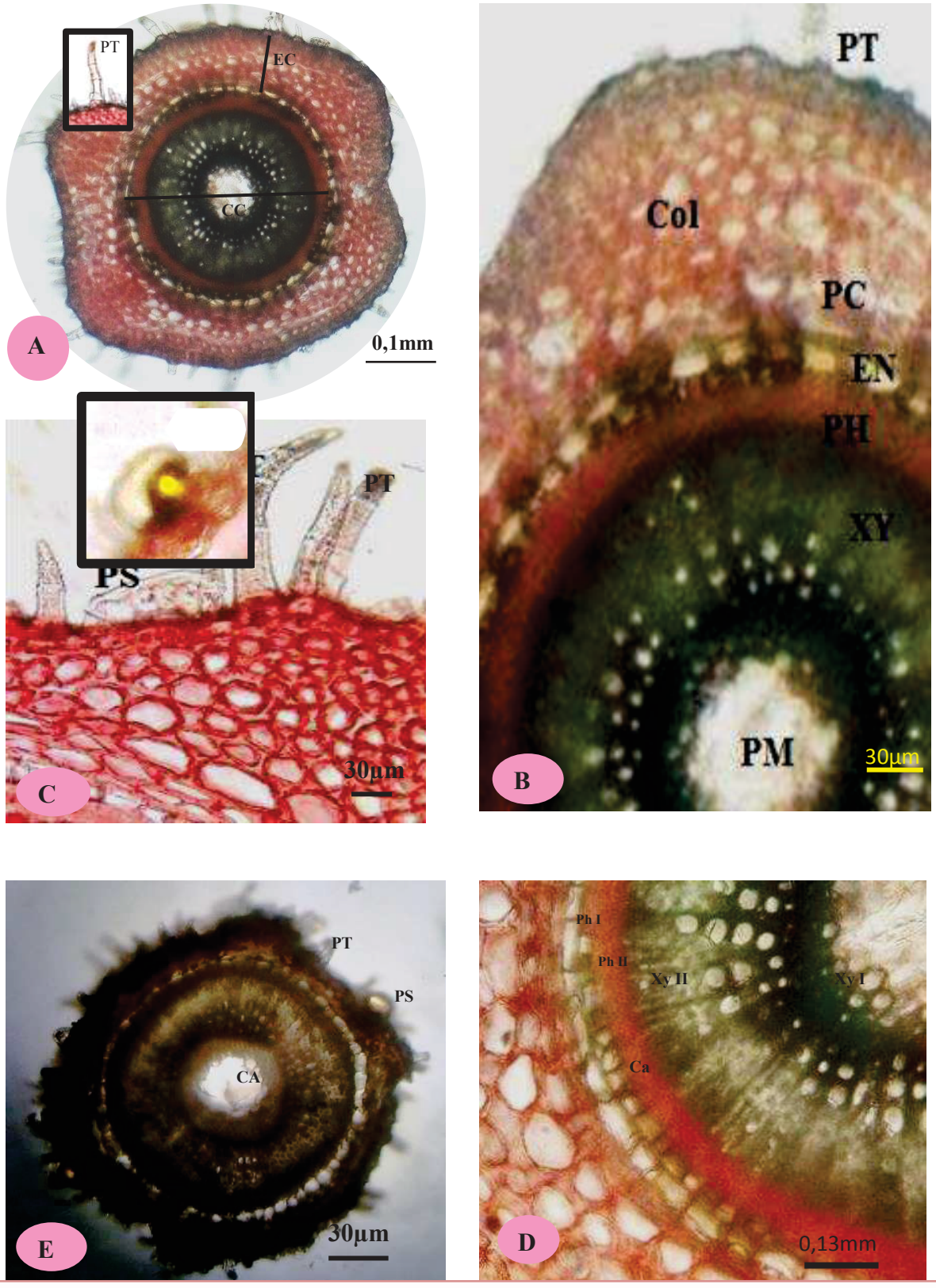


Figure 58: Coupe transversale de la tige de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* observée au microscope optique (GX100 : X400) ; **A** :vue d'ensemble (X100) ; **B** :détail (X400) ; **C**:Cortex (X400) ; **c** : **PS** :poil sécréteur(X400) ; **D** :cylindre central(X400) ; **E** :Témoin (X100) *(**PT** :poil tecteur ; **Col** :collenchyme ; **PC** :parenchyme cortical ;**EN** : Endoderme ; **PH** :Phloème ; **XY** :xylème ; **PM** :parenchyme médullaire ; **EC** :écorce ; **CC** : cylindre central ; **Ca** : Cambium ; **CA** : Cavité)*

Le cylindre central est formé par le phloème (PH) (coloré en rose), et de xylème (XY) (coloré en vert) : ce dernier forme un réseau lignifié très important disposé sur un seul cercle, situé juste au-dessus de la moelle avec des petites cellules angulaires et circulaires caractérisées par une différenciation centrifuge. L'existence de tissus secondaires sous forme d'anneau (le cambium) produit du Xylème II et un peu de phloème II L'absence du liège et en modeste lignification d'ensemble sont autant d'arguments pour conclure au caractère herbacé de cette tige **(Boutin et *al*., 2010).**

Et en dernier, le parenchyme médullaire ou cylindre central (PM) qui est composé des cellules arrondies occupant le centre de la tige avec la présence de méats bien visible.

13.2. Feuille de *T. ciliatus*:

Observation des coupes transversales de la feuille de *Thymus ciliatus* aux différents stades « avant floraison, pendant floraison et après floraison » à différents grossissements (X100 et X400) (Fig.61) montre que la feuille est bifaciale, le limbe foliaire présente une symétrie dorco-ventral, d'ailleurs on a distingué de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants :

L'épiderme (EP) constitue la couche de cellules la plus externe recouvrant la feuille entière. Les cellules sont de forme allongée jointives, recouvertes d'une couche de cuticule, cette dernière présente des courbures sur la face inférieure et supérieure, dans les cavités se trouvent les poils glandulaires (la crypte pilifère)**.**

Poil glandulaire (PG) : C'est un poil composé ou pluricellulaires ancrés dans le limbe par une cellule pied rattachée à une cellule de l'épiderme. La cellule pied porte 8 cellules sécrétrices en couronne qui produisent l'HE, ce dernier s'accumule entre la paroi des cellules et la cuticule (poche), suite à une action mécanique ou une variation hygrométrique se déchire et libère l'essence qui se volatilise, cette organisation constitue une véritable glande (Fig.59) **(Franchomme et *al*., 2001)** .

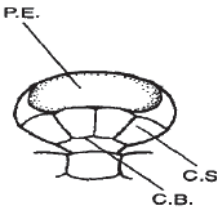


Figure 59 : Forme d'un poil glandulaire **(Franchomme et *al*., 2001)**

les poils sécréteurs occupent surtout la face supérieure, mais elles sont présentes au niveau de la face inferieure, ils sécrètent des essences volatiles dans l'évaporation produit un refroidissement ralentissant la transpiration, en plus les feuilles de petite taille (macrophylle) réduit la surface de transpiration **(Faurie et *al*., 2012)**, ils permettent à la plante de s'adapter au climat méditerranéen. Les essences volatiles pourraient également servir d'agents de dissuasion vis-à-vis des herbivores **(Hopkins, 2003).**

Ce type de poils glandulaires épidermiques est présent chez les autres espèces de la famille des lamiacées. Une expansion des cellules épidermiques forme aussi des poils tecteurs de type pluricellulaire (PT), Jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation.

Le mésophylle est hétérogène divisé en parenchyme palissadique et lacuneux. Le parenchyme palissadique **(PP)** à la face ventrale constituée de cellules allongées, parallélépipédiques, serrées les unes contre les autres, formant des assises continues ne présentant pas d'espaces intercellulaires. Ces cellules sont riches en chloroplastes, tandis que le parenchyme lacuneux**(PL)** à la face dorsale est constitué de cellules de forme lobé sont séparées par des grands espaces intercellulaires à partir desquels les gaz confluents vers les chambres sous stomatiques.

Entre les deux zones de mésophylle se trouve le système vasculaire représenté par les nervures. Ces derniers sont entourés d'une strate endodermique, et elle comprend faisceaux xylème et phloème et une gaine de sclérenchyme. Néanmoins ; cette feuille présente une particularité. Elle possède un endoderme qui est un tissu monostratifié, situé à l'intérieur de la feuille, suivi de Sclérenchyme qui forme une gaine qui enserre des minuscules faisceaux vasculaires, qui sont le Phloème (PH) : (= liber, = tissu libérien) tissu complexe formé de différents types de cellules criblées, servant à la distribution des éléments nutritifs, le Xylème (XY) : (= bois, = tissu ligneux) tissu complexe, composé de différents types de cellules mortes. Le collenchyme se caractérise par son remarquable développement sur les deux faces de la nervure principale, le collenchyme inférieur et le collenchyme supérieur.

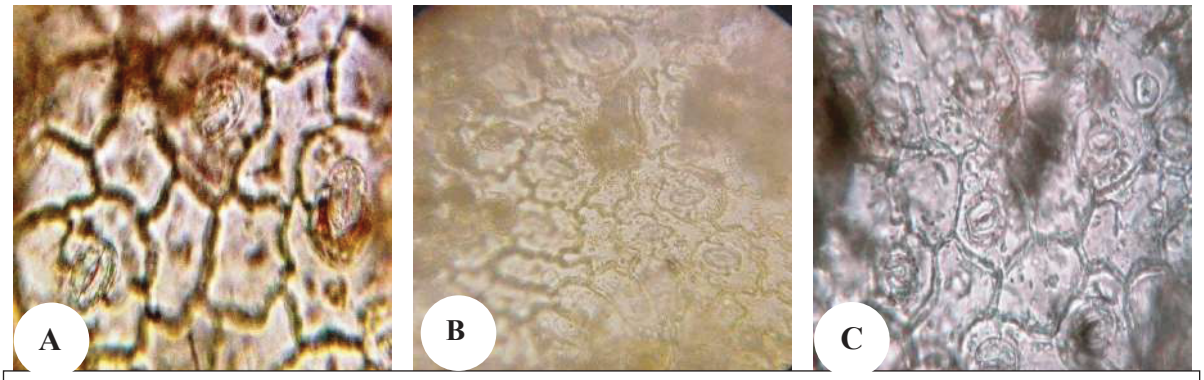


Figure 60: Observations microscopiques des stomates de feuille de *T. ciliatus* à différentes périodes de croissance (A : avant floraison ; B : floraison ; C : après floraison)

L'observation microscopique a montré un épiderme à stomate dialytique, à la face abaxiale. L'appareil stomatique est entouré de deux cellules. Les cloisons des cellules aboutissent sur la même cellule de bordure. Les deux cellules sont plus ou moins parallèles au stomate (Fig. 60). Elles sont de grandeurs inégales et la plus grande à tendance à recouvrir l'autre. Ceci est en accord avec ***Van* Cotthem, (1970)** qui dénote que ce type de stomate est présent chez les lamiacées, et sont détectés lors de l'examen microscopique de la poudre de *Thymus vulgaris* **(Bruneton, 2009)**.

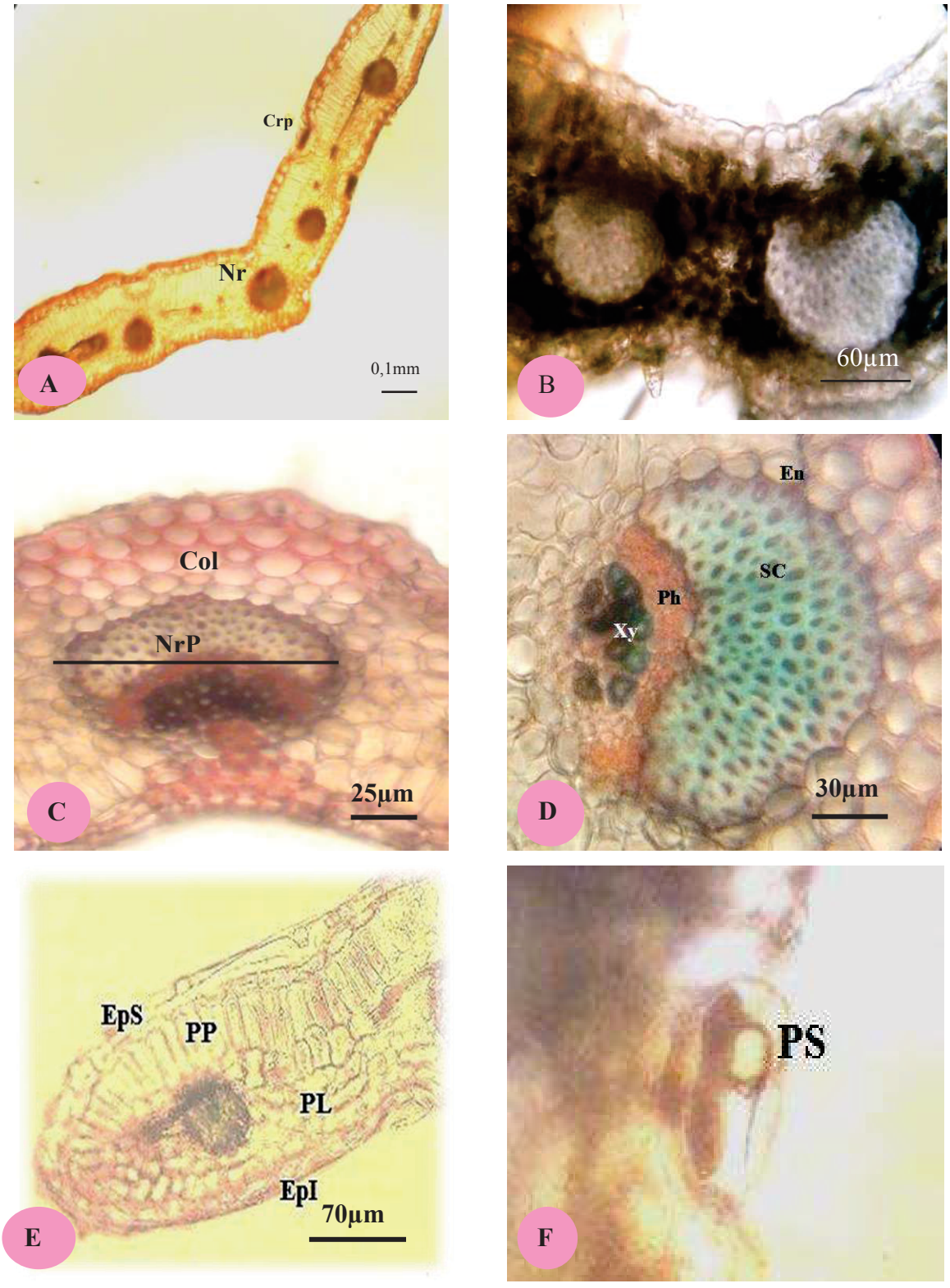


Figure 61: Coupe transversale de la feuille de *T. ciliatus* ssp. *colotatus* observée au microscope optique (GX100 : X400), **A** :vue général (X100) ; **B** :temoin (X400) ; **C** : nervure principal (X100) ;**D**: faisceau conducteur(X400) ; **E :** mésophylle ; **F** :poil glandulaire *(**Col** :collenchyme ; **EN** :endoderme ; **SC** :sclérenchyme ; **Xy** :xylème ; **Ph** :phloème ; **PS** : poil sécréteur ; **EpS** :épiderme supérieur ; **EpI** :épiderme inferieur ; **PP** :parenchyme palissadique ; **PL** :parenchyme lacuneux ; **Crp** : crypte pilifère ; **Nr** : nervure ; NrP : nervure*

Nous notons la présence des macles d'oxalate de calcium dans les feuilles de *T. ciliatus* **figure 62**, Ce sont des molécules de calcium, stockées dans le parenchyme sous forme de Macles, en effet ce type de stockage peut jouer le rôle de détoxification.

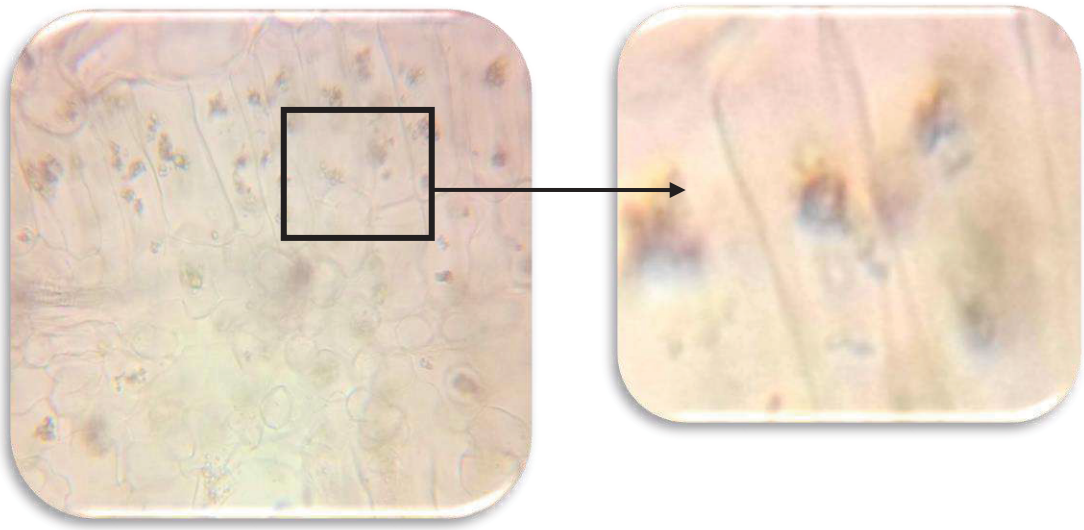


Figure 62 : Macle d'oxalate de calcium (GX400)

10.3. Etude histométrique

L'étude histologique, nous a permis de mieux connaître la structure anatomique. En outre, l'étude histométrique nous a permis la mesure des différents tissus.

D'après le tableau 29, on constate au stade de floraison les tissus atteignent leurs tailles maximales au niveau de la feuille.

Tableau 29 : Mesures histologiques de la feuille de *T. ciliatus* ssp *coloratus(µm)*

Tissus	AvF	F	AF
Poil glandulaire	26±6.99[b]	38,77±8,18[a]	37,77±6,67[a]
Poil tecteur	12,5±3,53[a]	14±6,99[a]	15±7,07[a]
Epiderme	21±3,94[a]	24±2,11[a]	24±3,94[a]
Parenchyme palissadique	72,5±6,77a	79±7,38a	71,5±8,18[a]
Parenchyme lacuneux	59,5±4,37[a]	55,5±7,21[a]	62±9,14a
Fibre péricyclique	59,5±5,50[a]	65±4,71[a]	58,95±6,32[a]
Phloème	24,5±3,68[a]	25±4,08[a]	26±4,59[a]
Xylème	24±3,16[a]	26,5±4,74[a]	26,5±3,37[a]

Dans chaque ligne ; Les valeurs sont une moyenne de dix essais±SD et portant même lettres ne sont significativement différentes (p > 0,05) avec le test de Tukey, . Av F : avant Floraison, AF : après floraison, F : floraison.

L'analyse de la variance a montré que les valeurs enregistrées, ne varient pas significativement d'une période à une autre (p>0,05), l'épiderme est de 15±7,07 à 21± 3,53 µm, le parenchyme palissadique est de 71,5±8,18 à 79±7,38 µm, le parenchyme lacuneux est de 55,5±7,21 à 62±9,14 µm, la fibre péricyclique de 58,95±6,32 à 59,5±5,50 µm, le phloème de 24,5±3,68 à 26±4,5 µm et de même pour le Xylème de 24±3,16 à 26,5±4,74 µm.

Cependant, les tailles des poils glandulaires varient significativement (p<0,05), elles sont de26±6.99 à 37,77±6,67 µm, cette variation est en relation avec la sécrétion des HEs qui augmente en période de floraison.

Les résultats obtenus lors de la comparaison histométrique de la tige de *T. ciliatus* aux différents stades développement de la plante sont regroupés dans le tableau30

On note une différence dans l'épaisseur des tissus d'un stade à un autre. Les dimensions des tissus renseignent sur l'état physiologique de la plante et sur les conditions dans lesquelles évolue le végétal (stress hydrique, action anthropique, pollution...)

Tableau 30 : Mesures histologiques de la tige de *T. ciliatus* ssp *coloratus (µm)*

Tissus	AvF	F	AF
Epiderme	10±00[a]	11±3,16[a]	11±3,16[a]
Poil tecteur	58±10,25[a]	42,7±11,47[b]	53±12,51[ab]
Parenchyme cortical	148±34,25[a]	152,5±30,57[a]	156±25,90[a]
Endoderme	19±5,67[a]	12,5±2,63[b]	16±5,16[ab]
Phloème	29±7,37[a]	31±6,14[a]	29±8,75[a]
Xylème	116,5±14,91[a]	131,1±39,37[a]	133±24,96[a]
Parenchyme médullaire	145,2±36,38[a]	170,5±29,19[a]	168±32,59[a]

Dans chaque ligne ; Les valeurs sont une moyenne de dix essais±SD et portant même lettres ne sont significativement différentes (p > 0,05) avec le test de Tukey, Av F : avant Floraison, AF : après floraison, F : floraison.

D'après le tableau 30, les valeurs varient significativement d'une période à une autre (p<0,05), les poils tecteurs avec une valeur la plus élevée en période de floraison (42,7±11,47µm**)** et la plus faible en période végétative (58±10,2µm), en plus l'endoderme aussi a présenté une variation avec une valeur la plus faible a été enregistrée en période de floraison (12,5±2,63µm) tandis que la plus élevée en période végétative(19±5,67µm) ; cependant l'épiderme, le parenchyme médullaire, le xylème, le phloème et le parenchyme cortical ne présentent pas de différence significative d'une période à une autre *(p > 0,05).*

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les Plantes Aromatiques et Médicinales constituent une grande source d'antioxydants et d'antibactériens naturels pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique,
Dans le but de rechercher de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique ; nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de deux plantes aromatiques de l'Est-algérien, *Pinus halepensis* Mill. et *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et de rechercher une éventuelle activité biologique.

Dans un premier temps, notre travail s'est consacré à mettre en évidence la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles. Les facteurs sont : la période et le lieu de récolte de la plante. Une extraction et une analyse qualitative et quantitative par CG/MS des huiles essentielles ont été réalisées.

Le rendement moyen de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. récoltées dans la région lac Mellah est de 0,81% est supérieur à celui de Zarouria (0,3%). L'analyse par CG/SM a montré qu'il y a une différence dans la composition chimique, avec prédominance du β-caryophyllène dans les deux HEs. Les rendements moyens en HE de la partie aérienne de *Thymus ciliatus* varient selon la période de récolte. En effet, selon les trois récoltes effectuées, le rendement le plus élevé et celui de l'HE après floraison**,** suivie de l'HE floraison puis avant floraison. L'analyse chimique par CG/SM, a montré qu'elles sont constituées essentiellement par les monoterpènes phénoliques dont : le thymol et le carvacrol, avec des taux inversement proportionnels pendant les trois périodes de récoltes et qui présentent des propriétés physicochimiques en accord avec celles de la littérature.

Les tests phytochimiques de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* ont mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins cathéchiques, des coumarines, des anthocyanes et des terpènes et stéroïdes.

la quantification des extraits de *T. ciliatus* par des méthodes de spectrophotométries, nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, et en flavonoïdes par le trichlorure aluminium. La teneur la plus élevée est observée au mois de juin dans l'extrait brut, quant aux extraits aqueux obtenus par macération, ils présentent des teneurs très faibles en PPT et Fl.

Concernant les extraits obtenus par des extractions successives par des solvants à polarité croissante (Hexane, dichloromethane, Methanol, eau) au cours de trois périodes de croissance, on a décelé que les extraits polaires avaient plus de composés phénoliques que les extraits apolaires. En plus, les résultats ont révélé que l'eau et le méthanol étaient de meilleurs solvants que les autres (Hex, DCM), d'ailleurs la teneur en PPT et Fl est maximale en période de floraison dans les extraits MeOH et AqsAS obtenus par extraction au soxhlet par rapport à ceux obtenus par macération. D'après nos résultats les teneurs en PPT semblent être influencées par le solvant d'extraction, et leur optimisation dépend de la méthode d'extraction (soxhlet). En outre, cela peut être dû à la variabilité de la composition chimique de chaque extrait. En effet, les profils des différents chromatogrammes obtenus par HPLC ont révélé la présence de nombreux composés avec des temps de rétention très variables, dont les pics majoritaires sont également variables d'un stade à un autre de l'extrait méthanolique.

L'étude de l'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée en employant deux méthodes : test du piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$, et la réduction du fer ; chacune cible un mécanisme d'action des antioxydants. On constate que tous les extraits obtenus en utilisant des solvants à polarité croissante (Hex, DCM, MeOH, AQ) et l'extrait du macéré aqueux (EAq) présentent un effet inhibiteur du radical DPPH$^{\bullet}$ et la capacité à réduire le fer, et elles varient au cours du développement de la plante. Effectivement, le test au DPPH révèle que ces deux extraits (AqAS, MeOH) sont les plus actifs comme piégeur du radical DPPH$^{\bullet}$ dont l'extrait aqueux qui a l'effet antiradicalaire le plus puissant, suivi par l'extrait méthanolique. Cependant, cette activité reste bien inférieure à celle retrouvée en présence de l'acide ascorbique, les mêmes extraits ont montré une bonne capacité à réduire le fer.

En outre, les HEs de *T. ciliatus* ont montré une activité antioxydante faible vis-à-vis du radical DPPH$^{\bullet}$ par rapport à celle de l'acide ascorbique, dont l'HE après floraison présentant la plus grande activité antioxydante, par contre elles sont plus actives dans la réduction du fer.

L'activité antimicrobienne évaluée par les tests *In vitro*, par la méthode de diffusion sur gélose ; montre que les HEs de *T. ciliatus* possèdent un pouvoir antibactérien important sur les germes multi- résistants responsables des maladies infectieuses et les souches de références. D'après l'aromatogramme, les trois HEs ont un large spectre d'inhibition,

agissant aussi bien sur les bactéries à Gram (+) que sur les bactéries à Gram (–), les zones d'inhibition dépassent le plus souvent 20 mm. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne et la composition chimique de l'HE. Les HEs à monoterpènes phénoliques se sont avérées plus efficace par rapport aux HEs à monoterpènes hydrocarbures de *Pinus halepensis*. Les valeurs des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) sont relativement moyennes pour les trois huiles essentielles de *T. ciliatus*. Les propriétés biologiques des huiles essentielles de manière globale seraient liées à la complexité de la composition chimique et la synergie entre les différents constituants. Ces résultats apportent des éléments de validation scientifique de l'usage traditionnel de ces espèces, pour leur activité antibactérienne.

Les résultats du criblage biologique préliminaire des extraits testés ont montré que les deux extraits MeOH et AqsAS obtenus en floraison ont été sélectionnés en vue d'une purification des composés actifs par les techniques classiques de chromatographie. Deux produits purs ont été obtenus et ils ont fait l'objet d'essais d'analyse en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Notre travail est consacré à l'étude anatomique de la tige et de la feuille de *T. ciliatus* à différentes périodes, A la lumière de nos observations, nous pouvons conclure que la feuille et la tige de *Thymus ciliatus* sont caractérisées par la présence de poils sécréteurs d'huile essentielle caractéristique du genre Thymus, avec une dominance des poils tecteurs au niveau de la tige. L'étude histométrique a montré qu'il n'y a pas de différence significative des tissus aux différents stades de croissance, excepté pour les cryptes dans la taille en rapport avec la synthèse des huiles essentielles. L'anatomie de la tige et de la feuille de *P. halepensis* Mill. a été rapportée dans mon mémoire de Magister **(Sadou, 2008).**

A l'issue de ce modeste travail, nous estimons d'avoir contribué à la valorisation de deux espèces médicinales d'Algérie à savoir *T. ciliatus* ssp. *coloratus* et *P. halepensis* Mill. par la caractérisation chimique et l'étude de l'activité biologique (antibactérienne et antioxydante). Cependant cette étude mériterait d'être poursuivie afin de répondre à des questions essentielles relatives à une exploitation industrielle selon les perspectives suivantes

- ✓ Approfondissement des propriétés thérapeutiques des HEs déjà mises en évidence, en étendant le champ d'investigation à différentes souches pathogènes, et en déterminant les mécanismes d'action de ces HEs.
- ✓ Des essais complémentaires seront nécessaires afin de trouver des formules pour l'utilisation des propriétés antibactériennes de ces huiles essentielles dans les domaines pharmaceutique, et cosmétique.

Des Fractionnements et purifications des extraits aqueux après les solvants afin de connaitre la où les molécules à l'origine des effets antioxydants et la détermination structurale des molécules isolées grâce à la combinaison de certaines méthodes d'analyse chimique, spectrophotométriques (UV, RMN, SM), chromatographiques (CCM, HPLC, MS).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abi-Ayad M., Abi-Ayad FZ., Lazzouni HA., Rebiahi S.A., Ziani-Cherif C., Bessiere JM.2011. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*. V(5), pp. 5433-5436.

Abu-shanab B., Adwan G., Abu-safiya D., Jarrar N., Adwan k. 2004. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*. V (28), pp. 99-102.

Adams R.P., 2001. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured. Ed.Carol Stream. USA. 454p.

AFNOR. 2000 « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR. Paris, pp. 661-663.

Albano S. M., Miguel M.G. 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. V(33), pp.1-6.

Al-Fatimi M., Wurster M., Schröder G. and Lindequist U. 2010. In vitro Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). *Records of* . *Natural product*. V (4), pp. 449-463.

Al-Jadidi H.S.K., Hossain M.A. 2015. Studies on total phenolics, total flavonoids and antimicrobial activity from the leaves crude extracts of neem traditionally used for the treatment of cough and nausea. *Journal of basic and applied sciences.* V (4), pp. 93-98.

Ali-Shtayeh M.S., Abu Ghdeib S.I. 1999. Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes, *Mycoses, PubMed* .V(42), pp. 665-720.

Allemand P. 1989. Espèces exotiques utilisables pour la reconstitution du couvert végétal en région méditerranéenne. Ed. *Institut National de la Recherche Agronomique*.Paris, pp.47-53.

Al-Majedy Y.K., Al-Duhaidahawi D.L., Al-Azawi K.F., Kadhum A.A.H., Al-Amiery A.A., Mohamad A.B. 2016. Coumarins as Potential Antioxidant Agents Complemented with Suggested Mechanisms and Approved by Molecular Modeling Studies. *Mol-ecules*. V (21), pp. 1-11.

Al-Reza S.M., Rahman A., Lee J., Chul Kang S. 2010. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*.V
(119), pp. 981–986.

Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M., Chaouch A. 2011. Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*. V(9), pp.149-157.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Aarab L., El Ajjouri M., Guedira A. et Chaouch A. 2013. Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Bot. Gallica,* V(4), pp. 513-523.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A. 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* V(1), pp.141-148.

Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., Ajjouri M.B., Antry S.B., Chaouch A. 2006. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytotherapie. Pharmacogniosie.* V(6), pp. 342-347.

Amrouni S., Touati M., Hadef Y., Djahoudi A. 2014. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa*VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*. Springer-Verlag, pp.1-5.

Amzad- Hossain M., Zhari I., Atiqure R. and Sun Chul K. 2008. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And Products*. V (7), pp. 328-334.

Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T. 1996. Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*. V (28), pp. 65-180.

Andersen O. M., Markham K. R.2006. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1197p.

Aniszeweski T. 2007. Alkaloids: secrets of life, alkaloid chemistry, Biological significance, applications and ecological role. Ed. Elseiver. Amsterdam. 337p.

Aouni M., Pelen F., Soulimani R. 2013. Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*. V(11), pp. 225-236.

Atanasova M., Ribarova F. 2009. Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de génie industriel*. V(4), pp. 21-25.

Atanasova M., Ribarova F. 2009. Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits secs des feuilles des bouleaux argentés bulgares (*Betula pendula*). *Revue de génie industriel*. V(4), pp. 21-25.

Audigié Cl., Dupont, G., Zonszain, F. 1985. Principe des méthodes d'analyse biochimique. Ed. Doin, Paris , 190 p.

B

Babior B-M., Lambeth J-D., Nauseef W. 2002. The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*. V(397), pp. 342-344.

Bahorun T. 1997. Substances naturelles actives : La flore mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council*, mauritius. pp.83-85.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* . V(46),pp. 446-475.

Bardeau F. 2009. Les huiles essentielles. Propriétés et utilisations de l'aromathérapie. Ed. Lanore. France, pp.22-35.

Barkat M., Laib I. 2011. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. *Revue de Génie Industriel* . V(6), pp. 46-54.

Barouki R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Revue médecine /science* . V(22), pp.266-272

Baser K.H.C., Buchbauer G. 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and
Applications, Ed. CRC Press ; Taylor and Francis Group*, LLC*. New York. 995p.

Bekhechi C., Bekkara F. A., Abdelouahid D.E., Tomi F. and Casanova J. 2007. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil. Research*. V (19), pp. 594-596.

Belaiche P.1991. Historique et prescription en aromathérapie. Encycl. Méd. Nat .Paris. C-1, 20p.

Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. Ed. IBS Press, Saint-etienne, 764p.

Belmalha S., El Idrissi M., Amerchrouq A., Echchgadda G. 2015. Caracterisation chimique de certaines espèces de Thym Marocain du moyen atlas (region de midelt). *Global Journal of pure and Applied Chemestry Research*. V(3), pp.45-52.

Beloued A. 2005. Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des publications universitaires.
Alger, 284p.

Benabid A. 2000. Flore et écosystème du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. Ed. Ibis Press, Paris, pp.159-161.

Benayache F., Boureghda A., Ameddah S., Marchioni E., Benayache F. and Benayache S. 2014. Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret**.** *Der Pharmacia Lettre*. V (6), pp.50-54.

Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol*. V(43), pp.149-154.

Benchabane O., Hazzit M., Mouhouche F., Baaliouamer A. 2015. Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arab.j.Sci.Eng*. V(40), pp.1855-1865.

Ben El Hadj Ali I., Bahri R., Chaouachi M., Boussaïd M., Harzallah-Skhiri H. 2014. Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. Origans. *Industrial Crops and Products*.V(62), pp. 188–195.

Benhammou N., Bekkara F.A. and Coustard J.M. 2009. Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* (de Noë) and *Thymelaea microphylla* from Algerian sahara.V(4),pp.194-201.

Benhammou N., Bekkara F.A., PanovskaT.K. 2009[b]. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus. C. R. Chimie*. V(12) ,pp.1259-1266

Benmeziane F., Djemai R., Cadot Y., and Seridi R .2014. Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes (*Vitis vinifera)* ;*International Food Research Journal*; V(3), pp.1061-1065.
.

Bentouati A., Oujehih B., and Alatou D. 2005. Croissance en hauteur dominante et classes de fébrilité du Pin d'Alep (*Pinus halepensis Mill*.) dans le massif de Oued-Yakoub et des Beni-oudjana (Khenchela-Aures), *Revue Sciences &Technologie* . V(23), pp..57-62.

Benyoucef E., Yahyaoui N., Khelfaoui A. et Aid F. 2005. Water distillation Kinetic study of spearmint essential oil and of its major components. *Flavors and Fragrance*. V(20), pp. 30-33.

Bhat S.V., Nagasampagi A.B., Sivakumar M. 2005. Chemistry of natural products. Ed. Springer, Berlin, pp. 585-657.

Bidgoli R. D., Heshmatia G. A. and M. Pessaraklib. 2014. Influence of Extraction Method and Solvent on Antioxidant Properties of Extracts of *Artemisia Aucheri* Plant from Kashan Province of Iran. *Journal of Plant Nutrition*.V(37), pp.1424-1432.

Birt D.F., Hendrich S., Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacology & Therapeutics. V(90), pp.157-177.

Bonnier G.1990 : La grande flore en couleur. Ed. Belin. Paris, p.3254

Bougandoura N., Bendimerad N. 2013.Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta*(L.)Briq. *Revue Nature* &Technologie, N(9), pp.14-19.

Boughendjioua H., Djeddi S. et Seridi R. 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Thym essential oil wild-growing in Algeria. *European Journal of Scientific Research.* V (120), pp.293-302

Bouharmont J., Masson P.L., Van Hove C. 2011. Biologie. Ed. De Boeck. Bruxelles, pp. 808-810.

Bouhdid S., Abrini J., Baudoux D., Manresa A., Zhiri A. 2012. Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan : pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *J Pharm Clin* ; N 31 V(3), pp. 141-148

Boukhebti H., Chaker A. N., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M., Laouer H. et Harzallah D., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Scholars Reserch Library.Der pharmacia Lettre*. V(3). pp. 267-275.

Boulanouar B., Abdelaziz G., Aazza S., Gago C., Miguel M.G. 2013. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*. V(46), pp. 85-96.

Boullard B.2001. Plantes médicinales du monde. Croyances et réalités.Ed. Estem, 638p**.**

Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. V(105), pp. 146–155.

Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F., Ksouri R. 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia .Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, V(28), pp.1649-1655.

Bousmaha L., Atik Bekkara F., Tomi F. and Casanova J. 2007. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res*.V (19),pp. 490-493.

Boutin b., Fogelgesang J.F., Beaux J.F., Ribola F.2010. Atlas de Biologie Végétale. Ed. Dunod. Paris, p128.

Bowles E.D. 2003. The Chemistry of Aromatherapeutic Oils. Ed. Allen&Unwin. Australia, 256p.

Braithwaite A., Smith F. J. 1999. Chromatographic Methods. Ed. Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.

Brahmi N., Scognamiglio M., Pacifico S., Mekhoukhe A., Madani K., Fiorentino A., Monaco P. 2015. ^{1}H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. *Food Research International*. V(76), pp. 334-341.

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C . 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*. V(28), pp25-30

Brosse j. 2000. Larousse des Arbres et des Arbustes. Ed. Larousse bordas. Paris, 320p.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. TEC & DOC. 2ème édition, Paris,1120p.

Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. TEC& DOC. 4éme édition, Paris, 1270p.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. V(94) ,pp.223-253

C

Cecchini T. 2003. Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Vecchisa, Paris, 351p.

Chebaibi A., Rhazif F.F., AmineA., Zerhouni M. 2011. Effet bactericide (in vitro), des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multiresistantes aux antibiotique. *Phytothérapie*.V(9), pp.158-164.

Cheikh-Rouhou S., Hentati B., Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Attia H. 2006. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Alleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food Sciences and Technology International*. V(12), pp.407-415.

Cheng S. S., Liu J. Y., Chang E. H. et Chang S. T. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. V(99), pp. 5145-5149

Chermat S. and Gharzouli R. 2015. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *Journal of Materials Science and Engineering*.V(5),pp. 50-59.

Cheurfa M., Allem R., Sebaihia M., Belhireche S. 2013. Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. *Phytothérapie*. V(11), pp.154-160.

Chikhoune A., Stouvenel L., Iguer-Ouada M., Hazzit M ., Schmitt A., Lorès P., Wolf JP., Aissat K., Auger J., Vaiman D., Touré A. 2015. In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod Biomed Online*. V(3), pp.411-420.

Cillard J. and Cillard P. 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oilseeds and fats,Crops and lipids*. V(13), pp. 24-29

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.G. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. V(79), pp. 213-220.

Clos J. 2012. L'immunité chez les animaux et végétaux. Ed. lavoisier, Paris, pp. 74-77.

Collin S., Crouzet J. 2011. Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire Ed. Tec&Doc .lavoisier, Paris, pp.5-25.

Cosmulescu S. and Trandafir I. 2011. Seasonal variation of total phenols in leaves of walnut (*Juglans regia* L.) *Journal of Medicinal Plants Research.* V (5), pp. 4938-4942.

Cotelle N., Bernier, J.-L, Catteau, J.-P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou E.M. 1996. Antioxidant properties of hydroxy- flavones. *Free Radic. Biol. Med.*V(20),pp. 35-43.

Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.*V(**1**), pp. 569-590.

Couplan F. 2012. Les plantes et leurs noms: Histoires insolites. Ed. Quae. Paris.120p

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Micobial. Rev*. V (12),pp. 564 - 582.

Cuendet, M., Potterat, O., Hostettmann, K. 1999. Iridoïd glucosides, phenylpropanoid derivatives and flavonoids from *Bartsia alpine*. *Pharmaceutical Biology*. **V**(4), pp. 318-320.

Cushnie T.P.T, Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids; Review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. V(26), pp. 343-356.

D

Dacosta Y. 2003. Les phytonutriments bioactifs. Ed.Yves Dacosta. Paris. 317p.

Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. V (**23**), pp.174-181.

Deba F., Xuan T.D., Yasuda M., Tawata S. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Food Control*.V (19), pp. 346–352

Dif M.M., Benchiha H., Mehdadi Z., Benali-Toumi F., Benyahia M., Bouterfes K. 2015. Etude quantitative des polyphenols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*. V(13), pp. 314-319.

Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., et Traoré A., Coulibaly K. et Maïga A. **2004.** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R. Chimie*. V(10), pp.73-80.

Di Majo D., La Guardia M., Giammanero S., La Neve L. and Giammanco M. 2008. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemestry*. V(111), pp.45-46.

Djahra A.B., Bordjiba O., Benkherara S. 2013.Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie*. V(11), pp. 348-352.

Djeddi S., Yannakopoulou E., Papadopoulos K., **Skaltsa H.** 2015. Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie. *Afrique SCIENCE.* V(2), pp. 58-65.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. V(97), pp.654-660.

Djerrad Z., Kadik L., Djouahri A. 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*.V(74), pp. 440-449.

Dob T., Berramdane T. and Chelgoum C. 2005. Chemical Composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *ComtesRendus Chimie*. V(8), pp.1935-1945.

Dobignard A., et Chatelain C. 2012. Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Ed. Conservatoire et jardin botaniques. Suisse. Genève, 431p.

Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi hassani L.M., Badoc A., Gmira N., 2003. screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*V(142), pp. 61-78.

Dorman H.J.D. and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*.V(88), pp. 308-316.

Duraffourd C., Lapraz J.C. 2002. Traité de phytothérapie clinique : endobiogénie et médecine. Ed. Masson. Paris, pp.1-15**.**

Duraffourd C., Lapraz J-C. & Chemli R. 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. Ed. Grancher. Paris, 538p.

E

Edeas M. 2007. Les polyphenols et les polyphenols de thé. *Phytotherapie*. V(5), pp. 264–270.

El-Haci I.A., Atik-Bekkara F., Didi A., Gherib M., Didi M.A. 2012. Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*. V(10), pp.280-285.

El Ouariachi E.m ., Hamdani I., Bouyanzer A., Hammouti B., Majidi L., Costa J., Paolini J., Chetouani A. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* V(4), pp. 281-286

Essawi T., Srour M. 2002. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*.V(70), Issue 3, pp.343-349.

F

Fabrocini V.C. 2007. Comment se soigner avec l'aromatherapie et guérir : agitation,

anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations,etc. Ed. De vecchi, France, pp. 4-17.

Fadili K., Amalich S., N'Dedianhoua S.K., Bouachrine M., Mahjoubi M., EL hilali F., and Zair T. 2015. Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*; *International Journal of Innovation and Scientific Research.*V(17), pp. 24-33.

Faurie C., Ferra C., Medori P., Dévaux J., Hemptine J.D. 2012. Ecologie « approche scientifique et pratique ». Ed.Tec&Doc, 6ème ed, Paris, 467p.

Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Revue l'Actualité chimique*. N(270), pp. 108-115.

Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaïb F., Merghache D., El Amine M., Djabou N., Muselli A., Tabti B., Costa J. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pac J Trop Dis* . V(4), pp. 97-103

Fisher K., Phillips C. 2009. In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J.Biomed. Sci.* V(**66)**, pp.180-185.

Fleurentin J., Hayon J.C., Pelt J.M. 2008. Plantes médicinales : Traditions et thérapeutique. Ed.Ouest-France, France, Rennes, 189p.

Flores N., Jiménez I.A., Giménez A., Ruiz G., Gutiérrez D., Bourdy G., Bazzocchi I.L. 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. *Phytochemistry*. V(5), pp. 621-627.

Franchomme P., Jollois R., Pénoel D. 2001. L'aromathérapie exactement, fondements, demonstation, illustration, et application d'une science médicale naturelle. Ed. Roger. Jollois. Paris, 491p.

Fylaktakidou K.C., Hadjipavlou-Litina D.J., Litinas K., Nicolaides D.N. 2004. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des*. V(10), pp. 3813-3833.

G

Gaamoune S., Nouioua W., Khaled A., Ouffroukh A. 2015. Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. *Scholars Research Library*. V(7), pp.358-363

Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F., Gabarrou J.F. 2013. Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim.* V (1), pp.13-24.

Gadow von W.A., Joubert E., Hansmann C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem.* V(60), pp. 73-77.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? . *Revue l'actualités chimique*. N(270), pp. 91-96

Garnero J.1991. Les Huiles Eessentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Encycl. Méd. Nat .Paris. C-2, pp.1-12

Gaussen H., Leroy J. F., & Ozenda P. 1982. Précis de Botanique Végétaux supérieurs. Tome2. Ed. Masson. Paris, pp.52-74.

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

Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M.C., Bousselsela H., Oueld-Mokhtar S.M. 2015. Polyphénols totaux, activités antioxidante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. V(13), pp.118-129

Ghedira k. 2005. Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie , Pharmacognosie*, Springer. V(4), pp.162-169.

Ghorab H. , Kabouche A. , Semra Z., Ghannadi A. , Sajjadi E.B. , Touzani R.and Kabouche Z. 2013. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. *Scholars Research Library* ; *Der Pharmacia Letter* .V (1), pp.28-32.

Ghorab H., Kabouche A., Kabouche Z. 2014. Comparative compositions of essential oils of Thymus growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* V(1), pp. 298-303.

Giordani R., Hadef Y., Kaloustian J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*. V(79), pp. 199-203

Giweli A. A., Džamić A. M., Soković M. D., Ristić M. S., Marin P. D. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Central European Journal of Biology*.V(8). pp.504-511

Gocer H., Gulcin I. 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **V**(62), pp. 821-825.

Goetz P. et Ghedira K. 2012. Phytothérapie anti-infectieuse. Ed. Sringer-Verlag. Paris. 364p.

Gonçalves S., Gomes D., Costa P., Romano A. 2013. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. V (43), pp. 465-471

Gourine N., Yousfi M., Bombarda I., Nadjemi B., Gaydou E. 2010. Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *j.Am.Oil Chem Soc* .V(87). pp. 157-166

Guignard J.L. et Dupont F. 2004. Systématique moléculaire. Ed. Masson.Paris,pp.234-237

Guignard J.L.2000. Biochimie végétale. Ed. Masson. Paris, pp.182-246.

Güçlü-Ustündağ Ö and MAZZA G. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Food Science and Nutrition.* V(47), pp.231-258.

Guo Y.Q., Liv J.X., Lu Y, Zhu W.Y., Denman S. E., McSweeney C.S. 2008. Effect of tea saponins on methanogenesis, microbial community structure and expression of*mcr* A gene, in cultures of rumen microorganisms. *Letters in Applied Microbiology.* V(47), pp. 421-426.

H

Haddouchi F., Lazouni A.H., Meziane A. et Benmansour A.2009. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. V (9), pp. 246-259.

Harborne J. et Williams C. 2000. Advances in Flavonoid Research since 1992. Phytochemistry, V(55), pp. 481-504.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Charpelle J.P. 2007. Les stress oxidant. *Rev Med Liége.* V(62), pp.628-638.

Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. V (**52)**, pp.253-265.

Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology.* V(86), pp. 985-990.

Hammiche V. 2015. Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie* .V(13), pp. 358-372.

Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry.* V (116), pp. 714-721

HeimD K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* V(10), pp.572-584.

Helander I.M., Alakomi H.N., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid I., Gorris L.G.K., Wright A.V. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* V(46), pp. 3590-359.

Henaoui S.E.A., Bouazza M. 2013. Contribution a une étude morpho-histométrique de *cistus ladaniferus subsp. africanus* dans la région de Tlemcen (Algérie occidentale). *European Scientific Journal*. V (9), pp. 336-356.

Hlava B., Posprsil E., & stary F. 1984. La beauté par les plantes. Ed. Grund , Paris ,172p.

Hmamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M., Bessiere J. M. 2001. Chemical and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Five Moroccan Pinaceae. *Journal of Essential Oil Research.*V(13), pp. 298-302.

Hullard F. 1988. Abrégé de Phytothérapie. Ed., Masson, Paris, pp. 6-13.

Högberg D. L., Magiorakos A-P., Heuer E.O., Monnet D.l. 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: regional pooling of national data from a small number of sites can be misleading. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*. V(80), pp90

Hopkins W.G. 2003. Physiologie végétale ,2 ème Ed., Ed. Deboek. Bruxelle. 515p.

Houghton P. J. and Raman A. 1998. Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Ed. Chapman et Hall, Londre, 1ère éd., pp.29-31.

Hyldgaard M., Mygind T., and Meyer R.L. 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components.Front Microbiol.V(3), pp.1-24.

I

Ilić B.S., Kocić B.D., Ćirić V; M., Cvetković O. G., and Miladinović D. L. 2014. An In Vitro Synergistic Interaction of Combinations of *Thymus glabrescens* Essential Oil and Its Main Constituents with Chloramphenicol. *The Scientific World Journal*, Article ID 826219, 12 pages http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/826219/

Iserin P. 2001. Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soin 2ième edition; Ed. Larousse/VUEF, 335p.

J

Jerkovic I., MastelicJ., Milos M. 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. hirtum grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science & Technology*. V(36), pp.649-654.

K

Kabran G. R., Ambeu N'ta C., Mamyrbékova-Békro J. A., Békro Y.A. 2011. CCM D'extraits Selectifs de 10 Plantes Utilisees Dans leTraitement Traditionnel du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research.*V(63), pp. 592-603.

Kadri N., Khettal B., Yahiaoui-zaidi R., Barragan-Montero V., Monteroa J.L. 2013.

Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial Crops and Products*. V (51), pp. 116-122.

Kadri N., Khettal B., Adjebli A., Cresteil T., Barragan-Montero V., Montero J.L. 2015 . Anticancer properties of polar lipid, fraction of *Pinus halepensis* mill. seeds *Colloque International sur la Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales de la Méditerranée CIPAMM 2015, 11-12 Novembre 2015, Blida.*

Kaibeck J. 2013. Les huiles végétales, c'est Malin.Ed.Quotidien Malin, pp.26-27.

Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr.Med. Chem.*V(10), pp. 813-829

Kaloustrian J., Hadji-Minaglou F. 2012. La connaissance des huiles essentielles qualitologie et aromathérapie. Ed.Springer-Verlag. France, Paris, 207p.

Kang D-G., Yun C-K ., Lee H-S. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea.Journal of Ethnopharmacology. V(87), pp. 231-236.

Kanko C., Sawaliho BE., Kone S., Koukoua G., N'Guessan YT. 2004. Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie*.V(7), pp. 1039-1042.

Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus reolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* V(76), pp. 183-186.

Kaudum S., Lebreton P., Fady B. 1998. Geographical variability of *Pinus halepensis* Mill. As revealed by foliar flavonoids. *Biochemical Systematic and Ecological*. V(26), pp.83-96

Kheyar N., Meridja D., Belhamel K. 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products*.V(2), pp.18-26.

Kholkhal F., Lazouni H. A., Bendahou M., Boublenza I., Sari Daoudi C. et chaouch T. 2013. Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus ciliatus ssp. coloratus*. *Afrique Science*. V (1), pp.151-158.

Kholkhal F. 2013b. Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp c*oloratus* et ssp euciliatus. Thèse de doctorat. Université Abou bekr belkaid. Tlemcen. Algérie

Kim O-D., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.Y., and Lee C.Y. 2003. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem*, V (51), pp 6509-6515.

Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. 2010. How antibiotics kill bacteria : Microbiol. V(8), pp.423-435.

Köksal E., Bursal E., Gülçin I., Korkmaz M., Çağlayan C., Gören A.C. And Alwasel A.S. 2016. Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Turkish Thyme (*Thymus vulgaris*) Monitored by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*. http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1168438

Koleva I., Niederländer H.A.G., Beek van T.A. 2000. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Anal. Chem.* V (72), pp. 2323-2328.

Kouch M., Bennadja S., Djahoudi A., Aouadi S. 2014. Antipseudomonal Activity of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. V (25), pp.149-153.

Kouch M. 2015. Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale endémique algérienne « *Thymus numidicus* Poiret ». Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar – Annaba, 118p.

Kruma Z., Andjelkovic M., Verhe R., Kreicbergs V. 2008. Phenolic compounds in basil, oregano and thyme; 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology. Foodbalt, Jelgava, LLU, pp.99-103.

Kulšic T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. 2006. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* V (4), pp. 485-492.

L

Lacoste S. 2014. Ma bible de la phytothérapie. Ed.Quotidien Malin, Paris. 639p.

Laib I. 2012. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Revue Nature & Technologie*. N(7), pp.40-52.

Lambert R.J.W. , Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.-J.E. 2001.A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. V(91), pp. 453-462

Leclerc H. 1994. Précis de phytothérapie : essais de thérapeutique par les plantes françaises**.** Ed. Masson,6ème édition. Paris, 257p.

Le Cren F, 2004. les antioxydants, la révolution du XXIe siècle, 2eme édition. Ed. Québecor, 223p.

Lee S. K., Mbwambo Z. H., Chung H., Luyengi L., Gamez E. J. C., Mehta R. G., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. V(1), pp. 35-46.

Lee K.W., Everts H., Beynen A.C., 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poult. Sci.* V(3), pp. 738-752.

Levine R.L. 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, V(32), pp. 790-796

Loizzo M.R., Tundis R., Conforti F., Saab A.M.,Statti A.G. et Menichini F., 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry*. V(105),pp. 572-578.

M

Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Maccioni S. and Ansaldi M. 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P.pinaster* and *P.nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance*. V(18), pp. 139-143.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.192p.

Mahfoudhi A., Prencipe F.P., Mighri Z., Pellati F. 2014. Metabolite profiling of polyphenols in the Tunisian plant *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *J Pharm Biomed Anal*. V(99), pp.97-105.

Mahmoudi Y. 1984. La thérapeutique par les plantes les communes en Algérie. Ed. Palais du livre, Blida, 84p.

Maire R. 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Encyclopedie Biologique. Paris, pp.129-150.

Maison J. 2012. Le thym. Ed. Marabout. France, Paris, 128p.

Marino M., Bersani C., Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* . V(62), pp. 1017-1023.

Martin P. 2014. Les familles des plantes à fleurs d'europe **:** botanique systématique et utilitaire. Ed. Press Universitaire de Namur.Belgique,Namur,128p.

Martin S., Andriantsitohaina R. 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. V(51), pp.304-315

May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L. 2000. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* V(45), pp. 639-643.

Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R. 2004. Botanique, Biologie et physiologie végétale. Ed. Maloine.France, Paris, 461p.

Meena M.R. et Sethi V.1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *Food Science and Technology*. V(31),pp. 68-70.

Mendham J., Denney R.C., Barnes J.D., Thomas M. 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. Ed. Deboek&larcier s.a. Bruxelle.Belgique.855p.

Migdal C. et Serres M. 2011 . Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant . *Revue médecine/sciences*.V(27), pp. 405-412

Miguel G., Simoes M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Carvalho L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius, Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina. Food Chemistry*. V (86), pp.183-188

Mirjalili M.H., Salihi P., Senboli A., Vala M.M. 2006. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of natural compounds*. V (42), pp. 19-23.

Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* V(85), pp.231-237

Moghaddam M., Pirbalouti A.G., Mehdezadeh L., Pirmoradi M. R. 2015. Changes in composition and essential oil yield of *Ocimum ciliatum* at different phonological stages. *Eur Food Technol*. V(240), pp.199-206.

Morand C., Milenkovic D. 2014. Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*.V(42), pp.47-62

Morales R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. Ed. Taylor & Francis, London. pp.1-43.

Moro - Buronzo A. 2008. Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien- Etre. Ed.
Hachette pratique, pp.14.

Mpondo E., Yinyang J., Dibong S.D. 2015. Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*. V(85), pp.7804-7823.

Multon J.L. 1991. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Ed.Lavoisier, Paris, 496p.

Muthumperumal C., Stalin N., Das A.K. and Swamy S.P. 2016. Chemical profiling of leaf essential oil, Antioxidant potential and Antibacterial activity of *Syzygium lanceolatum* (Lam.) Wt. &Arn. (Myrtaceae). *Free Radicals and Antioxidants*. V(6), pp.13-22.

N

Nabavi M.S., Marchese A. , Izadi M. , Curti V., Daglia M., Nabavi S.F. 2015. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*. V (173), pp. 339-347.

Naczk M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal*. V (41), pp. 1523-1542.

Nahal I. 1986. Taxonomie et aire géographique des pins du groupe halepensis .Options Méditerranéennes, Série Etude CIHEAM 86/1

Naidu A.S. 2000. Natural Food Antimicrobial Systems.Ed. CRC Press, Florida, 818p.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11,Wayne, PA, USA.

Nezhadali A., Nabavi M., Rajabian M., Akbapour M., Pourali P., Amini F. 2014. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University J. of Basic and Applied Science*. V(3), pp. 87-92.

Nickavar B., Alinaghi A. and Kamalinejad M. 2008. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five Mentha Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* . V (7), pp. 203-209.

Nijveldt R. J., Nood van E., Hoorn van D.E., Boelens P. G., Norren Van K., Leeuwen van P. A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* V(74), pp. 418-425.

Normak H. B. and Normak S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*. V(252), pp. 91-106

O

Okoh O.O., Sadimenko A.P., Afolayan A.J. 2010.Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry.* V(120), pp. 308-312

Orhan I.E. 2012. Biotechnological *Production of Plant Secondary Metabolites.* Ed.Bentham. ebooks, Turkey, 252p.

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition.* V (44), pp. 307–315

Ozgen M., Reese R.N., Tulio Jr A.Z., Scheerens J.C., Miller A.R. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method for measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2˩ -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* V(54), pp. 1151-1157.

Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E. and Topcu G. 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chem.* V(103), pp. 623-630.

P

Pal Singh H., Mittal S., Kaur S., Batish D.R., Kohli R. K. 2009. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of Artemisia scoparia. *Food Chemistry* V(114), pp. 642-645.

Patri G. and Silano V. 2002. Plants in cosmetics: Plants and plant preparations used as ingredients for cosmetic products - Volume 1. Ed. Council of Europe, Strasbourg, 218p.

Paris M. et Hurabielle M. 1981. Abrégé de Matière Médicale : Pharmacognosie. Tome I. Ed. Masson, Paris, pp.1-248.

Paris R.R. et Moyse H. 1976. Matière Médicale. Tome I. 2e Ed., Masson, Paris, pp.11-12.

Pasqualini V., Robles C., Garzino S., Greff S., Bousquet-Melou A., Bonin G. 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*. V(52) ,pp.239-248

Pereira O. R., Peres A.M., Silva A.M.S., Domingues M. R.M., Cardoso S.M. 2013. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International.* V (54), pp. 1773-1780.

Pharmacopée Belge 6.0 .1982 .V.4.5.8

Pharmacopée Europeenne 5.0em edition ,2005. 2747p.

Picman A.K., Schneinder E.F., Picman J. 1995. Effect of flavonoids on mycelial growth of verticillium albo-atrum. *Biochemical Systematics and ecology*. V (**23)**, pp. 683-693.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. 2001. Antioxidants in food, Practical applications. .Ed. Woodhead Publishing .400p

Politeo O., Jukic M., Milos M. 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*. V (101), pp. 379-385.

Powers S.K., Jackson M.J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. V (88), pp.1243-1276

Q

Quezel P. et Santa S. 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 1087p.

Quezel P. 1986. Les pins du groupe "Halepensis". Ecologie, végétation, écophysiologie . *CIHEAM Options Méditerranéennes*, pp.11-23.

Quideau S.,Deffieux D., Douat-Casassus C., and Pouységu L.2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* V(50), pp.586-621.

R

Rahman A. 2005. Bioactive natural products. Part L. Ed. Elsevier. New York, pp.247-363.

Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H. S., Raherimandimby M., Danthu P. 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry* .V (114), pp. 680-684.

Rao G.G. 1998. Risk Factors for the Spread of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Drugs*. **V(55),** pp. 323-330.

Remy D. 2010. Les Mamites. Ed.Guide France Agricole. Paris, pp. 98-101.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. and Pridham J.B. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic, flavonoïds. *Free Rad. Res*. V (22), pp. 375-383.

Roby M.H.H., Sarhana M.A., Selima A.H.K., Khalel I.K. 2013. A Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. V (43), pp. 827-831.

Rolland Y. 2004. Antioxydants naturels végétaux. *Oilseeds and fats,Crops and lipids*. V(11), pp.419-424

Rota M. C., Herrera A., Martınez R. M., Sotomayor J. A., Jordan M.J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. V (19), pp. 681-687.

Roussis V., Petrakis P.V., Ortiz A. and Mazomenos E.B. 1995. Volatile constituents of needles of five Pinus species grown in Greece. *Phytochemistry*. V(39), pp. 357-361.

Roux D. 2008. Conseil en aromathérapie. Ed. *Wolters Kluwer*. France. 186p.

Ruberto G., and Baratta M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. V(69), pp.167–174.

S

Sadou N. 2008. Etude et caractéristique chimique de l'huile essentielle du genre *Pinus*, dans le PNEK. Mémoire de Magistère. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie. 80p.

Sadou N., Seridi R., Djahoudi A., Hadef Y. 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des Hcuiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse.* V (30), pp. 33-39.

Saeed N., Khan M.R., and Shabbir M. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. V (221), pp. 2-12.

Samouelian F., Gaudin V., Boccara M. 2009. Génétique moléculaire des plantes. Ed. Quæ. Paris, pp. 21-22.

Sanchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* V(8), pp. 121-137.

Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L., Echeverrigaray S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*. V(103), pp. 823-828.

Saoud I., Hamrouni L., Bouzid S., Khouja M.L. 2010. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Coridothymus capitatus* (L.)Reichenb.Fil. *Phytothérapie*. V(8), pp. 370-378

Sarikurkcu C., Arisoy K ., Tepe B., Cakir A., Abali G., Mete E. 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. V(47), pp. 2479-2483.

Sarker S.D., Kumarasamy Y., Shoeb M., Celik S., Yucel E., Middleton M., Nahar L. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of three Turkish species of the genus Centaurea. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* .V (5), pp. 246-250.

Sartoratto A., Machado A-L. M., Delarmelina C., FigueiraG.M., Duarte M-C. T., Vera L- G. R. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology***.** V(35), pp.275-280.

Sayout A., Bahi F., Ouknin M., Arjouni Y., Majidi L. and Romane A. 2015. Phytochemical screening and antioxidant activity of four Maroccan Thymus species: *T. broussenetti* Boiss, *T.pallidus* Batt, *T .leptobotrys* Marb and *T.maroccanus* Ball. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. V (1), pp.117-128.

Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldina M. 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemestry*. V (112), pp. 885-888.

Shi M.D., Shiao C.K., Lee Y.C., and Shih Y. W. 2015. Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Cell International*. V (15), pp.1-13

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., and Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autooxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V(40), pp. 945-948.

Silverstein R.M, Bassler G.C., Morill T.C., Larue E. 2004. Identification spectrométrique de composés organiques. Ed. De Boeck, Bruxelles, pp. 165-171.

Simos M., Bennett R.N. and Rosa E.A.S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat.Prod.Rep.*V(26), pp.746–757.

Singh S.B., Barrett J.F. 2006. Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* V (71), pp.1006-1015

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. V (16), pp. 144-158.

Sofowora A. 2010. Plantes Médicinales et médicine traditionnelle d'Afrique. Ed. Kharthala, Paris, 380p.

Solfo R.R., 1973. Etude d'une Plante Médicinale Malgache Buxus madagascarica Bail et ses variétés. Ed .O.R.S.T.O.M, 96p.

Spiridon L., Bodirlau R., TeacaC.A. 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*. V(6), pp.388-396.

Speranza A. and Calzoni G.L. 2005. Atlas de la structure des plantes. Ed. Belin, Paris.

Stahal-biskup E., et Saez F. 2003. Thyme : the Genus Thymus. Ed. CRC Press, London, 332p.

T

Tamert A., Latreche A. 2015. Activité antioxydante des extraits de six Lamiaceae aromatiques de l'Algérie occidentale. *Phytothérapie : Pharmacognosie*. V (13), pp. 1-7

Tassou C., Koutsoumanis K., and Nychas G. J. E. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. V (33), pp. 273-280.

Tazerouti F., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Favre- Bonvin J., Bobenrieth M.J. 1993. Analysis of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill. by gas chromatography and mass spectrometry. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. V (26), pp.161-176.

Teh S.S., Bekhit A.E., Birch J. 2014. Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants* .V (3), pp.67-80

Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. rosulans. *Journal of Food Engineering*. V (66), pp. 447-454.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. 2005b. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. V (90), pp.333-340

Thompson J.D., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y.B. and Ehlers B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*. V (29), pp.859-880

Tigaud S. 2004. Actualités en biologie, Quoi de neuf en matière de résistance aux antibiotiques?. *Biotribune*. V(10), pp.5-7.

Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia.* V(1), pp.98-106.

Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine.* V(17), pp.142-145

Torres de Pinedo A., Pen alver P., Morales J.C. 2007. Synthesis and evalution of new phenolic-based antioxidant : structure activity relationship. *Food Chemistry*. V(103), pp.55-61.

U

Ultee A., 2000. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus.* A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 97 p.

Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G. & Wegrzyn G. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*. V(184), pp. 271-278.

Urquiaga I.and Leighton F. 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*. V(33), pp.55-64.

Urquiza-Martínez M. V. and Navarro B.F.2016. Antioxidant Capacity of Food:Review. *Free Radicals and Antioxidants*.V(6), pp.1-12

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. V(39),pp. 44-84.

Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L. 1996. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* V (**20**), pp.331-342.

Van Cothem W.R.J. 1970. A classification of stomatal types. *Bot.J.Linn.Soc*. V(63), pp.235-246.

Vellas B. et Robert P. 2013. Traité sur la maladie d'Alzheimer. Ed. Springer-Verlag, France, Paris.439p.

Vermerris W., Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Ed. Springer.USA, pp.1-31

Verpoorte R. et Alfermann A.W. 2000. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Ed. Springer, Dordrecht, pp. 1-23.

Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parilla M.C. 2007. Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. V(71),pp. 230-235.

Viljoen A., Vuuren S. V., Ernst E., Klepser M., Demirci B., Baser H., Wyk van B.E .2003. *osmitopsis asteriscoides* (asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a cape-dutch remedy. *journal of ethnopharmacology*. V (88), pp. 137-143.

Vincent M.C.1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecin naturelle, phytothérapie, aromathérapie c-4, pp.6

Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., Abd ElRazik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A., Sendra E. 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. V (22), pp. 1715-722

W

Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*V(84), pp**.** 152-158.

Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T., Thubthimthed S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. V(76), pp233-236.

Wei A., and Shibamoto T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V (54), pp.1737-1742

Wichtl M. et Anton R. **2003**. Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2e Ed. TEC & DOC., Paris, pp.1-21.

Willem J.P. 2002. Les huiles essentielles, Médecine d'avenir. Ed. Dauphin. France. 311 p.

Wink M. 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; Annual Plant: Reviews 40. Ed. Blackwell, Oxford, pp. 1-23.

X

Xianfei X., Xiaoqiang C. et Shunying Z.G., 2007. Rev. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China, Rev.*Food Chemistry*. V(100), pp.1312-1315.

Xie Y., Zheng Y., Dai X., Wang Q., Cao J., Xiao J. 2015. Seasonal dynamics of total flavonoid contents and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora*. *Food Chemistry*. V (186), pp.113-118.

Xu J., Zhou F., Ji B. P., Pei R. S., Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol*.V(47), pp.174-179

Y

Yang J., Guo J., Yuan J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT*. V (41), pp. 1060-1066.

Yang J., Chen C., Zhao S., Ge F., Liu D. 2014. Effect of solvents on the antioxidant activity of walnut (*Juglans regia L.*) shell extracts. *Journal of Food and Nutrition Research.*V(2), pp.621-624.

Yen G.C., Chen H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.* V (43), pp.27-32.

Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V (49), pp. 4083-4089.

Yi Z., Yu Y., Liang Y., and Zeng B., 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT.*V(41), pp. 1060-1066.

Yi Z., Yu Y., Liang Y., and Zeng B. 2008b. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT.* V(41), pp. 597-603.

Z

Zengin G , AktumsekA., Guler G.O., Cakmak Y.Z. and Yildiztugay E. 2011. Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty Acid Composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. hayekiana Wagenitz. *Rec. Nat. Prod.* V (5), pp. 123-132

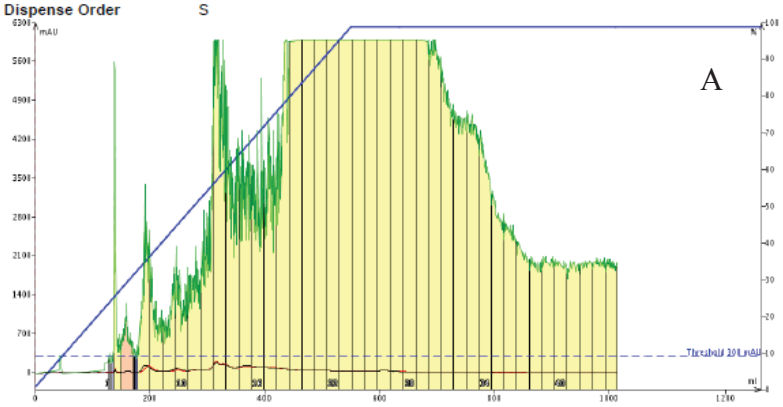
Zhiri A., Baudoux D. 2005. Les huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir development. Luxembourg. 80p.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* V(64), pp.555 - 559

Annexes

Annexe 1 : Programme de fractionnement des extraits méthanoliques de *T. ciliatus* (A: E **AcOEt** F-S, B : EMeOH F).

Comment			
Cartridge	SNAP 25g	Detection Mode	External
Flowrate	24 ml/min	UV1 (Monitor)	254 nm
Solvent A	Chlorofom	UV2 (Monitor)	280 nm
Solvent B	Methanol	Start Threshold	300 mAU
Rack Type	16x150 mm		
Max Fraction Volume	22 ml		
Dispense Order	S		

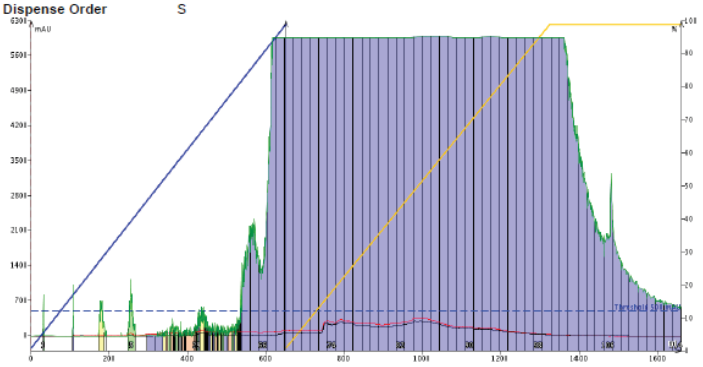


Gradient

	Solvents	Mix	Length (ml)	
Equil.	A/B	0%	115	flowrate 24 ml/min
1	A/B	0% - 100%	550	
2	A/B	100%	84	
3	A/B	100%	375	Edit on the fly
4	A/B	100%	252	Auto Extend

Comment			
Cartridge	SNAP 25g	Detection Mode	External
Flowrate	24 ml/min	UV1 (Monitor)	254 nm
Solvent A	n-Hexane	UV2 (Monitor)	280 nm
Solvent B	Ethyl acetate	Start Threshold	500 mAU
Solvent C	Methanol		
Rack Type	16x150 mm		
Max Fraction Volume	22 ml		
Dispense Order	S		

B

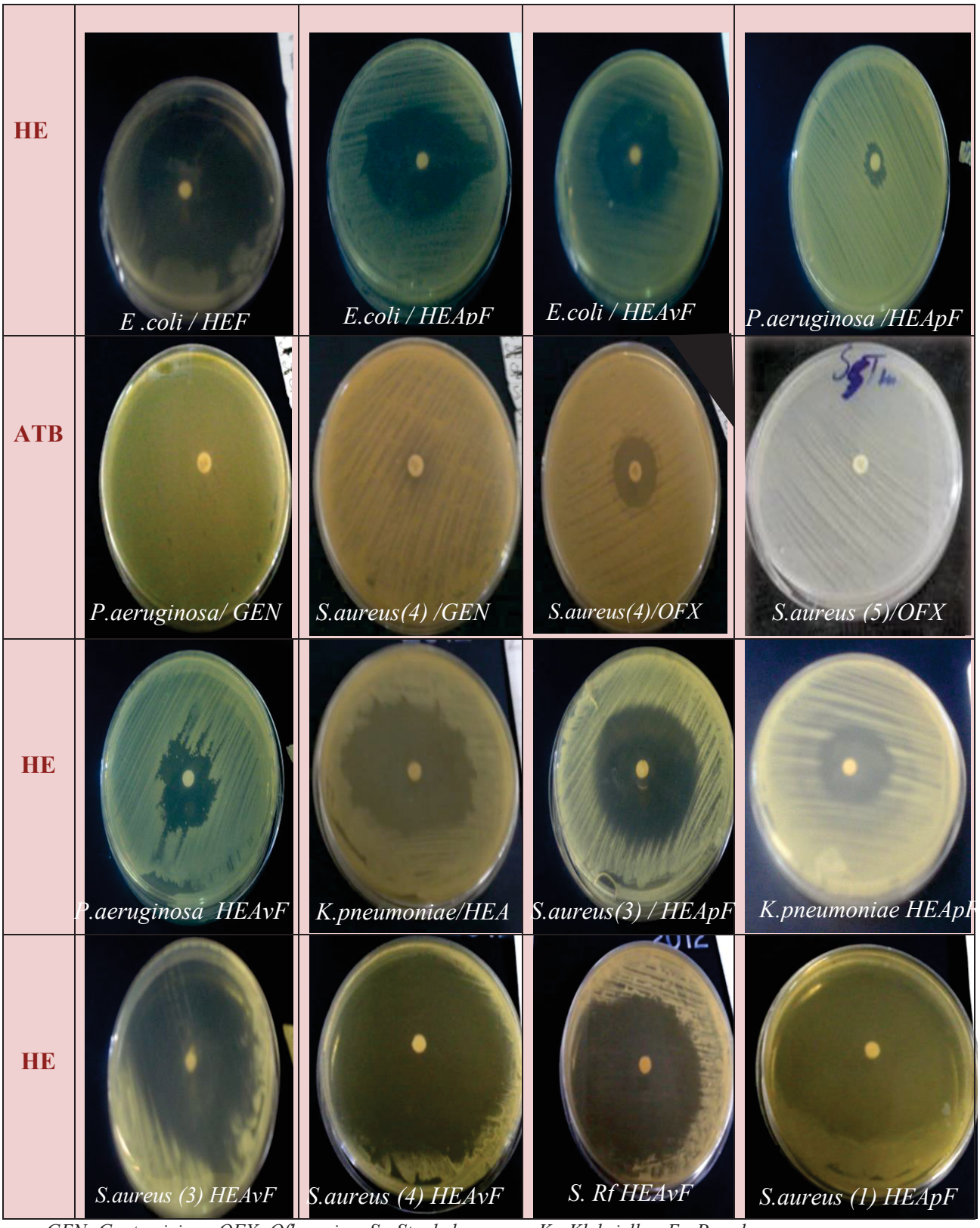


Gradient

	Solvents	Mix	Length (ml)	
Equil.	A/B	0%	115	flowrate 24 ml/min
1	A/B	0% - 100%	653	
2	B/C	0% - 100%	675	
3	B/C	100%	332	Auto Extend

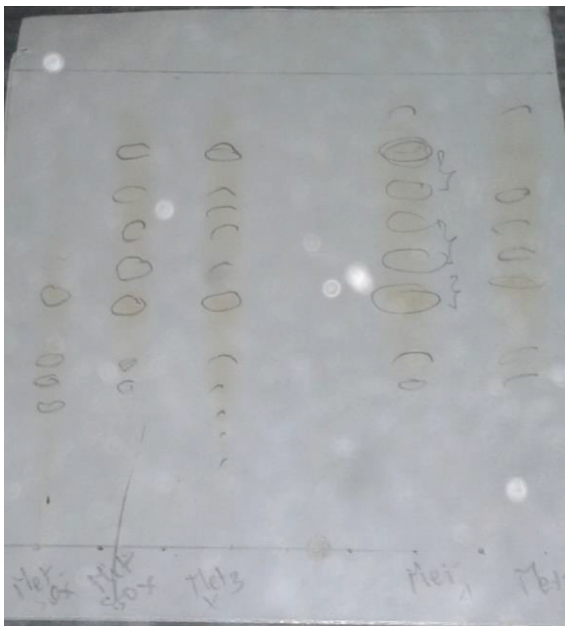
Log

Annexe 2 : Aromatogramme et antibiogramme de quelques souches testées (vis à vis des HE de *T. ciliatus*), HE : huile essentielle ; *AvF : avant floraison ; AF: Après floraison ; F : pendant floraison ;*

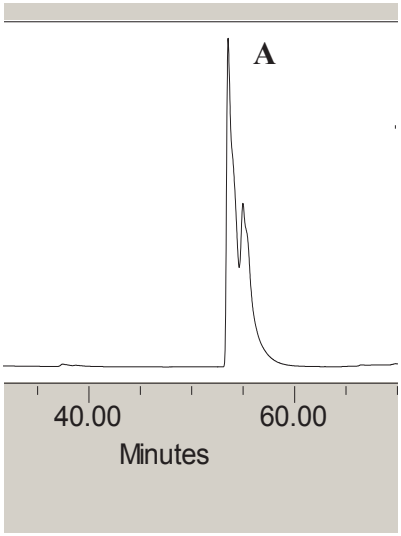


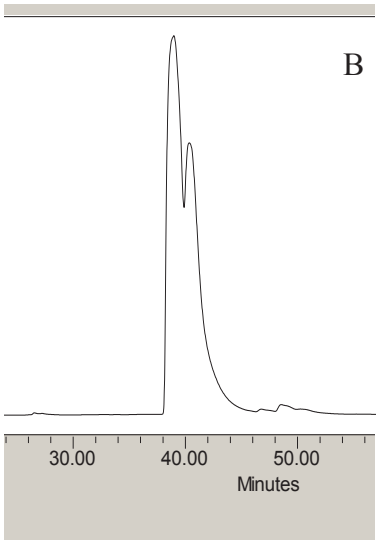
GEN :Gentamicine ; OFX :Ofloxacine ;S : Staphylococcus ; K : Klebsiella ; E : Pseudomonas

Annexe 3 : Chromatogramme sur Couche Mince des extraits méthanoliques de *Thymus ciliatus*



Annexe 4 : Chromatogramme HPLC : A : Naringenine, B : Quercétine





Travaux personnels

Publications :

Sadou N., Seridi R., Djahoudi A. et Hadef Y. 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse.*V(30), pp. 33-39.

Sadou N., Seridi R., Hamel T. 2016. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba-Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. V (40), pp. 180-185.

Communication international :

Chekroud Sadou N., Seridi R., Djahoudi A., Halaimia F., Rahmani M. 2013 . Chemical composition and antibacterial activities of algerian *Pinus halepensis* Mill. and, *Pinus maritima* essential oils. 61 International congress and annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA).1-5 september 2013. Munster. Germany. Abstract in *Journal of Medicinal Plant and Patural Product Research.* V(13). pp1097-1288.

Chekroud Sadou N., Hamel T., et Seridi R. 2015. Seasonal variation of phenolic and flavonoid content in *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba. The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants MESMAP-2. Du 22 au 25 avril. Antalya.Turkey.

Chekroud Sadou N., Hamel T et Seridi R. 2015. Activité antibactérienne et composition chimique des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* de Annaba. *Colloque International sur la Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales de la Méditerranée CIPAMM 2015, 11-12 Novembre 2015, Blida. Algérie*

Chekroud Sadou N., Khadri S., Seridi. R. 2015. Activité antibactérienne et composition chimique des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* de Annaba.*1er Colloque International de Biologie Appliquée. CIBA 2015*, *du 29 novembre au 01 décembre. Oran. Algérie.*

Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien

Chemical composition and antibacterial activity of the needls essential oil of *Pinus halepensis* Mill. from north east of Algeria

Nina Sadou [1*], Ratiba Seridi [1], Abdelghani Djahoudi [2]& Youcef Hadef [3]

[1]*Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000, Annaba, Algérie.-*
[2]*Laboratoire de Microbiologie. Faculté de Médecine Université Badji Mokhtar BP12, 23000, Annaba, Algérie.*
[3]*Laboratoire Chimie Analytique, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar- Annaba BP12, 23000, Annaba, Algérie.-*

Soumis le : 03.07.2013 *Révisé le : 22.11.2014* *Accepté le : 07.01.2015*

ملخص

الزيوت الطيارة للأوراق الابرية لنبتة الصنوبر الحلبي .*Pinus halepensis* Mill التي قطفت من منطقة بحيرة الملاح في الحظيرة الوطنية للقالة و من غابة الزعرورية بولاية سوق أهراس تم الحصول عليها عن طريق التقطير حيث أعطت المردود 0,81% , 0,3 % على التوالي.
الزيت الطيار للصنوبر الحلبي التابع لبحيرة الملاح متكون من 16مركبا بنسب أغلبية ل : β-caryophyllène (31, 89%), α-pinène (24,41%), β-myrcène(19,38%) .
أما بالنسبة للزيت الطيار الخاص بصنوبر الزعرورية فعدد مركباته 16 وممثلة خاصة بواسطة α-pinène (21,01%), caryophylléne (31,14%)β- و α-terpinolène (9,43 %) .
جربت تلك الزيوت الطيارة مخبريا على ثلاثة أنواع من البكتيريا (*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* *Stalocphylococcus aureus*) المقاومة للمضادات الحيوية و المسؤولة غالبا على الالتهابات ,فكشفت نشاط ضد هذه الأنواع من البكتيريا.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الطيارة - CG/SM -*Pinus halepensis Mill*.- نشاط ضد البكتيريا

Résumé

L'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* Mill., récoltées dans la forêt du lac Mellah situé dans le Parc National d'El Kala et la forêt Zaarouria (Souk Ahras), obtenue par hydrodistillation donne respectivement un rendement de 0,81% et de 0,3%. L'huile essentielle des aiguilles du lac Mellah comprend 16 constituants. Les majoritaires sont, le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%) et le β-myrcène (19,38%). Celle de Zaarouria, comprend 16 composés représentés essentiellement par l'α-pinène (21,01%), le β-caryophyllène (31,14%) et l'α-terpinolène (9,43%). Ces huiles essentielles testées *in vitro* sur trois souches antibio-résistantes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosa*, et *Escherichia coli*), souvent responsables d'infection nosocomiale ont montré un pouvoir antibactérien.

Mots clés : *huile essentielle - Pinus halepensis Mill. - activité antibactérienne - CG/SM.*

Abstract

The needles essential oils of *Pinus halepensis* Mill. collected from the Mellah Lake forest located in the National Park of El Kala and from the forest of Zaarouria forest (Souk Ahras), obtained by hydrodistillation. Give a yield of 0,81% and 0,3% respectively. The essential oils of the needles from Melah lake is composed from 16 compounds, which three in majority are: β-caryophyllene (31,89%), the α-pinene (24,41%) and the myrcene (19,38%). But those of Zaarouria forest from the 16 identified compounds are the α-pinene (21,01%), the β-caryophyllene (31,14 %) and the α-terpinolene (9,43 %). These essential oils were tested *in vitro* against three antibiotic resistant bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) often responsible for nosocomial infections have showed antibacterial activity.

Keywords: *essential oils - Pinus halepensis Mill. - Antibacterial activity - GC/MS.*

**Auteur correspondant :* bionina2001@yahoo.fr

©UBMA – 2015

1. INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une composante fondamentale pour l'avenir du système de santé dans le monde; elles demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. La phytothérapie est une discipline qui tend toujours à se renouveler, car la recherche des nouveaux médicaments est continuelle [1].

Les limites de l'antibiothérapie, vis-à-vis des bactéries multi-résistantes nous incitent à chercher de nouvelles possibilités, pour lutter contre celles-ci. L'essor actuel de la thérapie par des substances d'origine végétale telles que les huiles essentielles offre de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, depuis quelques années, un intérêt accru est porté sur les huiles essentielles ayant montré des propriétés antibactériennes [2]. Les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable connue depuis l'Antiquité, elles sont utilisées dans de nombreux domaines, pharmaceutique, cosmétique-et agro-alimentaire [3].*Pinus halepensis* Mill., ou pin d'Alep est un arbre de 15 à 20 m de haut, aux branches étalées qui occupe une aire de répartition morcelée sur tout le pourtour méditerranéen. Son écorce lisse de couleur gris-argentée, devient crevassée gris-brunâtre, riche en tanins. Les aiguilles sont de fausses feuilles persistantes, filiformes, groupées par paire. Les cônes femelles ovoïdes de 6 à 12 cm de long, sont d'un roux vif, luisant à maturité [4, 5, 6].

En Algérie, *P. halepensis* Mill., occupe principalement l'étage semi-aride et s'accommode bien aux terrains calcaires. Cette espèce forme des forêts dans les collines et les régions sèches du littoral méditerranéen ainsi que dans les montagnes semi-arides; elle peut atteindre parfois jusqu'à 2 200 m d'altitude dans les montagnes sèches de l'intérieur, et dans les terrains calcaires du littoral algérien [7, 8].

Le pin a des vertus thérapeutiques connues depuis longtemps ; en Algérie, ses bourgeons, ses aiguilles, son essence et sa résine sont utilisés en médecine traditionnelle comme expectorant, balsamique, antiseptique et antirhumatismal [9, 10, 11].L'objectif de ce travail est la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill., et l'étude de son activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes résistantes aux Antibiotiques, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus***.**

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Les aiguilles de *P. halepensis* Mill. ont été récoltées au printemps dans deux sites ; la forêt du lac Mellah dans le Parc National d'El Kala, caractérisée par un climat humide et la forêt Zaarouria à Souk Ahras caractérisée par un climat subaride.

Nous avons prélevé au hasard, des aiguilles portées par des rameaux inferieurs d'environ dix arbres en floraison dans chacun des deux sites. L'espèce à été identifiée selon la flore de Quezel et Santa ainsi que celle de Maire [7, 8]. La récolte a été réalisée tôt le matin car les vertus thérapeutiques des plantes y sont le plus concentrées. Les aiguilles ont été nettoyées puis séchées dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière [12].

2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par entrainement à la vapeur d'eau à l'aide d'un appareil de type Clevenger [13, 14]. Un échantillon de 100 g d'aiguilles sèches est soumis à ébullition pendant trois heures dans de l'eau distillée, l'extrait obtenu est passé à travers du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau. L'huile essentielle est stockée à 4°C dans des flacons en verre ambré, pour une analyse chimique ultérieure [15, 16]. Le rendement en huile essentielle est exprimé par le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée [17].

2.3. Détermination de la composition chimique

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Shimadzu QP2010, les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique(EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode SCAN. La colonne utilisée est une OV 17 de 25 m x 0,25 mm x
0,25 µm. Les injections ont été faites en mode splitless. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 1mL.min^{-1}. La

©UBMA – 2015

température de la colonne est de 60 à 220°C à raison de 3°C min^{-1} en mode splitless. Les températures de l'injecteur et de la ligne de

transfert sont de 250 et 220°C. La température du four a été programmée comme suit : la température initiale de la colonne est de 60°C maintenue en isotherme pendant 4 min puis augmentée à raison de 3°C.min^{-1} pour atteindre 220°C. Le volume injecté de l'huile essentielle diluée à 10% dans l'hexane est de 0,1 µL. Les composés de cette huile correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés, d'une part, par comparaison de leurs temps de rétention (Tr) avec ceux d'une série témoins d'alcanes linéaires (C_9-C_{28}), et d'autre part, par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une banque de données Nist27 [18, 19].

2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromatogramme [20]. L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle [21]. Trois concentrations d'huile essentielle ont été testées, l'extrait naturel brut ainsi que deux dilutions au un-demi et au un-quart de celui-ci. Ces huiles ont été diluées dans le DMSO (Diméthyle sulfoxide). Trois souches bactériennes cliniques isolées ont été choisies pour leur résistance aux antibiotiques, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ce sont des bactéries Gram(+) et Gram(-) pathogènes pour l'homme.
Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* Mill. puis déposé au milieu d'une boite de Petri de 90 mm de diamètre contenant un milieu gélosé « Mueller Hinton » de 4 mm d'épaisseur, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum. Ce dernier est préparé à une concentration de 0,5 Marc Ferland, de 10^6 à 10^8 CFU.mL^{-1} pour chaque souche. Un disque imprégné avec le DMSO (Diméthyle sulfoxide) est appliqué dans les boites témoins, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boites de Petri sont incubées pendant 24 h à 37°C, la lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque
disque; la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits testés; selon une échelle de notation symbolique allant de – à +++ et dont la lecture d'après [22, 23] se fait comme suit :
Ø < 10 mm : huile essentielle (HE) sans action inhibitrice (-)
16 > Ø ≥ 10 mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire (+)
25 > Ø ≥16 mm : HE à une action inhibitrice importante (++)
Ø≥25 mm : HE à une action inhibitrice très efficace (+++)

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement

Le rendement moyen (0,81%) de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. récoltées dans le site 1 est supérieur à celui (0,3%) du site 2 Nous notons que le rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj en Algérie, est de 0,52% [24]. Cette variation est probablement du à la sensibilité de l'huile essentielle aux facteurs biotique et abiotique.

3.2. Composition chimique

Les chromatogrammes de l'huile essentielle obtenus sont comparés à la banque de donnée NIST27, afin d'identifier les composés correspondants, d'où l'intérêt de la CG/SM. Les constituants chimiques identifiés dans les aguilles de pin du lac Mellah (site1) sont au nombre de 16 (Tab.1 et fig.1a), ce sont principalement le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%) et le β-myrcène (19,38%). Les composés mineurs sont représentés par l'α-terpinolène (5,27%), l'α-caryophyllène (4,76%), la Sabinène (3,42 %) et le β-pinène (2,13%). L'analyse chromatographique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. du site 2 a décelé la présence de 16 composés (Tab.1 et Fig.1b), parmi lesquels on distingue des constituants majoritaires tels que: l'α-pinène (21,01%) et le β-caryophyllène (31,14%), ces deux composés constituent plus de la moitié de la composition totale de cette huile. Cependant, d'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir le β-myrcène (9,3%), la sabinène (8,21%), l'α-terpinolène (9,43%) et le phényl-éthyl-isovalerate (3,9%).

©UBMA – 2015

Tableau.1 :**.** Composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.

Tr (min)	Composé	Aire de présence (%)	
		Site 1	Site 2
3.18	α-thugène	-	0.63
3.72	α-pinène	24,41	21,01
4.74	β-pinène	2.13	-
4.79	Sabinène	3.42	8.21
5.24	β-myrcène	19.38	9.3
5.45	3-carène	1.33	2.17
4.17	α-terpinène	-	0.56
5.85	Terpinène 4-acétate	0,40	-
6.09	Limonène	1.35	1.59
6.31	α-phelandrène	0.66	0.94
6.78	β-cis-ocimène	1.13	1.18
7.07	γ-terpinène	6.69	1.02
7.97	α-terpinolène	5.27	9.43
13.53	Terpinène 4-ol	0.56	1.28
18.56	α-cubibène	0.46	0.59
21.06	β-caryophyllène	31.89	31.14
22.55	α-caryophyllène	4.76	4.68
26.84	Phényl-éthyl-isovalerate	1.61	3.9
Nombre total de composés identifiés		16	16
Aire de présence totale		99.43%	97.63%

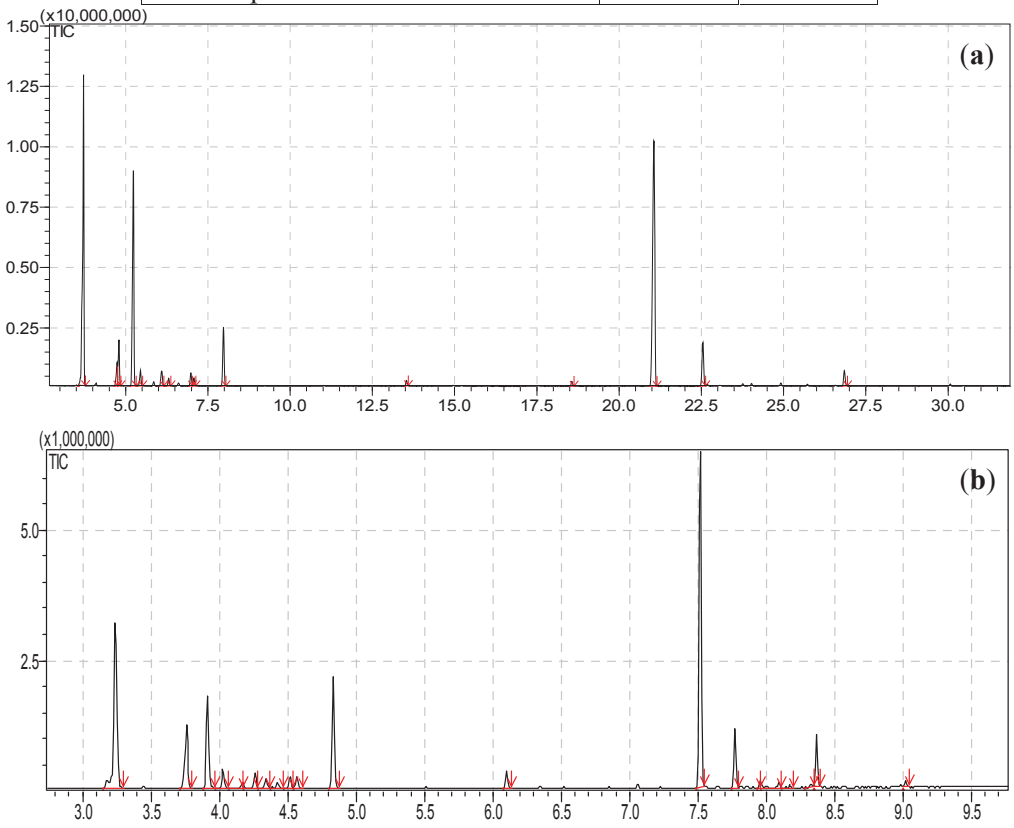


Figure.1 : Chromatogrammes de l'huile essentielle de *P. halepensis* des sites 1 (**a**) et 2 (**b**).

©UBMA – 2015

Les résultats obtenus montrent qu'il existe des différences qualitative et quantitative dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Des deux sites. Cette variation serait due principalement aux facteurs de l'environnement qui exercent une influence directe sur la composition et la production de cette huile.

Les investigations réalisées en Algérie sur la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. Ont montré qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette même espèce. Les régions de Djelfa et Tissemsilt, sont caractérisées par le chemotype α-pinène (17,56%) et β-myrcène (8,45%) [25], Sidi Fredj est représenté par le β-caryophyllène [24] et enfin, le chémotype de l'HE de la région de Ghazaouet est le caryophyllène oxyde avec un taux de 48% [26].

La composition chimique de l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. En provenance du Maroc est de chémotype α-pinène (23,2%) et 4-ol caryophyllène (14,24%) [13]. L'analyse menée par Roussis et *al*. [27] sur la même espèce de Grèce, montre que la composition est dominée par l'α-pinène (13,4%), et le caryophyllène (19,05%), alors que celle de Tunisie est à dominance β-caryophyllène (33,9%) et β-pinène (10,76%) [28]. Macchioni et *al.* [29] rapportent que les constituants majoritaires des aiguilles de pin d'Alep d'Italie sont, le myrcène (27,9%) et l'α-pinène (18,1%).

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent un pourcentage élevé dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep des sites 1 et 2, ces taux sont respectivement de 59,07% et 57,58%. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont de 37,07% dans le site 1 et 37,16% dans le site 2. Les monoterpènes oxygénés ne sont présents que dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Du site 1 avec un taux de 0,56%.

La présence d'autres composés chimiques dans l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Provenant des sites 1 et 2 représente respectivement une aire de 2,93% et 4,04%.

Nos résultats corroborent avec ceux de Dob et *al.* [24] et Hamamouchi et *al.* [13], ils mentionnent une prédominance des monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill.

3.3. Activité antibactérienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne, des huiles essentielles testées, est effectuée par la méthode de disques. La mesure en millimètres, du diamètre des zones d'inhibition des cultures, permet d'évaluer l'efficacité ou non de l'huile essentielle sur les germes testés. D'une manière générale, les huiles essentielles testées ont exercé une activité antibactérienne plus accru que celle enregistrée en présence des antibiotiques testés.

A travers nos résultats (Tab. 2), l'huile essentielle brute des aiguilles de pin du lac Mellah a montré un effet inhibiteur contre les souches testées, cet effet est similaire à celui provoqué par l'HE des aiguilles provenant de Zaarouria. La souche *S. aureus*, Gram (+), est plus sensible qu'*E. coli* et *P. aeruginosa*, Gram (-), sous l'action des extraits testés. Plusieurs travaux [19, 30, 31, 32] ont rapporté que les bactéries Gram (+) sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram(-).

La résistance élevée des bactéries Gram (-) est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipo-polysaccharide. L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram (+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique [30, 31, 32, 33]. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Abi Ayad et *al*. [26], qui ont observé une sensibilité plus importante chez *S. aureus* que chez *E. coli* et *P. aeruginosa* vis-à-vis des HE de *Pinus helepensis* Mill.

Les propriétés antibactériennes des HE de plusieurs plantes aromatiques et médicinales sont attribuées à leur composition chimique et surtout aux alcools terpéniques. En outre, le fort pouvoir inhibiteur des HE est du essentiellement à ses principaux constituants [33]. De même, l'activité des HE testées est probablement due aux composés majoritaires (caryophyllène et pinène); en effet, une étude indique que la présence de caryophyllène dans l'HE *de Bidens pilosa* joue un rôle important dans l'activité antibactérienne. En outre, des essais affirment l'efficacité des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés sur *E. coli* ; ils sont capables de détruire l'intégrité cellulaire, en inhibant la chaine respiratoire et le processus de transport d'ions [34]. D'autres tests de l'activité antibactérienne ont montré que le terpinène 4-ol exerce une activité bactériostatique vis-à-vis de

©UBMA – 2015

plusieurs microorganismes [19]. Par ailleurs plusieurs investigations ont confirmé que la présence du terpinène 4-ol, à faible concentration dans une HE, est responsable de son activité vis- à-vis de *S. aureus* [35].

P. aeruginosa qui est une bactérie Gram (-) a montré une résistance vis-à-vis de l'HEz par contre l'HEm a manifesté des caractéristiques bactériostatiques très intéressantes. La résistance de *P. aeruginosa* a été signalée dans plusieurs recherches [30], en plus cette bactérie a une capacité à former un biofilm, une organisation complexe composée de différentes couches, dans laquelle les bactéries se trouvent dans des conditions physiologiques spécifiques à leur situation [34].

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de nos HE peut aussi, être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles ; les interactions synergiques entres les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires. Ceci est confirmé par plusieurs études [13, 32, 33].

Tableau.2 : Activité inhibitrice de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Et anti biotype pour les trois souches bactériennes.

Souches	HEm	HEm'	HEm''	HEz	HEz'	HEz''	antibiotiques		
							PIP	CAZ	OX
E. coli	-	-	+	+	-	+	nd	nd	R
P. aeruginosa	+	+	+	-	-	-	S	R	nd
S. aureus	+	+	+	+	+	-	R	R	nd

HE: huile essentielle brute; HE': HE diluée à ½ (v/v); HE'': CAZ: ceptazidine ; PIP :piperacilline OX :oxacilline ; R :résistante ;S :sensible , HE diluée à ¼ (v/v); m:lac Mellah; z: Zaarouria ; nd : non déterminée.

4. CONCLUSION

Le rendement de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du lac Melah (site 1) est plus élevé que celui de Zaarouria (site 2). Notre étude sur la composition chimique de cette huile a permis de faire ressortir un chémotype d'huile essentielle β-caryophyllène, commun aux deux sites, les forêts de lac Melah et de Zaarouria. L'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. testée a été plus active vis-à-vis des bactéries Gram (+), *Staphylococcus aureus*, que sur les bactéries Gram (-), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERENCES

[1] Duraffourd C., Lapraz J-C. et Chemli R., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. Ed. Grancher. Paris. 538p.

[2] Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G. et Joly-Guillou M.L., 2011. Étude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies, Pathologie Biologie, Vol. 59(1), 39-43.

[3] Kaloustrian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. et Vergnes M-F., 2008. Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne, *Phytothérapie*, Vol. 06,160-164.

[4] Nahal I., 1985. Taxonomie et aire géographique des pins du groupe *halepensis*. *CIHEAM*, Paris, Vol. 86(1), 11-23.

[5] Coombes A.J., 1993. Les Arbres. Ed. BORDAS. Paris. 320-335.

[6] Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 31-40.

[7] Maire R., 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Ed. Encyclopédie Biologique. Paris. 129-150.

[8] Bezanger L., Pinkas M. et Torck M., 1986. Les plantes dans la thérapeutique moderne. Ed. Maloine. Paris. 11-18.

[9] Leclerc H., 1994. Précis de phytothérapie. Ed. Masson. Paris. 257p.

[10] Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Ed. TEC et DOC. Paris. 484-574.

[11] Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Ibis Press. 759p.

[12] Cecchini T., 2003. Encyclopédie des Plantes médicinales. Ed. De Vecchi S.A. Paris. 351p.

[13] Hmamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M. et Bessiere J.M., 2001. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Essential Oil Research*, Vol13, 298-302.

[14] Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissio M., Sökmenc A. et Akpulat H. A., 2003. Antioxidant and

©UBMA – 2015

antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), *Ethnopharmacology*, Vol87, 215-220.

[15] Loizzo M.R., Tundis R., Conforti F., Saab A.M., Statti A.G. et Menichini F., 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon, *Food Chemistry*, Vol. 105, 572-578.

[16] Tsitsimpikou C., Petrakis P.V., Ortiz A., Harvala C. et Roussis V., 2001. Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species, *Essential Oil Research*, Vol. 13, 174-178.

[18] Benyoucef E., Yahyaoui N., Khelfaoui A. et Aid F., 2005. Water distillation Kinetic study of spearmint essential oil and of its major components, *Flavors and Fragrance*, Vol. 20, 30-33.

[18] Adams R.P., 2001. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured. Ed.Carol Stream. USA. 454p.

[19] Xianfei X., Xiaoqiang C. et Shunying Z.G., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China, *Food Chemistry*, Vol. 100, 1312-1315.

[20] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth Ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.

[21]Vincent M.C., 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6.

[22] Meena M.R. et Sethi V., 1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices, *Food Science and Technology*, Vol. 31, 68-70.

[23] Jeovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A. et Metodiev S., 2000. Seasonal depending variations of the composition and biological activities of Douglas fir (*Pseudotsuga menzlesil*) essential oils from Bulgaria, *Scientia Pharmazeutica*, Vol. 66, 323-328.

[24] Dob T., Berramdane T. et Chelgoum C., 2005. Chemical Composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria, *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 8, 1935-1945.

[25] Tazerouti F., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Favre-Bonvin J. et Bobenrieth M.J., 1993. Analyse des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. par CG/SM, *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, Vol. 26(3), 161-176.

[26] Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A., Rebiahi S.A., Ziani Cherif C. et Bessiere J.M., 2011. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil, *Medicinal Plants Research*, Vol. 5(22), 5433-5436.

[27] Roussis V., Petrakis P.V., Ortiz A. et Mazomenos E.B., 1995. Volatile constituents of needles of five Pinus species grown in Greece, *Phytochemistry*, Vol. 39(2), 357-361.

[28] Amri I., Hamrouni L., Hanana M., Gargouri S., Fezzan T., et Jamoussi B., 2013. Biological Agriculture et Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems.

[29] Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Maccioni S., et Ansaldi M., 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy, *Flavors and Fragrance*, Vol. 18, 139-143.

[30] Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L. et Echeverrigaray S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria, *Food Chemistry*, Vol. 103, 823-828.

[31] Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N., 2011. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia, *Lipids in Health and Disease*, Vol.10, 161.

[32] Al-Bayati A.F., 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *Ethnopharmacology*, Vol. 116, 403-406.

[33] Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M. et Danthu P., 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*, *Food Chemistry*, Vol. 114, 680-684.

[34] Abi-ayad M., Abi-ayad F.Z., Lazzouni H.A. et Rebiahi S.A. 2011. Antibacterial activity of *Pinus helepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen), *Natural Product Research*, Vol.1(1), 33-36.

[35] Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. et Tawata S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiatauda*, *Food Control*, Vol. 19, 346-352.

©UBMA – 2015

Research Article

Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba-Algeria

Sadou Nina*, Seridi Ratiba, Hamel Tarek
Laboratory of Vegetal Biology and Environment, University Badji Mokhtar Annaba, Algeria.
***Corresponding author's E-mail:** bionina2001@yahoo.fr

Accepted on: 19-08-2016; **Finalized on:** 30-09-2016.

ABSTRACT

Thymus ciliatus is a plant widely used in traditional medicine, for her therapeutic proprieties attributed essentially to essential oil. The aim of this work is to determine the differences in chemical composition and antioxidant activity of essential oil at different harvest period. The composition of essential oil was analyzed by GC-MS was showed that essential oil obtained at vegetative, flowering, after flowering stage was characterized with thymol (33. 39%), carvacrol (30.85%) and carvacrol (31.37%) respectively, their essential oils was screened for antioxidant activity using DPPH assay, and reducing power, the essential oil obtained after flowering showed the best antioxidant than vegetative and flowering stage with IC_{50} to 438 ± 9.07µg / ml, 580 ± 1.15 µg / ml, and 590 ± 8.62µg/ml respectively, We have also found that the essential oil after flowering (1.001) which shows high activity by reducing power assay.

Keywords: *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*, Essential oil, GC/MS, DPPH, reducing power.

INTRODUCTION

The Mediterranean flora is well known for its abundance of aromatic plants, with an estimated 49% of genera containing aromatic species in this climate zone Members of the Lamiaceae from this region have attracted a great deal of attention due to the diversity of monoterpenes produced by different[1]. The genus Thymus is one of the largest and economically most important genera within the Lamiaceae (= Labiatae) family, they include 215 species widespread all around the Mediterranean region[2]. In Algerian flora, there are 12 Thymus species from which 9 are endemic, among which ***Thymus ciliatus*** (Desf.) Benth, which is an endemic species from North Africa. This species includes three subspecies: ssp. eu-ciliatus Maire, ssp. *coloratus* (Boiss. et Reut.) Batt. and ssp. munbyanus (Boiss. et Reut.) Batt.[3] In North African folk medicine, Thymus plants are used as remedies in various diseases e.g. bronchitis, pulmonary infection, flu, cough and some gastrointestinal disorders[4].

Therefore, several EOs of the Thymus species have been studied to investigate their chemical composition and antimicrobial activities[5].These products are of particular interest, because no bacterial resistance or adaptation has been described, and low or insignificant side effects have been found both in the essential oils and whole extracts.[6] He most species of thymus contain phenolic monoterpenes, thymol and/or carvacrol.[4] Therefore, various species studied for their antioxidant activities 789. Recently, interest has increased considerably in finding naturally occurring antioxidants for use in foods or medicinal materials to replace synthetic antioxidants, which are being restricted due to their carcinogenicity.[10] Furthermore, natural substance possessed of antioxidant activity present a very important socio-economic interest in the field biopharmacological of research. Several laboratories around the world have turned to the search for substances bioactive and recovery.[11]

The aim of this work was to evaluate the chemical composition of Algerian ***Thymus ciliatus* subsp. *coloratus*** essential oils, isolated by hydrodistillation from the aerial parts of plants collected during different phases, and to determine in which way this would affect the corresponding oils antioxidant.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The aerial part (leaves, stems) of *T. ciliatus* was harvested at vegetative, flowering, and after flowering stage of development from Annaba, Algeria. The plants collected were identified by the Biological Vegetable Laboratory. Plant samples were dried in the share and conserved for future use.

Essential Oil Isolation

The100g of the air-dried leaves, stems were submitted for 3 hours to hydrodistillation using a Clevenger type-apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia.[12] The essential oils were dried over anhydrous sodium sulphate and then stored at 4 °C.

Essential Oil Analysis

The essential oil was analysed by GC/MS Agilent HP Agilent MSD 5973 mass spectrophotometer and coupled with a Agilent HP 6800 plus gas chromatograph, equipped with hp-5MS column: l30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness. Initially, the oven temperature was 60 °C which was held for 8 min, followed by an increase in temperature to 250 at 2 °C/min and this was held isothermally for 10 min. The injector and detector temperature were 250 °C and 280° C respectively.

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

Analyses were carried out using helium as carrier gas at a flow rate of 0.5 ml/min, at a split ratio of 1:20 Mass spectra were obtained by electron ionization (EI) at 70 eV, using a spectral range of 34 at 450 m/z. Relative percentages of the different constituents was calculated automatically from the peak area of total ion chromatograms. Constituents of the oil were identified by comparison of their retention indices relative to a homologous n-alkane series and matching their mass spectra with those of reference compounds in Wiley 7n.1 libraries[13].

Antioxidant Activity

The antioxidant activity of the essential oil of *T.ciliatus* has been determined by the different test systems namely DPPH and reducing power.

DPPH Assay

In this assay, antioxidant activity of essential oils was evaluated by measuring the bleaching of the purple-colored methanol solution of DPPH.[14] The antioxidant activity of thyme oils was measured in terms of hydrogen-donating of radical-scavenging ability, using the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a reagent. The antioxidant activity of the EO was estimated using a protocol reported by Sharififar.[15] Fifty microlitres of various concentrations of the sample in methanol (both essential oil and control substance) were added to 5 ml of 0.004 % methanolic solution of DPPH.

Absorbance measurements were read at 517 nm, after 30 min of incubation time at room temperature. Absorption of a blank sample containing the same amount of methanol and DPPH solution acted as the negative control. All determinations were performed in triplicate. The percentage inhibition of the DPPH radical by the samples was calculated according to the formula: I% = 100 X ($A_{Control} - A_{sample}$) / $A_{Control}$[16].

Reducing Power

The reducing power was determined according to the method of Oyaizu[17]. Each extract (0.2–1.0 mg/ml) in methanol and water (2.5 ml) was mixed with 2.5 ml of 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide and the mixture was incubated at 50 C for 20 min. Then, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid were added, and the mixture was centrifuged at 200 g (MSE Mistral 2000, London, UK) for 10 min. The upper layer (2.5 ml) was mixed with 2.5 ml of deionized water and 0.5 ml of 0.1% ferric chloride. Finally the absorbance was measured at 700 nm against a blank. Ac ascorbique was used as a control.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Composition

The essential oils extracted by hydrodistillation from the dried aerial parts of *T. ciliatus,* collected at different developmental stages, ranged from 0.54% to 1.2% (w/w) with a maximum obtained during the post-flowering phase (Table 1). In fact more rapporteurs suggest that the plant accumulates the most EO at flowering stage.[18,19]

Analyses of *T.ciliatus* EOs obtained at vegetative, floraison, and after floraison period by GC/MS was identified 50, 54, 55 constituents respectively; representing 98,62 – 99,5 – 99,28%, of the total oil at the vegetative, flowering and post-flowering phases (Table1).

The essential oil composition of T. *ciliatus* obtained at vegetative stage was characterized by high percentage of thymol (33.39%), carvacrol (24.16%) as the main compound, followed by γ-terpinene (08.89%), *p*-cimene (8.25%), α-terpinolene (7.36%).

However the essential oil composition of T. *ciliatus* obtained at flowering stage was characterized by high percentage of thymol (29.52%), carvacrol (30.85%) as the main compound, followed by p-cimène (8.45%), α-terpinolène (7.71%) and γ-terpinène (05.58%), nevertheless the essential oil composition of T. *ciliatus* obtained at after flowering stage was dominated by high percentage of thymol (21.02%), carvacrol(31.37%), followed by γ-terpinène (10.95%),*p*-cimène (8.71%), α-terpinolène (6.11%) and α-pinène (5.18%).

The essential oil from *T.ciliatus* showed a high content of oxygenated monoterpenes at the vegetative (62.58%), flowering (66.89%), and post-flowering phases (56.69 %), and low contents of monoterpene hydrocarbons (29.68%), (26.42%), (36.29%) respectively the vegetative, flowering, and post-flowering phases, followed by the sesquiterpene hydrocarbons (04.1%), (03.72%), (04.11%) respectively and oxygenated sesquiterpenes detected in the oil samples collected only during both vegetative, flowering phases in average (0.3%).

The comparison of our results with those of the literature showed that the chemical composition of the endemic species *Thymus ciliatus* is markedly different from that of other region from Algeria. Generally the North Algerian *T.ciliatus* EO is characterized by a chemotype Thymol[20-,22], while Algerian West- by carvacrol chemotype[20,23]. A chemical composition quite different from that the oil of the same species (subspecies unspecified) collected in Morocco showed that there is a variability in the chemical composition, besides the EO *T.ciliatus* Azrou is represented by the chemotype (Thymol, β-ocimene) with respectively rate (44.20 and 25.8%), and the Imilchil is Thymol (17.30%) and Carvacrol (26.20%)[21,24].

According to several authors, variations in the chemical composition of essential oils from the qualitative and quantitative stand point are due to, environmental factors[4,25], the part of the plant used, the period of the vegetative cycle during which the harvest has been made[7,26,27] and also genetic factors.[28]

Antioxidant and Radical Scavenging Activity

Concentration DPPH is widely used to evaluate antioxidant capacity and changes colour from purple to yellow upon acceptance of electrons/hydrogens, thus

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

indicating scavenging activity. the lower IC_{50} value reflects better protective action[29].

As can be seen from the Table 2, free radical scavenging effect of the samples exhibited a dose-dependent increase.

The weakest radical scavenging activity was exhibited by the essential oil obtained after flowering and determined as à 91.735%, followed by flowering, and vegetative stages, the average is 88.21 et 73.92 % respectively at the concentration 1000 µg/ml.

The radical scavenging activity of ascorbic acid remains higher than that EOs tested with an IC_{50} of 2.48 ± 0.02µg/ml.

However, among these three thyme EOs, the EO after flowering has the highest antioxidant activity with IC_{50} rate to 438 ± 9,07µg/ml, the flowering EO also has an important antioxidant with IC_{50} of approximately 580 ± 1.15 µg/ml, followed by essential oil vegetative phase with IC_{50} equal to 590 ± 8.62µg/ml.

The strong antioxidant activities in Algeria EOs Thyme species with large amount of carvacrol and thymol has been reported.[4] The DPPH scavenging activity EOS was be attributed to the presence of phenolic compounds such as thymol or carvacrol.[8,9,30] But the antioxidant activity of EOs showed lower antioxidant activity than reported by Amarti[31], who found a way antioxidant potential, with IC50 about 74.025 µg/ml, of *T.ciliatus* EO from Morocco. These results imply that non-phenolic contents could be also responsible for this activity. Furthermore, some researchers show that some essential oils rich in nonphenolic compounds also have antioxidant potentials.[32]

The effect of antioxidants on DPPH radical scavenging was thought to be due to their hydrogen-donating ability. DPPH radical is a stable free radical and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule[10].

Table 1: Chemical Composition of the Essential Oil of *T.ciliatus*

Components	RT(min)	Vegetative	Flowering	Post-flowering
isovaleric acide	**4,36**	0,02	0,02	0,05
α-thujene	**9,84**	0,78	0,45	0,88
α-pinène	**10,24**	1,41	1,63	5,18
Camphene	**11,05**	0,56	0,31	0,62
Verbenene	**11,39**	-	-	0,05
β-pinene	**12,75**	0,19	0,15	0,26
1octen 3ol	**13,12**	1,49	1, 6	1, 6
3octanone	**13,51**	0,14	0,17	0,17
β-myrcene	**13,70**	0,85	0,70	1,22
3-octanol	**14,102**	0,22	0,24	0,22
α-phellandrene	**14,57**	0,16	0,09	0,19
3-carene	**14,96**	0,04	0,03	0,06
α-terpinene	**15,46**	1,08	0,63	1,42
p-cymene	**16,17**	8,25	8,45	8,71
Limonene	**16,32**	0,50	0,68	1,07
Eucalyptol	**16,45**	0,13	0,12	0,09
β-ocimene	**17,72**	0,05	0,05	0,04
ï-terpinene	**18,54**	8,86	5,58	10,97
Linalool oxide	**19,37**	0,12	0,12	0,13
1-octen-3-ol	**19,99**	-	0,1	-
α-terpinolene	**21,72**	7,36	7,71	6,11
β-phellandrene	**22,82**	0,05	0,05	0,05
Trans-pinocarveol	**23,97**	0,11	0,02	0,10
Mentha-1,4,8-drienne	**24,46**	0,10	0,10	-
Z-citral	**24,45**	-	-	0,04
Borneol	**25,99**	2,26	2,98	1,78
Terpinene-4-ol	**26,82**	1,55	2,41	1,03
p-cymen-ol	**27,37**	-	0,15	0,17
α-terpinolene	**27,76**	-	0,08	0,04
b fenchyl alcohol	**28,63**	0,11	-	-
cis-dihydrocarvone	**29,13**	0,06	0,22	0,14
Methyl thymol ether	**30,92**	-	0,04	0,04

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

carvacrol methyl ether	**31,53**	0,07	-	0,03
3-carene	**31,86**	-	0,04	0,04
Carvone	**33,13**	-	0,05	0,03
Thymol	**35,63**	33,39	29,52	21,02
Carvacrol	**36,62**	24,16	30,85	31,37
Eugenol	**39,30**	0,04	0,14	0,03
α-copaene	**40,32**	0,21	0,15	0,25
β-bourbonene	**40,90**	0,29	0,29	0,34
caryophyllene	**43,03**	0,23	0,29	0,32
β-cubebene	**43,67**	0,15	0,13	0,14
aromadendrene	**45,56**	0,07	0,10	0,12
α-amorphene	**46,60**	0,39	0,31	0,40
germacrene d	**46,86**	0,61	0,23	0,28
β-selinene	**47,14**	0,06	0,07	0,07
α-cubebene	**47,70**	0,27	0,18	0,25
α-muurolene	**48,07**	0,13	0,12	0,14
β-bisabolene	**48,62**	0,11	0,11	0,06
ï-cadinene	**48,87**	0,33	0,28	0,42
Delta cadinene	**49,50**	1,04	1,02	1,02
α-cadinene	**50,24**	-	0,04	0,05
Calacorene	**50,54**	-	0,15	0,03
Ledene	**53,31**	-	0,08	0,05
Apiol	**55,29**	0,04	-	-
α-cadinol	**56,89**	0,28	0,30	0,14
dehydroromadendrene	**58,60**	0,12	0,13	0,11
cetanol	**68,73**	0,05	0,04	0,08
β-fernesene	**80,61**	0,09	0,04	0,06
Cuminol	**92,51**	0,04	-	-
Total		**98,62**	**99,50**	**99,28**
Groups				
Monoterpene hydrocarbons		**29,68**	**26,42**	**36,29**
Oxygenataed monoterpenes		**62,58**	**66,89**	**56,69**
Sesquiterpene hydrocarbons		**04,1**	**3,72**	**4,11**
Oxygenataed sesquiterpenes		**0,32**	**0,3**	-
Others		**1,94**	**2,17**	**2,19**

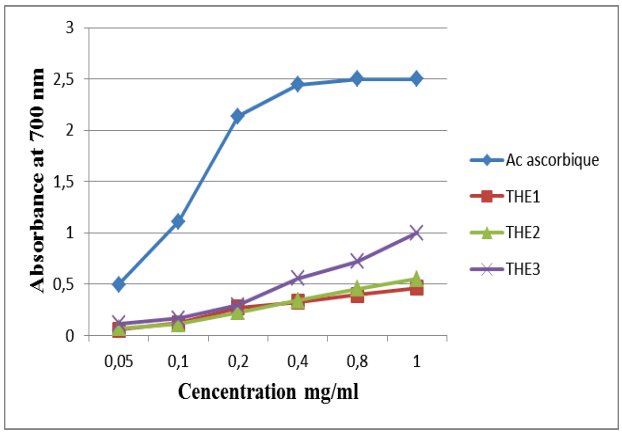
Table 2: Scavenging Ability of *Thymus ciliatus* Essential Oils on DPPH Radicals (%)

T.ciliatus ssp coloratus	**Concentrations (µg/ml)**	**Scavenging ability of Thymus essential oils on DPPH radicals (%)**		
		Vegetative	**flowering**	**after flowering**
	100	8,65±0,29	10,123±3,81	28,747±3,284
	200	9,65±0,168	13,405±0,544	31,198±2,272
	400	40,45±0,821	23,17±0,695	47,449±1,648
	600	50,523±0,446	51,245±1,347	61,056±6,521
	800	58,71±5,363	73,7±2,803	80,742±0,138
	1000	73,922±0,615	88,21±0,298	91,735±1,045
Ac Ascorbique				
	2	41,835±0,548		
	4	74,546±0,274		
	6	86,951±1,054		
	8	89,917±0,593		
	10	94,859±0,362		

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

The Reductive Potential

The reductive potential measures the ability of a sample to act as electron donor and, therefore, reacts with free radicals converting them to more stable products and thereby terminates radical chain reactions. Generally, the reductive potential of all T. *ciliatus* essential oil samples increased steadily with increasing essential oils concentration (Figure 1), Ascorbic acid, reference antioxidant, presented a higher activity compared to EOs. The reducing power of three essential oils T.*ciliatus* (vegetative, flowering, after flowering) amounted to 0.465 ± 0.002, 0.551 ± 0.003 and 1.001 ± 0.005 at the concentration 1 mg/ml respectively. We have found that the EO after flowering (1.001) which shows high activity compared to other EOs *T.ciliatus* essential oils seem to act as electron donors.



THE1: vegattive stage, THE2: flowering, THE3: after flowering

Figure 1: Reduction Power of *Thymus ciliatus* Essential Oils

Essential oils are complex mixtures and determination of the component(s) responsible for activity is difficult. Antioxidant activity of essential oils has often been attributed to the presence of phenolic constituents, especially thymol and/or carvacrol. The reducing powers of T. oils poor in thymol or carvacrol were markedly lower than those of the essential oils rich in these two phenols. has been confirmed by Amarti.[4] This association has been confirmed for the most reporters, but other compounds also seem to play an important role to hydroxyl substitutions in the aromatic ring, which possess potent hydrogen donating abilities and show radical scavenging activity The essential oil of *T. ciliatus* could be concluded as a natural source that can be freely used in food industry as a culinary herb. Very little work has been done on studying the antioxidant properties of *T. ciliatus* EO. According to our knowledge and to this day, there is an article referring the antioxidant activity of EO studied by bleaching β-carotene method, the results according to the essential oil showed the strongest ability to inhibit the formation of radicals linoleic acid with percentage to 75.68%[20]. This antioxidant activity may be due to different mechanisms, such as prevention of chain initiation, decomposition of peroxides, prevention of continued hydrogen abstraction, free radical scavenging, reducing capacity, and binding of transition metal ion catalysts. It is thus important that for evaluating the effectiveness of antioxidants, several analytical methods and different substrates are used [7].

CONCLUSION

The genus Thymus belonging to the family Lamiaceae (Labiatae) was widely investigated especially the endemic ones of Algeria, Our data provide a scientific basis for the use of these plants as folk remedies, particularly for the prevention and treatment of diseases that are known to be caused or accelerated by oxidative stress.

These studies point out the importance of comparing and exploring the variance of essential oils composition from different stage of developpement, since this will most probably affect their potential biological activities.

REFERENCES

1. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes, Journal of Chemical Ecology, 4, 2003, 859-880.
2. Morales R. The history, botany and taxonomy of the genus Thymus, Ed, Taylor & Francis, London, 2002, 1-43.
3. Quezel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition Centre national de la recherche scientifique, Tome 2, Paris, 1963, 805.
4. Amarti F, El Ajouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M, Chaouch A. Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc, Phytothérapie, 9, 2011, 149-157.
5. Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils, Food Chemistry, 116, 2009, 714-721.
6. Nezhadali A, Nabavi M, Rajabian M, Akbapour M, Pourali P, Amini F. Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and *in vitro* antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran, J. of Basic and Applied Science, 3, 2014, 87-92.
7. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. et Link, Food Chemistry, 105, 2007, 146-155.
8. Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G, Lindequist U. *In vitro* Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). Records of Natural product, 4, 2010, 449-63.
9. El Ouariachi EM, Hamdani I, Bouyanzer A, Hammouti B, Majidi L, Costa J, Paolini J, Chetouani A. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussoneti* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss.

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

from Morocco, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4, 2014, 281-286.

10. YangaJ, Guoa J, Yuanb J. *In vitro* antioxidant properties of rutin, LWT, 41, 2008, 1060-1066.
11. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. rosulans, Journal of Food Engineering, 66, 2005, 447-454.
12. Pharmacopée europeenne, Ed, Council of Europe, France, 1996.
13. Adams RP. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Ed, Allured Carol Stream, USA, 2001, 454.
14. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oils, Phytotherapy Research, 14, 2000, 323-328.
15. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldina M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., Food Chemistry, 112, 2009, 885-888.
16. Pal Singh H, Mittal S, Kaur S, Batish DR, Kohli RK. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*, Food Chemistry, 114, 2009, 642-645.
17. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Japan Journal of Nutrition, 44, 1986, 307–315.
18. Boukhebti H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils, Scholars Research Library.Der pharmacia Letter, 3, 2011, 267-275.
19. Belmalha S, El Idrissi M, Amerchrouq A, Echchgadda G. Caracterisation chimique de certaines espèces de Thym Marocain du moyen atlas (region de midelt), Global Journal of pure and Applied Chemestry Research, 3, 2015, 45-52.
20. Ghorab H, Kabouche A, Semra Z, Ghannadi A, Sajjadi EB, Touzani R, Kabouche Z. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. Scholars Research Library Der Pharmacia Letter, 1, 2013, 28-32.
21. Giordani R, Hadef Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants, Fitoterapia, 79, 2008, 199-203.
22. Amrouni S, Touati M, Hadef Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa*VIM-2 carbapénèmase. Phytothérapie, 2014, 1-5.
23. Bousmaha L, Atik Bekkara F, Tomi F, Casanova J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria, J. Essent. Oil Res, 5, 2007, 490-493.
24. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M., Chaouch A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth. du Maroc, Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 1, 2010, 141-148.
25. Ghorab H, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of Thymus growing in various soils and climates of North Africa, J. Mater. Environ. Sci, 1, 2014, 298-303.
26. Moghaddam M, Pirbalouti AG, Mehdezadeh L, Pirmoradi MR. Changes in composition and essential oil yield of *Ocimum ciliatum* at different phonological stages, Eur Food Technol, 240, 2014, 199-206.
27. Mirjalili MH, Salihi P, Senboli A, Vala MM. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle, Chemistry of natural compounds, 42, 2006, 19-23.
28. Jerkovic I, Mastelic J, Milos M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia, International Journal of Food Science & Technology, 36, 2001, 649-654.
29. M. Viuda-Martos, M.A. Mohamady, J. Fernández-López, K.A. Abd ElRazik, E.A. Omer, J.A. Pérez-Alvarez, E. Sendra. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22, 2011, 1715-722.
30. Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M, Chaouch A. Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc, Phytothérapie, 9, 2011, 149-157.
31. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Aarab L, El Ajjouri M, Guedira A, Chaouch A. Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc, Acta Bot. Gallica, 4, 2011, 513-523.
32. Deba F, Xuan TD, Yasuda M, Tawata S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var, Food Control. 19, 2008, 346-352.

Source of Support: Nil, **Conflict of Interest:** None.

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.