



**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN**

MÉMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : **CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Par :

**M<sup>lle</sup> BELBACHIR Fatima Zohra**

Sur le thème

---

**Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de  
trois huiles essentielles et de leurs fractions oxygénées:  
Effet de synergie ou d'antagonisme.**

---

Soutenu publiquement le 25 juin 2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme Wassila DRICI	MCA	Université de Tlemcen	Présidente
Mr Joseph KAJIMA MULENGI	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mme Esma CHOUKCHOU BRAHAM	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr Mohammed El Amine DIB	Professeur	Université de Tlemcen	Promoteur

**Laboratoire de chimie organique et substances naturelles**  
(COSNA) Tlemcen – Algérie

## **Dédicace :**

A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, à celle qui a sue me donner amour et joie de vivre, à celle qui a toujours montrée affection et compréhension à mon égard, ma mère que j'aime.

A l'homme de courage et de force, à celui qui a toujours été présent, qui m'a appris les vraies valeurs de la vie à celui qui m'a soutenu en toutes circonstances, mon père que j'aime.

J'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

A mon encadreur

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur :

Mes chers frères : Anes, Ahmed et Mohammed

A toute ma famille et mes chères amies : Kheira, Sihem, Amina, Yesmine, Zoulikha, Nour El Houda, Meriem et Nawal.

## Remerciement

Avant toute chose, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant, de m'avoir donnée la force, la patience et le courage pour réaliser ce modeste travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon encadreur **Mr. le Prof., Mohammed El Amine DIB**, Je le remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé. Merci pour sa rigueur scientifique, ses bons conseils ainsi que ses qualités humaines. Pour tout cela je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à écrire un « Merci » sincère au responsable du Master CPh **Mr le Pr., KAJIMA MULENGI J.** Pour leur enseignement et ses conseils durant mes études en Master.

Le présent travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour cela je tiens à remercier son directeur **Pr. Saïd GHALEM** ainsi que le

Chef de l'équipe des huiles essentielles le **Pr. Boufeldja TABTI.**

Je tiens à remercier **Mme DRICI W.** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce travail.

Un grand et respectueux remerciement à **Mr le Pr., KAJIMA MULENGI J** et **Mme CHOUKCHOU BRAHAM E.** de m'avoir fait l'honneur d'examiner notre travail. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les professeurs et enseignants du département de chimie qui nous ont enseigné et qui ont contribué à nos formation.

Je veux aussi remercier Mme Fatima BENYOUCEF pour ses conseils éclairés, et pour son soutien et son aide.

***Merci***

## LISTE DES ABREVIATIONS

**BMH** : Bouillon Mueller Hinton

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**CPG/SM** : Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

**ERO** : les espèces réactives oxygénées

**Fe(III)-TPTZ** : complexe tripyridyltriazine ferrique

**Fe(II)-TPTZ** : complexe tripyridyltriazine ferreux

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power.

**HE** : Huile Essentielle.

**Ir<sub>p</sub>** : indice de rétention polaire.

**Ir<sub>ap</sub>** : indice de rétention apolaire.

***R.Officinalis*** : *Rosmarinus Officinalis*

***S.Argentea*** : *Salvia Argentea*

***T. fontanesii*** : *Thymus fontanesii*

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 01**: le rendement (%) des trois plantes.

**Tableau 02**: Composition chimique des trois huiles essentielles

**Tableau 03**: Composition chimique des trois fractions oxygénées

**Tableau 4** : pourcentage d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations des HEs et de l'acide ascorbique.

**Tableau 5** : Les activités antimicrobiennes (zones d'inhibition) des HEs et les mélanges croisés.

**Tableau 6** : Activité antimicrobiennes (zones d'inhibition) des fractions oxygénées.

**Tableau 7** : Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles et mélanges croisés.

**Tableau 8** : Concentration minimale inhibitrice des fractions oxygénées.

## LISTE DES FIGURES

**Figure 01** : *Rosmarinus officinalis*.

**Figure 02** : *Thymus fantensii*.

**Figure 03** : *Salvia argentea*.

**Figure 04** : Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger

**Figure 5** : La colonne.

**Figure 6** : Fractions récupérées.

**Figure 7** : révélation CCM

**Figure 08** : Principe du test DPPH

**Figures 09** : Réduction du radical DPPH

**Figure 10**: Pourcentage d'inhibition des HEs

**Figure 11** : mécanisme réactionnel du test FRAP

**Figure 12** : la méthode FRAP

**Figure 13**: la méthode chélation de fer

**Figure 14** : zone d'inhibition

**Figure 15** : CMI

**Figure 16** : Schéma de fractionnement des huiles essentielles.

**Figure 17** : les composés majoritaires des HEs et leurs fractions oxygénées.

**Figure 18**:  $CI_{50}$  des huiles essentielles, fractions oxygénés et des mélanges croisés.

**Figure 19** : Pouvoir réducteur des trois huiles essentielles, des mélanges croisés et du contrôle positif

**Figure 20** : Pouvoir réducteur des trois fractions oxygénées, des mélanges croisés et du contrôle positif

**Figure 21**: Pouvoir chélateur des huiles essentielles, des mélanges croisés et du contrôle positif.

**Figure 22** : Pouvoir chélateur des fractions oxygénées, des mélanges et du contrôle positif

## Sommaire

### Chapitre I : Recherche bibliographique

Introduction .....	1
I.I. Huile essentielle.....	3
I.I.1.Définition .....	3
I.I.2.Composition chimique des huiles essentielles .....	3
I.I.3. Propriétés pharmacologiques et l'activité biologique des huiles essentielles .....	3
Les esters .....	3
Les oxydes .....	4
Alcools .....	4
Les phénols .....	4
Aldéhydes .....	4
I.I.4.Analyse des huiles essentielles .....	4
I. I.4.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	4
I.I.4.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM).....	5
I.I.5. Effet de synergie et d'antagonisme .....	5
I.II. Activité antioxydant .....	6
I.II.1. Introduction .....	6
I.II.2. Radicaux libres .....	6
I.II.3. Stress oxydatif .....	7
I.II.4. Les antioxydants .....	7
I.III. Activité antimicrobienne .....	7
I.III.1. Introduction .....	7
I.III.2. Activité antimicrobienne liée à la composition chimique de l'HE .....	7
I. IV. Les plantes médicinales .....	8
I. IV.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	8
I. IV.1.1. Description botanique .....	8
I. IV.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> .....	8
I. IV.1.3. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques .....	8
I. IV.2. <i>Thymus fontanesii</i> .....	9
I. IV.2.1. Description botanique .....	9
I. IV.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> .....	9
I.IV.2.3. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques .....	9
I.IV.3. <i>Salvia argentea</i> .....	10
I.IV.3.1. Description botanique .....	10
I.IV.3.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia argentea</i> .....	10
I.IV.3.3. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques .....	10

### Chapitre II : Matériel et méthode

II.1. Matériel végétal .....	11
II.2. Procède d'extraction des huiles essentielles .....	11
II.3. Rendement .....	11
II.4. Fractionnement des HES par chromatographie sur colonne .....	11
Principe.....	11
Protocole.....	12
II.5. Analyse des huiles essentielles et des extraits.....	12
Conditions GPC-FID .....	12
Conditions CPG-SM .....	13
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante .....	13
II.6.1. Méthode de DPPH .....	13
Principe .....	13

Protocole expérimental .....	13
II.6.2. Méthode de FRAP .....	15
Principe .....	15
Protocole expérimental .....	15
II.6.3. Chélation de fer .....	16
Principe .....	16
Protocole expérimental .....	16
II.7. Activité antimicrobienne .....	17
II.7.1 Méthode de diffusion de disques .....	17
II.7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	17
Principe .....	17
Protocole expérimental .....	18

### **Chapitre III : Résultat et discussion : Partie chimique**

III.1. Rendement des HEs .....	19
III.2. Analyse et identification des composé des HEs .....	19
III.2.1. Composition chimique de l'HE de <i>T. fontensii</i> .....	19
III.2.2. Composition chimique de l'HE de <i>R. officinalis</i> .....	20
III.2.3. Composition chimique de l'HE de <i>S. argentea</i> .....	20
III.3. Fractionnement et isolement des fractions oxygénées des HEs .....	21
III.4. Composition chimique des fractions oxygénées.....	22

### **Chapitre IV : Résultat et discussion : Partie biologique**

IV.1. Activité antioxydante .....	24
IV.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés et individuelles des huiles essentielles et des fractions oxygénées par la méthode de DPPH .....	24
IV.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés et individuelles des huiles essentielles et des fractions oxygénées par la méthode FRAP .....	25
IV.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés et individuelles des huiles essentielles et des fractions oxygénées par la méthode chélation de fer.....	27
IV.1.4. Discussion .....	28
IV.2. Activité antimicrobienne .....	29
IV.2.1. la méthode de disque .....	29
IV.2.2. la méthode de la CMI .....	30
IV.2.3. Discussion .....	31
V Conclusion générale .....	32
Référence .....	33





# INTRODUCTION

L'intérêt des produits naturels connaît depuis quelques années une importance croissante. Cet intérêt se manifeste par une demande croissante de produits naturels bioactifs sans conservateurs dénués de tout effet nocif ce qui a conduit l'industrie à envisager l'incorporation de substances considérées comme non synthétiques. Plusieurs composés phytochimiques y compris les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source éventuelle de molécules naturelles bioactives. Elles ont fait l'objet de nombreuses études pour leur utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, et anticancéreux. [1]

L'importance des antioxydants naturels en relation avec leurs usages thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification, et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles telles que les plantes médicinales et aromatiques. [2]

Les antioxydants sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour maintenir la qualité des aliments et les protéger des phénomènes d'oxydations. Actuellement les antioxydants commerciaux utilisés sont des antioxydants synthétiques tels que : le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), le tertibutylhydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG) ; mais leur utilisation semble destinée à disparaître en raison d'un risque cancérigène et notamment sont responsables de dommages causés dans le foie. Actuellement, les composés antioxydants font l'objet de nombreuses études qui s'intéressent au développement et la recherche, l'identification et l'isolation des antioxydants naturels à partir des végétaux et cela pour remplacer ceux qui sont synthétiques. [3,4]

Les plantes aromatiques constituent une source intéressante de nouveaux composés, les molécules bioactives, qui caractérise les HEs possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques telles que la propriété antioxydante. [5] Les HEs sont des mélanges liquides de composés volatils obtenus à partir de plantes aromatiques, le plus souvent par distillation à la vapeur. Ils constituent ce qu'on appelle « l'essence » d'une plante et ont généralement des parfums agréablement parfumés. [5] Malgré la grande diversité chimique observée, les principaux composants des huiles essentielles communes peuvent être classés en deux familles structurales: les terpénoïdes, et phénylpropanoïdes. En général, les composés phénoliques naturels comme la carvacrol ou le thymol agissent en tant qu'antioxydants en raison de leur forte réactivité avec les radicaux peroxy, qui sont éliminés par transfert d'atomes d'hydrogène. Elles sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif. [6]

Ce mémoire fixe comme objectif « Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de trois huiles essentielles et de leurs fractions oxygénées: Effet de synergie ou d'antagonisme»

A travers ce travail, nous essayerons dans un premier temps de faire une recherche bibliographique concernant :

- ✓ Les huiles essentielles (définition, biosynthèse, utilisation).
- ✓ Généralité sur le stress oxydatif, les radicaux libres, les antioxydants, l'activité antioxydante et antimicrobienne.
- ✓ La caractérisation des espèces étudiées *S. argentea*, *R. officinalis*, et *T. fontanesii* ce sont trois plantes de la famille des lamiacées (description botanique, composition chimique et utilisation).

La seconde partie du travail est réservée à l'étude expérimentale, dans laquelle nous allons:

- ✓ Extraire les HEs de *S. argentea*, *R. officinalis*, et *T. fontanesii* en utilisant un montage d'hydrodistillation type Clevenger.
- ✓ Fractionner (c.à.d isolation des fractions oxygénés et hydrocarbonés) des HEs par chromatographie sur colonne.
- ✓ Analyser et identifier des composés des HEs et des fractions oxygénés par CPG et CPG-SM,
- ✓ Etudier l'activité antioxydante des HEs et des fractions individuelles par les tests de DPPH, FRAP et de la Chélation de fer.
- ✓ Etudier l'activité antimicrobienne des HEs et des fractions individuelles sur des souches microbiennes responsables de nombreuses maladies d'origine humaine.
- ✓ Etudier l'effet de synergie et/ou antagonisme des combinaisons entre les huiles essentielles et entre les fractions oxygénées.

**CHAPITRE I :**  
**RECHERCHE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.I. LES HUILES ESSENTIELLES**

### **I.I.1. Définition :**

Les huiles essentielles appelées communément « essences » sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, sécrétées par les plantes aromatiques. [7] Il s'agit d'un produit odorant, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par l'entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. [8] Leurs propriétés antiseptique, antioxydant et anti-inflammatoire ont généré une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. [9]

### **I.I.2 Composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants variables, elles sont caractérisées par des composés majoritaires qui déterminent leurs propriétés biologiques. Les composants engendrent deux groupes d'origine biosynthétique distincte [10]: Les terpenoïdes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires, Ils sont caractérisés par une structure de base à cinq carbones (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) communément appelée isoprène, tels que monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés, et les sesquiterpènes qui sont des hydrocarbures. Les phénylpropanoïdes signifient les composés avec une chaîne de trois carbones liés à un cycle aromatique de six carbones. Beaucoup moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. [11]

### **I.I.3. Propriétés pharmacologiques et l'activité biologique des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques: Les huiles essentielles d'*Eucalyptus tereticornis* possèdent de puissants composés antimicrobiens dont le p-cymène est le composé le plus actif. [12] Par contre Les huiles essentielles des feuilles de *Clausena anisata* riche en estragole et en (E)-anéthole possèdent de puissants composés antioxydants. [13] Aussi elles ont des propriétés antitoxiques, antivirales, antiseptiques, anti-inflamatoire, et antiparasitaires. [7] En outre, certains molécules présentes dans les HEs sont dotées de propriétés antitumorales, en particulier les phénols (tels que le carvacrol, le thymol), les alcools (tels que le linalool), et les aldéhydes (tels que le cinnamaldéhyde). Ce sont généralement les HEs riches en de telles molécules qui présentent la plus haute efficacité cytotoxique contre des lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les composés des HEs tels que le carvacrol, constituent une nouvelle classe de drogues anticancéreuses très frappantes dans la régression des tumeurs avec une toxicité limitée. [14]

**Les esters :** Les esters donnent une odeur agréable aux huiles. Ils sont très souvent présents dans un grand nombre d'huiles essentielles. Ils comprennent par exemple l'acétate de linalyle, l'acétate de géraniol, l'acétate d'eugénol et l'acétate de bornyle. Les esters sont anti-inflammatoires, spasmolytiques, sédatifs et antifongiques. [15,16]

**Les oxydes :** les oxydes ou les éthers cycliques sont les odeurs les plus fortes, et de loin l'oxyde le plus connu est le 1,8-cinéole, car il est le plus omniprésent dans les huiles essentielles. L'oxyde de bisabolone, l'oxyde de linalol, l'oxyde de sclaréol et l'ascaridole sont d'autres exemples d'oxydes. Leurs avantages thérapeutiques sont expectorants et stimulant du système nerveux. [15,16]

**Alcools :** En plus de leur parfum agréable, les alcools sont les composants des huiles essentielles les plus bénéfiques sur le plan thérapeutique, sans aucune contre-indication. Ils sont antimicrobiens, antiseptiques, tonifiants, équilibrants et spasmolytiques. Des exemples d'alcools d'huiles essentielles sont le linalol, le menthol, le bornéol, le santalol, le nérol, le citronellol et le géraniol. [15,16]

**Les phénols :** Ces composants aromatiques sont parmi les plus réactifs, potentiellement toxiques et irritants, en particulier pour la peau et les muqueuses. Leurs propriétés sont similaires à celles des alcools mais plus prononcé. Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes et rubéifiantes, stimulent les systèmes immunitaire et nerveux et peuvent réduire le cholestérol. Les phénols se trouvent souvent sous forme de cristaux à la température ambiante. Les plus courants sont le thymol, l'eugénol, le carvacrol et le chavicol. [15,16]

**Aldéhydes :** Les aldéhydes sont des composants communs des HEs, instables et qui s'oxydent facilement. De nombreux aldéhydes sont des irritants des muqueuses et des sensibilisants cutanés. Ils ont des odeurs fruitées agréables, caractéristiques du sucré et se retrouvent dans certaines de nos herbes culinaires les plus connues telles que le cumin et la cannelle. Sur le plan thérapeutique, certains aldéhydes ont été décrits comme : antiviraux, antimicrobiens, vasodilatateurs, hypotenseurs, calmants, antipyrétiques. Des exemples courants d'aldéhydes dans les HEs comprennent le citral, le myrénal, le cuminaldéhyde, le cinnamaldéhyde et le benzaldéhyde. [15,16]

#### **I.I.4. Analyse des huiles essentielles**

##### **1.1.4.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La CPG est une méthode analytique chromatographique efficace, qui fournit d'excellentes séparations de mélanges quelque peu complexes dans un laps de temps raisonnable s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. CPG est définitivement l'outil de choix pour l'étude et le contrôle de la qualité des huiles essentielles et des extraits des hydrolats. D'autre part, la CPG permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. C'est une technique d'analyse quantitative qui fournit d'une part, le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé et qualitative sur la base des temps de rétention d'autre part. Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante

(indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Ces derniers demeurent constants dans la mesure où la programmation de température reste identique ; ils sont calculés sur colonne polaire (IRp) et apolaire (IRa) et sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou encore reportés dans la littérature. [17]

#### **I.I.4.2 Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM) :**

Depuis les années 1950, cette méthode de couplage CPG-SM n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire, des produits pétroliers, parfumerie, cosmétique et pharmaceutique.

L'objectif de cette méthode est de permettre l'identification de divers constituants d'un mélange complexe par spectrométrie de masse, ces divers constituants étant séparés par chromatographie en phase gazeuse. CPG-SM est en général une excellente technique pour fournir une identité. Cependant, pour analyser les différents constituants des huiles essentielles ou des hydrolats de manière efficace et précise, il est toujours nécessaire de choisir soigneusement les colonnes, les conditions d'injection, les conditions de température de la colonne, etc. La sélection des ions quantificateurs affecte directement l'identification et la limite de détection. [18]

#### **I.I.5. Effet de synergie et d'antagonisme :**

Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont tenté de démontrer la synergie d'action des constituants d'huile essentielle sur les différentes sortes de cellules dans le but de vaincre les réticences que suscite encore l'application de ces huiles en pharmacologie. [12]

Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent affecter leur activité. Par exemple, l'activité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* contre la souche *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est due à la synergie entre les principaux composants : le carvacrol et le thymol [19]. Une autre interaction synergique a été signalée entre le carvacrol et son précurseur, le p-cymène sur *Bacillus cereus*. [20] Des effets antagonistes, montrent une réduction de l'activité antibactérienne, ont également été signalés entre les molécules actives et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité. [21] Cependant, la comparaison des performances de chaque huile brute avec sa fraction hydrocarbonée isolée ou avec sa fraction oxygénée permet la discussion la plus intéressante. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contenant 67% de thymol et carvacrol et environ 14% de terpinène, offre un exemple de synergie entre les composants de l'huile essentielle. Alors que sa fraction hydrocarbonée isolée n'offrait aucune protection contre le saindoux et que la fraction oxygénée (contenant environ 94% de thymol+ carvacrol) ne différait pas de celle du carvacrol ou du thymol isolé, l'ensemble de l'huile

protégeait le saindoux de l'oxydation plus efficacement que toute fraction ou composant utilisé seul à la même concentration. [22]

L'interaction synergique signifie que l'effet total du mélange des produits chimiques pris ensemble est supérieur à la somme des effets des composés individuels. Sachant qu'une interaction antagoniste signifie que l'effet du mélange des produits chimiques est inférieur à la somme des effets des composés individuels. [23]

Différents aliments possèdent différents composés bioactifs aux capacités antioxydantes variées. Lorsque les aliments sont consommés ensemble, la capacité antioxydante totale des mélanges alimentaires peut être modifiée via des interactions synergiques, additives ou antagonistes entre ces composants, qui peuvent à leur tour modifier leurs impacts physiologiques. [23]

De plus, plusieurs recherches ont étudié l'effet synergique des HEs avec d'autres composants, particulièrement des médicaments conventionnels. Ces études restent plus ou moins bornées *in vitro*. Dans ce type de recherches, il y a des difficultés liées à la rationalisation des effets obtenus car les HEs sont des mélanges de molécules complexes de structures organiques très variées. Malgré ces difficultés, ces études sont très importantes et devraient encourager les études liées essentiellement aux effets synergiques avec la chimiothérapie car ces mélanges peuvent être des sources attirantes de nouveaux agents antitumoraux. [14]

## **I.II Activité antioxydant :**

### **I.II.1 introduction :**

Depuis quelques années, un nouveau concept envahi le monde des sciences biologiques et médicales, celui du « stress oxydant » qui signifie qu'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la majorité des maladies humaines. [24] Les espèces végétales présentent des antioxydants particulièrement des composés phénoliques ont été utilisés pour détruire les espèces réactives de l'oxygène et la prévention de plusieurs maladies. [25]

### **I.II.2 Radicaux libres :**

Un radical libre est une espèce qui possède un électron célibataire sur la couche externe caractérisée par une grande instabilité. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques requises pour le fonctionnement normal de l'organisme, se déroulent dans les cellules et les tissus du corps. Lors de la respiration cellulaire, la majeure partie de l'oxygène peut subir une réduction tétravalente qui se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ROS). [24,26]



### **I.II.3. Stress oxydatif :**

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres (les espèces réactives de l'oxygène) et les systèmes de défenses antioxydants. [27] Dans le cas où la capacité de l'organisme à neutraliser les radicaux libres s'excède, ils peuvent conduire à l'apparition de plusieurs maladies dont les maladies cardiovasculaires, complications du diabète, maladies neuro dégénératives, certains types de cancers et d'autres maladies liées au vieillissement. [24,25]

### **I.II.4. Les antioxydants :**

Les antioxydants sont des substances qui préviennent de façon significative d'inhiber la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. [24] l'effet antioxydant a été expliqué par deux mécanismes : Un mécanisme est attribué au piégeage de radicaux libres tels que les radicaux peroxy et empêcher la réaction en chaîne de ces derniers en raison de leurs propriétés redox. Un autre est attribué à la décomposition des hydroperoxydes. [28]

### **I.III. L'activité antimicrobienne :**

#### **I.III.1. Introduction :**

Le terme "antimicrobien" signifie toute substance utilisée pour inhiber les microorganismes ou empêcher leurs croissances. [29] Les huiles essentielles sont reconnues par leurs constituants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des différents groupes fonctionnels. Donc elles ont un spectre d'action très large puisqu'elles détruisent la croissance des bactéries et que leur activité antimicrobienne est particulièrement en fonction de leur composition chimique et principalement de la nature de leur composés volatils majeurs. [30,31]

#### **I.III.2. Activité antimicrobienne liée à la composition chimique de l'HE :**

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif, que les bactéries à Gram négatif. Cependant, les bactéries à Gram négatif semblent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire. [32] Le type et la structure moléculaire des constituants actifs présents dans les HEs sont les principaux facteurs modifiant leur activité antimicrobienne. La structure moléculaire semble présenter un rôle avantageux par la présence d'oxygène dans la molécule de terpène. [30] A cette base, l'activité antimicrobienne des composés des HEs est de l'ordre suivant : [31]

Phénol > Alcool > Aldéhyde > Cétone > Oxyde > Hydrocarbure > Ester

### III. Les plantes médicinales

#### III.1 *Rosmarinus officinalis* :

##### II.1.1 Description botanique :

Le romarin ou *Rosmarinus officinalis* est l'une des plantes les plus populaires en Algérie c'est un arbrisseau de la famille des lamiacées, son nom vernaculaire est « Iklil Al Jabal ». Le romarin est un arbuste dense, ramifié, à feuilles persistantes et à fleurs bleu-blanc. Il est caractérisé par des feuilles sessiles et coriaces avec des bords courbes, le dessus vert foncé et la granulosité et le fond des pages, avec une nervure médiane saillante et très bon caractéristique odeur. [33]



**Figure 01 :** *Rosmarinus officinalis*

##### II.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :

Les principaux constituants de l'HE de *R. officinalis* sont le camphre, le 1,8-cinéole, l' $\alpha$ -pinène, le bornéol, le camphène, [34] dont les proportions varient d'une région à une autre selon le stade végétatif et les conditions climatiques. Par exemple : le 1,8- cineole (27.23%),  $\alpha$ -pinène (19.43%) ont été signalé comme les principaux constituants de l'huile de la Chine, [35] alors que les principaux constituants au Maroc sont  $\alpha$ -pinène (37-40%), 1,8-cinéole (58-63%), camphre (41-53%). [36] L'huile obtenue à partir de *R. officinalis* de Corse et Sardaigne est caractérisé par la présence de verbénone (13.7–24.6%), l'acétate de bornyle (11.3–17.0%) et  $\alpha$ -pinène (24.9%). [37]

##### II.1.3 Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques :

*Rosmarinus officinalis* est une source très riche des phénols bioactifs qui est bien connu pour ses nombreuses utilisations en cuisine et pour ses propriétés pharmacologiques. C'est une plante qui contient de nombreux composés ayant une activité antioxydante, principalement des polyphénols dont les constituants les plus importants sont l'acide carnosique, l'acide caféique et ses dérivés tels que l'acide rosmarinique. [26] Dernièrement, il a été supposé que l'acide rosmarinique pourrait être utilisé pour empêcher le développement de la maladie d'Alzheimer. [38] Le romarin est un stimulant cérébral, légèrement antidépressives, très efficace dans le traitement de l'asthénie. Il soulage aussi céphalées et migraines. En lotion, le romarin soulage les douleurs rhumatismales. [34] L'huile essentielle de *R. officinalis* est importante pour ses utilisations médicinales et pour ses

puissantes propriétés antibactériennes, cytotoxiques, antimutagènes, antioxydantes, antiphlogistiques et chimiopréventives. [39,40]

### III.2. *Thymus fontanesii* :

#### III.2.1. Description botanique :

*Thymus fontanesii* ou le thym est une plante aromatique de la famille des lamiacées, son nom vernaculaire est « Zaâteur », c'est l'une des plantes les plus répandue en Algérie, largement utilisée par les populations locales pour ses vertus médicinales. *Thymus fontanesii* est un sous arbrisseau qui pousse de 10-12 cm de haut à tiges robustes et dressées, à feuilles oblongues- lancéolées, et à fleurs blanches. [41]

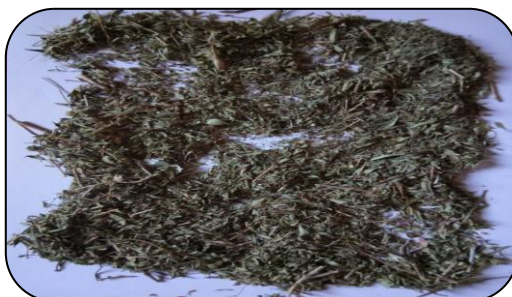


Figure 02 : *Thymus fontanesii*

#### II.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*:

Peu d'études ont été rapportées sur la composition chimique de l'HE de *T. fontanesii*. Les résultats d'une étude mentionnée par **N.Nabet** ont montré que le carvacrol (67.5%) et le  $\gamma$ -terpinene (13%) sont les principaux constituants de la composition chimique de l'HE de *T. fontanesii*. [42] Des études réalisées dans les différentes willayas d'Algérie, ont montré que le thymol (67.8 %) est le composé majoritaire de la région de Setif, [43] alors que dans la région de Tlemcen le carvacrol est la principale composante. [44]

#### III.2.3. Utilisation traditionnelle

Depuis longtemps, le genre *Thymus fontanesii* est utilisé comme épice ajoutée au plusieurs plats traditionnels pour le traitement contre les maladies respiratoires (asthme, bronchite, coqueluche). Il est très efficace en cas de rhume des foins. Pour un usage externe, il est utilisé en cas de douleurs sciatique ou rhumatismales pour soulager les piqûres d'insectes. Aussi pour soigner l'herpès, les aphtes, les mycoses, la gale et les poux. Des études montrent que le thym est un puissant antioxydant et il assure des doses élevées des acides gras essentiels dans le cerveau, ils ont établi aussi les vertus potentielles du thym et de l'huile essentielle en prévention du vieillissement. [34] L'HE de *Thymus* présente une grande activité antibactérienne, antifongique antimicrobienne ainsi qu'une activité antiseptique. [41]

### III.3 *Salvia argentea* :

#### III.3.1 Description botanique :

*Salvia argentea* est une plante herbacée de la famille des Lamiacées, de genre *Salvia*, son nom vernaculaire est « Ferrache enneda ». Elle se rencontre principalement dans les prairies caillouteuses, les sols volcaniques, les falaises rocheuses et les basaltes, à tiges et inflorescences visqueuses, verticillas très stériles, constitués seulement par des bractées. *S. argentea* a une large zone basique de feuilles, Les deux surfaces des feuilles sont fortement couvertes de poils soyeux qui lui donnent un aspect laineux, très doux au toucher. [45]



**Figure 03** : Partie aérienne de *S. argentea* [45]

#### III.3.2. Constituants chimiques de l'huile essentielle de *Salvia argentea* :

Certaines études ont été rapportées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia argentea* de la partie aérienne au Maroc [46], Serbie [47], Macédoine [48], et en Tunisie [49]. L'oxyde de caryophyllène a été signalé comme le constituant principal de l'HE de Macédoine (37,6%), suivi de l' $\alpha$ -copaène (8,5%) [48] alors que les principaux composants de la Serbie sont le viridiforol (32,4%), le manool (14,6%), l' $\alpha$ -humulène (10,7%) [47]. Pour la Tunisie les principaux constituants sont le viridiforol (26,9% et 18,7%), le manool (6,1% et 13,6%) [49]. En revanche, l'échantillon d'huile obtenu à partir du *S. argentea* de Maroc est caractérisé par le camphre (45,1%), le camphène (19,4%). [46]

#### III.3.3 Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques :

Centaines métabolites secondaires ont été isolées chez différentes espèces de *Salvia* et ont été testés pour une large gamme d'activités biologiques. En méditerranée, *Salvia* est connue pour ses propriétés antibactériennes, antispasmodiques, diurétique, antifongiques, régulatrice des désordres du cycle menstruel, antihémorragique et antiulcéreuse.[50] Les huiles essentielles de *S. argentea* ont été utilisées dans le traitement d'un grand nombre de maladies telles que celles du système nerveux, du cœur et du système respiratoire, de la circulation sanguine, du système digestif et des maladies endocriniennes et métaboliques.[51] De plus, il a été démontré que l'huile essentielle de *Salvia* avait des propriétés carminatives, [52] antispasmodiques, antiseptiques, astringentes et antibactérienne. [53]

**CHAPITRE II :**  
**MATÉRIEL ET**  
**MÉTHODE**

## II.1 Matériel végétal :

Notre étude a portée sur l'étude de trois espèces de la famille des lamiacées qui sont *Salvia argentea*, *Rosmarinus officinalis*, et *Thymus fontanesii*. Les racines de *S. argentea* ont été récoltées dans la région d'Ain Temouchent, tandis que les feuilles *R. officinalis* a été récoltée dans la région de Tlemcen (Sebdou) et les feuilles de *T. fontanesii* ont été achetées au marché local de Tlemcen.

## II.2 Procède d'extraction des huiles essentielles :

Le matériel végétal (500g de *S. argentea*, 400g de *T. fontanesii* et 600g de *R. officinalis*) destiné à la production des huiles essentielles a été soumis à une hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger, pendant une durée de 5-6 h. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C.



**Figure 04 :** Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger

## II.3 Rendement :

L'extraction par hydrodistillation des feuilles de *R. officinalis* a fourni une huile essentielle de couleur jaune claire avec une forte odeur, alors que les racines de *S. argentea* ont fourni une huile essentielle de couleur rouge brique, tandis que l'huile des feuilles de *T. fontanesii* est de couleur jaune foncé.

Le rendement en huile essentielle des plantes étudiées représente le rapport de la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétale. Les rendements d'extraction ont été calculés par rapport à la masse du végétal frais ou sec.

$$\text{Rd}\% = (m \text{ HE (g)} / m' \text{ (g)}) * 100$$

m : masse d'huile essentielle.      m' : masse de la matière végétale.

## II.4 Fractionnement des HES par chromatographie sur colonne :

### ➤ Principe :

La chromatographie sur colonne est une technique de séparation des constituants d'un mélange. Un mélange de solution est porté par un solvant à travers une colonne contenant un adsorbant solide, appelé la phase stationnaire. Le mélange de solvant et l'échantillon est appelé la phase

mobile. Molécules dans la phase mobile voyagent à travers la colonne à des vitesses différentes, basé sur leurs propriétés chimiques et leur affinité pour la phase stationnaire. Ainsi, chaque composé quitte la colonne à un autre moment. Une fois que les composés ont été séparés et purifiés, elles peuvent être traitées ultérieurement ou sont prêts à être distribués. [54]

➤ **Protocole expérimental :**

Le fractionnement des trois huiles essentielles a été effectué sur colonne de gel de silice. Les fractions ont été obtenues, en utilisant comme solvant le pentane pour récupérer les fractions hydrocarbonées et l'éther d'éthyle pour récupérer les fractions oxygénées. Finalement, toutes les fractions récupérées ont été révélées par UV-visible après la réalisation des CCM.



**Figure 5 :** La colonne.



**Figure 6 :** Fractions récupérées.



**Figure 7 :** révélation CCM

## II.5 Analyse des huiles essentielles et des extraits

➤ **Conditions GC-FID :**

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, Etats Unis), équipé d'un injecteur split/splitless, de deux colonnes capillaires Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ ) et Rtx-WAX (polyéthylène glycol, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ ) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène, la pression en tête de colonne est de 25 psi avec un débit de 1 ml/mn, la température de l'injecteur et des détecteurs est de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 35 mn à 230°C. L'injection se fait en mode split 1/50. Le volume injecté des échantillons (huiles essentielles et fractions) est de 0,2  $\mu\text{l}$ . Pour chacun des composés, les indices de rétention polaire et apolaire sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane. L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des indices de rétention calculés respectivement sur colonnes polaire et apolaire avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux rapportés dans la littérature. Les teneurs des composés

dans le mélange ont été exprimés en pourcentages relatifs (aire du constituant / aire totale du mélange) sur la base du signal FID.

### ➤ Conditions CPG-SM

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL (Walton, MA, Etats Unis), doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplées à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70eV. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité injectée est de 0,2 µL. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150°C. Les conditions chromatographiques (programmation de température, gaz vecteur, etc.) sont identiques à celles décrites pour la CPG. L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des spectres de masse (impact électronique) avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux présents dans les banques informatisées.

## II.6 Evaluation de l'activité antioxydante :

### II.6.1 Méthode de DPPH :

#### ➤ Principe :

Ce test est basé sur la mesure de la capacité de balayage des antioxydants vis-à-vis du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Le radical DPPH en solution est coloré en violet, il absorbe autour de 517 nm dans une solution d'éthanol ou méthanol. En présence d'antioxydant, il est réduit à l'hydrazine correspondante lorsqu'il réagit avec des composés donneurs d'hydrogène en formant une liaison moléculaire stable. Le produit réduit présente une coloration qui vire vers le jaune dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité de l'antioxydant. [55] La cinétique de la réaction varie selon l'antioxydant utilisé. [55]

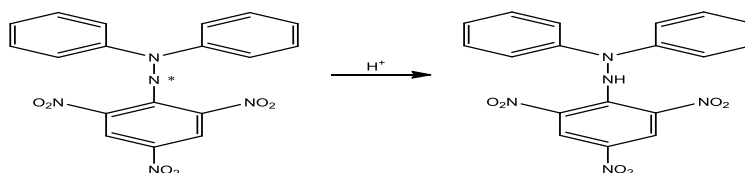


Figure 08 : Principe du test DPPH

#### ➤ Protocole expérimental :

#### ✓ Les échantillons individuels :

Tout d'abord, une solution méthanolique de DPPH a été préparée en solubilisant 3 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol. La solution est conservée dans le réfrigérateur et à l'abri de la



lumière pour empêcher sa dégradation. Des solutions mères d'échantillon des HEs et des fractions oxygénées (15 mg/ml pour *R. officinalis*, 7,5 mg/ml pour *T. fontanesii* et 1 mg/ml pour *S. argentea*) ont été diluées à des concentrations finales (0,25 mg/ml pour *R. officinalis*, 0,25 mg/ml pour *T. fontanesii* et 0,03 mg/ml pour *S. argentea*) dans le méthanol. Puis 1 ml de chaque dilution est mélangé avec 1 ml de la solution méthanolique de DPPH, suivie par une incubation à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm à chaque 30 min pendant 2h pour chaque échantillon par rapport au blanc contenant 2 ml de méthanol, et par rapport au contrôle négatif contenant 1ml de la solution de DPPH et 1 ml du méthanol.

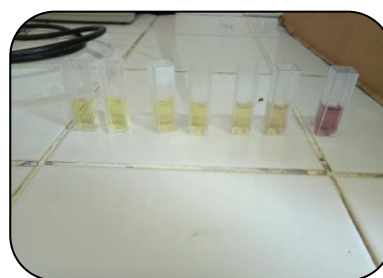
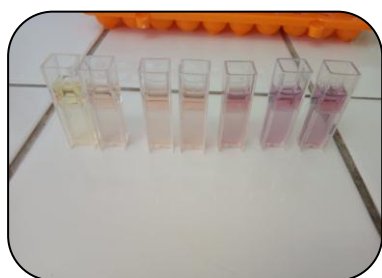
L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif.

✓ **Les mélanges croisés :**

Pour les mélanges croisés des HEs, fractions oxygénées, on a utilisé des proportions équimolaire pour chaque mélange (15 mg/ml pour *R. officinalis* + *T. fontanesii* [7,5mg pour *T. fontanesii* et 7,5 mg pour *R. officinalis*], 1mg/ml pour *T. fontanesii* + *S. argentea* [0,5 mg pour *S. argentea* et 0,5 mg pour *T. fontanesii*] et 1 mg/ml pour *S. argentea* + *R. officinalis* [0,5 mg pour *S. argentea* et 0,5 mg pour *R. officinalis*], et 1,5 mg/ml pour *S. argentea* + *R. officinalis* [0,5 mg pour *S. argentea*, 0,5 mg pour *R. officinalis* et 0,5 mg pour *T. fontanesii*], avec le même protocole décrit ci-dessus.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydant est calculé comme suit :

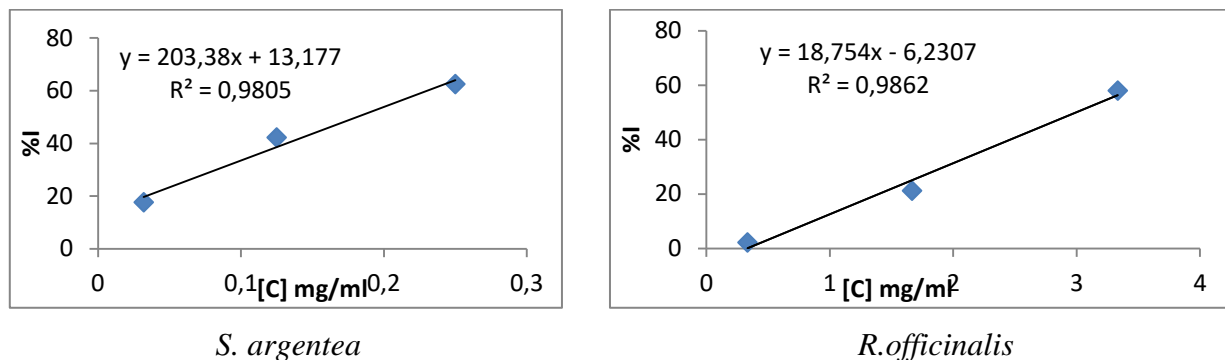
$$\text{Le pourcentage d'inhibition \%} = \frac{(\text{Absorbance controle} - \text{Absorbance échantillon})}{\text{Absorbance controle}} \times 100$$



**Figures 09 :** Réduction du radical DPPH

➤ **Calcul des CI<sub>50</sub> :**

CI<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50%), ou EC<sub>50</sub> (Efficient concentration 50) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radicale DPPH. Les valeurs des IC<sub>50</sub> ont été calculées graphiquement par des pourcentages (%) d'inhibition en fonction de différentes concentrations (mg/mL) des extraits testés. [55]

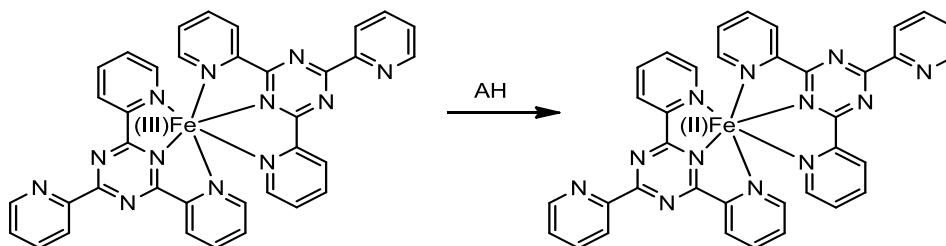


**Figure 10:** Pourcentage d'inhibition des HES

## II.6.2 Méthode de FRAP :

### ➤ Principe :

L'analyse FRAP (Ferric Reducing Activity Power) consiste à réduire les ions ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune aux ions ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur vert-bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron. Le pouvoir réducteur d'un échantillon est associé à son pouvoir antioxydant. La variation de la coloration est mesurée à 700 nm par un spectrophotomètre UV. Une augmentation de l'absorbance (DO) signifie une élévation du pouvoir réducteur des extraits testés. [56]



**Figure 11 :** mécanisme réactionnel du test FRAP

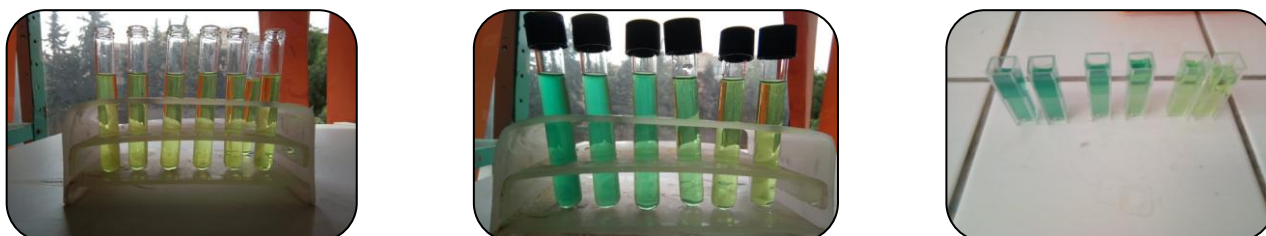
### ➤ Protocole expérimental :

#### ✓ L'échantillon individuel :

Une solutions tampon de phosphate à 0.2 M (pH=6,6) (à partir d'une solution monobasique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , et une solution dibasique  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), une solution de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%, d'acide trichloracétique (TCA) à 10%, et une solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 0,1% ont été préparées dans l'eau distillée.

Des solutions mères d'échantillon des HES, des fractions oxygénées (15 mg/ml pour *R. officinalis*, 7,5 mg/ml pour *T. fontanesii* et 1 mg/ml pour *S. argentea*) ont été diluées à des concentrations finales (0,25 mg/ml pour *R. officinalis*, 0,25 mg/ml pour *T. fontanesii* et 0,03 mg/ml pour *S. argentea*) dans le méthanol. Puis 1 ml de chaque dilution est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M dont le pH=6,6 et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de

potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. 2,5 ml d'aliquote de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée ( $H_2O$ ) et 0,5 ml d'une solution aqueuse de Chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant 1ml de l'extrait par 1ml de méthanol.



**Figure 12** : Méthode FRAP

#### ✓ Les mélanges croisés :

Des mélanges croisés des huiles essentielles et des fractions oxygénées ont été utilisé avec des proportions équimolaire pour chaque mélange (15 mg/ml pour *R. officinalis* + *T. fontanesii* [7,5mg pour *T. fontanesii* et 7,5 mg pour *R. officinalis*], 1mg/ml pour *T. fontanesii* + *S. argentea* [0,5 mg pour *S. argentea* et 0,5 mg pour *T. fontanesii*] et 1 mg/ml pour *S. argentea* + *R. officinalis* [0,5 mg pour *S. argentea* et 0,5 mg pour *R. officinalis*], et 1,5 mg/ml pour *S. argentea* + *R. officinalis* [0,5 mg pour *S. argentea*, 0,5 mg pour *R. officinalis* et 0,5 mg pour *T. fontanesii*], avec le même protocole décrit ci-dessus. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions.

### II.6.3 Chélation de fer :

#### ➤ Principe :

Cette méthode consiste à mesurer la capacité chélatrice des HEs, en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-o-phénanthroline après incubation des échantillons avec le fer. L'o-phénanthroline est un agent chélateur sélectif des ions ferreux. Il est utilisé pour déterminer l'étendue de la réduction des ions ferriques en ions ferreux par les antioxydants. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur rouge qui est suivit par à 510 nm. L'augmentation de l'absorbance se traduit par une augmentation de la capacité chélatrice qui est associé à son pouvoir antioxydant. [57]

#### ➤ Protocole :

Tout d'abord deux solutions ont été préparées, une solution de l'o-phénanthroline à 0,05% dans le méthanol, et une solution de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 200  $\mu$ M dans l'eau distillé.

Des solutions mères d'échantillon des HES, des fractions oxygénées (15 mg/ml pour *R. officinalis*, 7,5 mg/ml pour *T. fontanesii* et 1 mg/ml pour *S. argentea*) ont été diluées à des

concentrations finales (0,25 mg/ml pour *R. officinalis*, 0,25 mg/ml pour *T. fontanesii* et 0,03 mg/ml pour *S. argentea*) dans le méthanol. Puis, Dans des tubes à hémolyses, 1ml de chaque dilution a été introduit et mélangé avec 1ml de la solution de l'o-phénanthroline, après 2ml de la solution de  $FeCl_3$  sont additionnés, suivie par une incubation durant 10 min à température ambiante. Enfin la mesure des absorbances était effectuée à 510 nm contre un blanc contenant 1 ml de méthanol, 1ml de la solution de phénanthroline, et 2ml de la solution de  $FeCl_3$ .

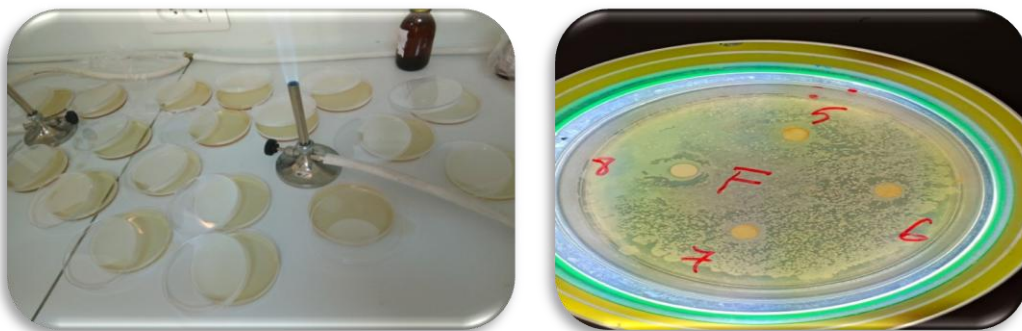


**Figure 13:** la méthode chélation de fer

## II.7 activité antimicrobienne :

### II.7.1 Méthode de diffusion de disques :

Les échantillons ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disques. Tout d'abord on fait fondre la gélose utilisée dans un bain marie à haute température. Puis on verse une quantité sur des boîtes à pétrie. Après refroidissement à température ambiante, on ensemence une petite quantité de la souche avec un coton-tige stérile. A l'aide d'une pince, on dépose quatre disques en papier à la surface de la gélose d'une boîte de pétrie. Puis on ajoute un volume de notre échantillon à l'aide d'une micropipette. Les boîtes de Pétrie sont laissées au moins 8h au réfrigérateur pour une bonne diffusion. Chaque échantillon diffuse à partir du disque, et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de notre échantillon. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible à l'échantillon étudié.



**Figure 14 :** zone d'inhibition

### II.7.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

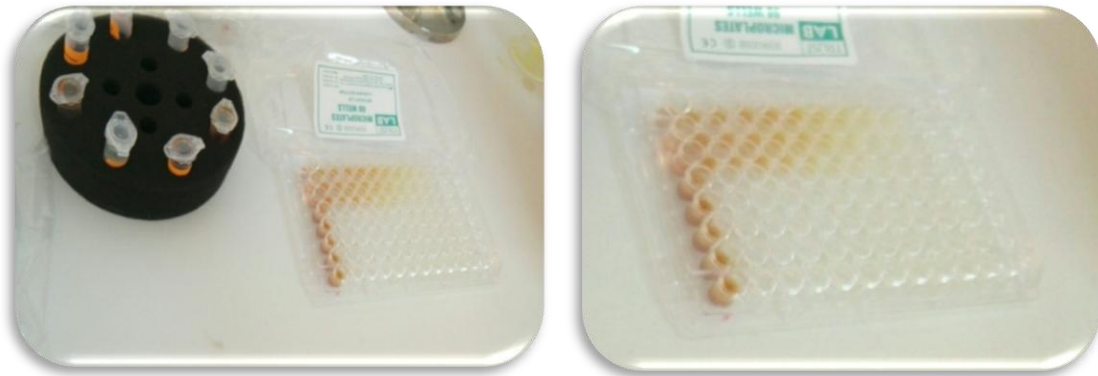
#### ➤ Principe :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après une durée d'incubation de 18 à 24 h, elle est déterminée

par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés. C'est la plus petite concentration pour laquelle il n'existe plus de trouble observé à l'œil nu. [58]

➤ **Protocole :**

Tout d'abord des solutions mères ont été préparées, les HEs et ces fractions ont été dissous dans le DMSO. Puis, sur des microplaques qui comportent 12 colonnes et 8 lignes, on dépose 100  $\mu$ L de BMH sur chaque puits. Dans la première colonne de chaque microplaque, on met 100  $\mu$ L de l'échantillon étudié. Des dilutions en série ont été préparées jusqu'à la dixième colonne, les deux derniers colonnes ont été réservé pour le témoin négatif qui comporte 100 $\mu$ l de BMH, et le témoin positif qui comporte 100  $\mu$ L le BMH et 20  $\mu$ L de la souche. En ajoutant 20  $\mu$ L de la souche sur les dix colonnes contenant l'échantillon étudié et le BMH sachant que sur chaque ligne on met une souche différente. Les microplaques sont recouvertes et incubées à 37°C. La CMI a été déterminée après 18 à 24 heures d'incubation à partir du premier puits de la gamme qui ne comporte plus de croissance bactérienne visible.



**Figure 15 : CMI**

**CHAPITRE III :**  
**RÉSULTAT ET**  
**DISCUSSION :**  
**PARTIE CHIMIQUE**

### III.1. Rendement des huiles essentielles (HEs) :

Les rendements des huiles essentielles de *S. argentea*, *T. fontanesii* et *R. officinalis* sont exprimés en pourcentages massiques (g/100g) par rapport à la matière végétale sèche (Tableau 1).

**Tableau 1:** le rendement (%) des trois plantes.

Plantes	M (g) HE	M (g) matière végétale	Rendement	Couleur des HES
<i>T. fontanesii</i>	7,81	400	2%	Jaune claire
<i>R. officinalis</i>	4,48	300	1,5%	Jaune foncé
<i>S. argentea</i>	0,51	500	0,1%	Rouge brique

Les résultats ont montré que les rendements en HEs varient de manière significative d'une plante à une autre. Ils vont de 0,1 à 1,95 % (tableau 1). Le rendement le plus élevé (1,95%) a été observé pour l'huile de *T. fontanesii*, tandis que le rendement le plus faible (0,1%) a été observé pour l'huile de *S. argentea*. En comparons, les rendements des huiles essentielles obtenus avec ceux rapportés dans la littérature, nous remarquons que le rendement de *R. officinalis*, est du même ordre de grandeur que celui cité par **Fechtal et al** [59] et **Ayadi et al** [60], ces derniers ont montré que le rendement en huile de *R. officinalis* varie entre 1%-2,5%. Alors que le rendement obtenu en huile à partir des feuilles de *T. fontanesii* est significativement supérieur (0,9%) à celui cité par **Dob et al** [61].

D'après plusieurs auteurs, la différence dans le rendement en huile essentielle est due à certains facteurs: la saison de récolte, la méthode de récolte, la durée de séchage, l'origine de récolte de l'espèce et le type d'organe de la plante extrait [62].

### III.2. Analyse et identification des composés des HEs :

Les huiles essentielles des trois plantes ont été analysées par CPG et CPG/SM. La composition chimique des constituants volatils de *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Salvia argentea* est présentée dans le tableau 2.

#### III.2.1. Composition chimique de l'HE de *T. fontanesii* :

Un total de quinze (15) constituants chimiques représentant 97,2% de la composition total ont été trouvés dans l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*. L'huile été caractérisée par la présence d'une teneur plus élevée en monoterpènes oxygénés (80,3%), suivie de monoterpènes hydrocarbonés (15,3%), tandis que les composés sesquiterpéniques ont été présents en faible pourcentage (1,6%) (Tableau 2)

Les principaux composants de l'huile essentielle été le thymol (76,6%), le P. cymène (7,4%) et le myrcène (2,1%). Très peu d'études ont rapportées la composition chimique de l'huile essentielle de *T. fontanesii*. Le thymol a été trouvé par d'autres auteurs [44,63] avec un pourcentage de 67,8%

à 77,72% respectivement. Alors que **Nabet et al** [42] a montré que le principal composant de l'huile de *T. fontanesii* été le carvacrol (67,5%).

### **III.2.2. Composition chimique de l'HE de *R. officinalis* :**

La composition chimique des constituants volatils de l'huile essentielle de *R. officinalis* est présentée au tableau 2. Les résultats de la composition chimique montrent que l'huile essentielle été constitués de 15 composantes chimiques.

L'huile été caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oxygénés qui représentaient 71.9% de la composition totale de l'huile. Le 1.8-cineole (43,2%) et le camphre (14,3%) étaient les principaux composés, suivis par de faibles quantités de camphor (4.3%), terpinen-4-ol (4,2%) et linalool (3,6%). Alors que les monoterpènes hydrocarbonés (25,7%) été représenté majoritairement par  $\alpha$ -pinène (12,7%),  $\beta$ -pinène (7,4%), camphene (2,8%) et le myrcène (2,1%), tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés ont été présent en faible quantité (0,8%) (Tableau 2).

Nos résultats sont similaires par rapport aux autres études rapportées précédemment au Maroc [36] et en Chine [35] qui ont montré que le 1,8-cinéole, le camphre et l' $\alpha$  pinène étaient les composés majoritaires avec des pourcentages qui variaient d'une région à une autre selon le stade végétatif et les conditions climatiques. D'autre part, l'huile obtenu de *R. officinalis* de Corse et Sardaigne été caractérisée par la présence de verbénone (13,7–24,6%), l'acétate de bornyle (11,3–17,0%) [37].

Cette variabilité chimique des constituants de l'huile de même espèce pourrait être due au chémotype de la plante, et à certains facteurs dont l'influence de facteurs externes (climat, composition du sol, les nutriments etc.), et l'influence du cycle végétatif.

### **III.2.3. Composition chimique de l'HE de *S. argentea* :**

22 composés chimiques ont été identifiés représentant 91,1% de la composition totale de l'HE des racines de *S. argentea*. L'analyse de la composition chimique de l'huile étudiée a indiqué une prédominance des diterpènes oxygénés (48,3%) et monoterpène oxygénés (28,4%). Les quantités des diterpènes hydrocarbonés (10,9%), des sesquiterpènes oxygénés (1,6%), et des sesquiterpènes hydrocarbonés (1,6%) sont relativement faibles. Les monoterpènes hydrocarbonés ne représentent que 0,3% de la composition chimique totale de l'huile essentielle. Le principal composant de l'huile était le ferruginol (19,5%) suivie par la pulégone (17,9%), le 6,7-Dihydroferruginol (11,3%), et l'abitatriène (10,9%). (Tableau 2) Très peu d'études ont été rapportées sur la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *S. argentea*.

Au Maroc, ils ont trouvé un profil chimique tout à fait différent par exemple, les composés majoritaires sont le camphre, le camphène [46] par contre en Serbie, les composés majoritaires sont



le viridiflorol et le manool [47]. En ce qui concerne la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *S. argentea* aucune étude n'a été réalisée.

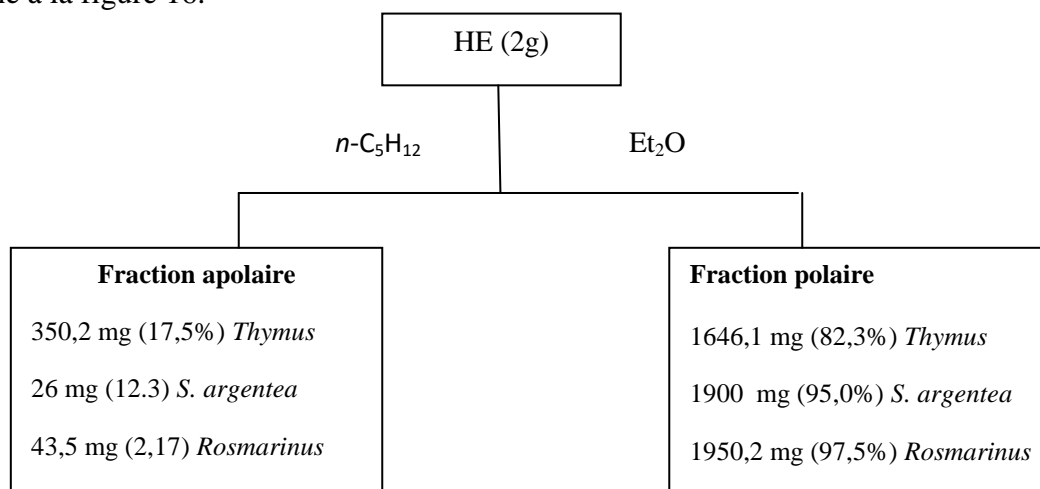
**Tableau 02:** Composition chimique des trois huiles essentielles.

No	Composés	IR <sub>apol litt</sub>	IR <sub>apol</sub>	IR <sub>pol</sub>	T.F	R.O	Racine S.A	Identification
1	<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	936	931	1028	0,9	<b>12,7</b>	-	RI, MS
2	Camphene	943	944	1066	0,2	2,8	0,1	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	-	-	0,1	RI, MS
4	$\beta$ -Pinène	978	972	1113	0,1	7,4	-	RI, MS
5	Myrcènes	987	982	1160	2,1	2,1	-	RI, MS
6	$\alpha$ -Phellandrène	1002	999	1161	-	0,2	-	RI, MS
7	$\alpha$ -Terpinène	1008	1011	1270	1,7	-	-	RI, MS
8	<i>p</i> -Cymène	1015	1015	1270	7,4	0,5	-	RI, MS
9	Limonène	1020	1021	1195	-	-	0,1	RI, MS
10	<b>1,8-Cinéole</b>	1024	1021	1211	-	<b>43,2</b>	-	RI, MS
11	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimène	1029	1022	1234	0,6	-	-	RI, MS
12	$\gamma$ -Terpinène	1051	1050	1245	2,3	-	-	RI, MS
13	Linalool	1078	1075	1280	1,7	3,6	3,1	RI, MS
14	Camphor	1123	1124	1506	-	4,3	-	RI, MS
15	<b>Camphre</b>	1144	1145	1532	-	<b>14,3</b>	-	RI, MS
16	Bornéol	1148	1150	1688	0,3	1,1	1,8	RI, MS
17	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1,3	4,2	-	RI, MS
18	$\alpha$ -Terpinéol	1179	1177	1688	-	-	0,5	RI, MS
19	<b>Pulégone</b>	1213	1216	1640	-	-	<b>17,9</b>	RI, MS
20	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1,1	4,2	-	RI, MS
21	<b>Thymol</b>	1266	1263	2181	<b>76,6</b>	-	-	RI, MS
22	Carvacrol	1278	1286	2193	0,6	-	-	RI, MS
23	Piperitenone	1315	1313	1900	-	-	0,5	RI, MS
24	Piperitenoneoxide	1333	1335	1945	-	-	0,1	RI, MS
25	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1416	1591	1,6	0,2	-	RI, MS
26	<i>E</i> - $\beta$ -Caryophyllène	1424	1418	1583	-	-	0,6	RI, MS
27	$\alpha$ -Humulène	1455	1448	1668	-	0,6	-	RI, MS
28	Germacrène D	1480	1474	1692	-	-	0,3	RI, MS
29	$\alpha$ -Muuroène	1496	1492	1709	-	-	0,4	RI, MS
30	$\gamma$ -Cadinène	1507	1506	1750	-	-	0,3	RI, MS
31	Spathuléol	1564	1568	2103	-	-	0,4	RI, MS
32	Caryophyllène-oxyde	1578	1580	1980	-	-	0,3	RI, MS
33	14-Hydroxy- $\delta$ -cadinène	1789	1780	2530	-	-	0,9	RI, MS
34	<b>Abitatriène</b>	2049	2049	2495	-	-	<b>10,9</b>	RI, MS
35	( <i>Z</i> )-Phytol	2076	2080	2574	-	-	1,5	RI, MS
36	( <i>E</i> )-Phytol	2103	2107	2615	-	-	<b>13,5</b>	RI, MS
37	<b>6,7 Dihydroferruginol</b>	2208	2207	-	-	-	<b>11,3</b>	RI, MS
38	cis-Ferruginol	2286	2283	-	-	-	2,5	RI, MS
39	<b>Ferruginol</b>	2330	2329	2882	-	-	<b>19,5</b>	RI, MS
<b>Total identification %</b>					<b>97,2</b>	<b>98,4</b>	<b>91,1</b>	
% Monoterpène hydrocarbonés					<b>1,6</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	
% Sesquiterpènes hydrocarbonés					<b>1,9</b>	<b>1,3</b>	<b>2,2</b>	
% Monoterpènes oxygénés					<b>80,3</b>	<b>71,9</b>	<b>28,4</b>	
% Sesquiterpènes oxygénés					-	-	<b>1,6</b>	
% Diterpènes hydrocarbonés					-	-	<b>10,9</b>	
% Diterpènes oxygénés					-	-	<b>48,3</b>	

### III.3. Fractionnement et isolement des fractions oxygénées des HEs :

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés aux fractions oxygénées des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S argentea* afin d'étudier l'approche complémentaire qui permet de lier le domaine de la biologie à la chimie, en d'autres termes, de déterminer leur pouvoir antioxydant et antimicrobien.

2g de chaque huile essentielle ont été soumis à un fractionnement sur colonne ouverte a gel de silice fine avec du pentane puis de l'éther d'éthylque comme éluant. Le schéma du fractionnement est donné à la figure 16.



**Figure 16** : Schéma de fractionnement des huiles essentielles

#### III.4. Composition chimique des fractions oxygénées :

Les fractions oxygénées des trois huiles essentielles ont été analysées par CPG et CPG/SM. La composition chimique des constituants des fractions des huiles essentielles de *T. fantanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* est présentée dans le tableau 3.

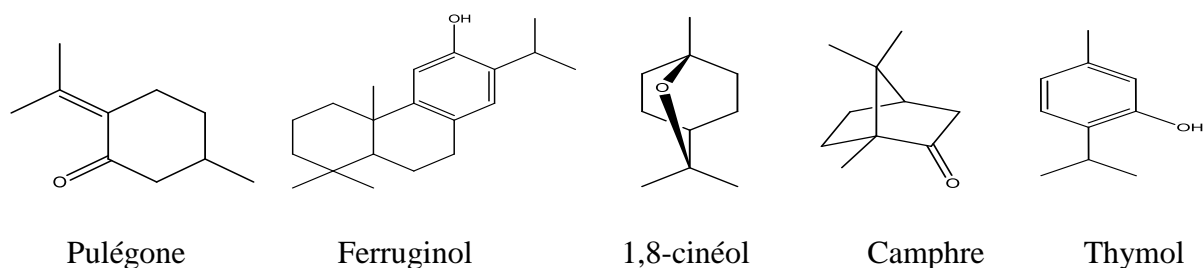
Un total de 9 composés, représentant 96,7% de la fraction oxygénée de l'huile essentielle totale de *Thymus fantanesii*, ont été identifiés par leurs indices de rétention et leurs données spectrales de masse. La composition chimique de fraction oxygénée de l'huile essentielle été dominée par le thymol (84,3 %). C'est le même composé majoritaire qui a été trouvé dans l'huile de *T. fontanesii* avec un pourcentage presque identique (76,6%) (Tableau 3).

Les résultats obtenus indiquent que les fractions oxygénées de l'huile de *R. officinalis* contenait 13 composants chimiques représentent 92,2% de la composition chimique totale. L'analyse nous a permis d'identifier le 1,8-cinèole comme composé majoritaire suivie par le camphre qui représentaient, respectivement 46,2% et 17,1% de la composition chimique de la fraction oxygénée de l'huile. Ces résultats sont similaires par rapport aux résultats obtenus de l'analyse chimique de l'huile avec des proportions différentes. (Tableau 3)

10 composés, représentant environ 93,2% de fraction oxygénée de l'huile des racines de *S. argentea* ont été identifiés. Les constituants majoritaires de la fraction oxygénée étaient le ferruginol (32,5%), le pulegone (19,4%), et l'abitatriene (12,6%). (Tableau 3)

**Tableau 03: Composition chimique des trois fractions oxygénées**

No	Composés	IR <sub>apol litt</sub>	IR <sub>apol</sub>	IR <sub>pol</sub>	Oxygéné Thym	Oxygéné Romarin	Oxygéné Salvia	Identification
1	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0,5	-	-	RI, MS
2	(E)-2-Héxanal	762	768	1216	1,2	-	-	RI, MS
3	<b>1,8-Cineole</b>	1024	1021	1211	-	<b>46,2</b>	-	RI, MS
4	Linalool	1083	1085	1538	1,7	-	-	RI, MS
5	Camphor	1123	1124	1506	-	6,5	-	RI, MS
6	Menthone	1134	1135	1456	-	-	6,5	RI, MS
7	$\alpha$ -pinocarvone	1135	1139	1632	-	1,4	-	RI, MS
8	<b>Camphre</b>	1144	1145	1532	-	<b>17,1</b>	-	RI, MS
9	Bornéol	1148	1150	1688	-	5,2	2,1	RI, MS
10	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	3,2	6,5	-	RI, MS
11	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1176	1690	0,6	-	-	RI, MS
12	Décanal	1195	1201	1795	1,8	-	-	RI, MS
13	<b>Pulegone</b>	1213	1216	1640	-	-	<b>19,4</b>	RI, MS
14	<i>trans</i> -Myrtanol	1241	1242	1859	-	0,6	-	RI, MS
15	<b>Thymol</b>	1266	1263	2181	<b>84,3</b>	0,6	-	RI, MS
16	Acetate de bornyl	1285	1280	1600	-	8,2	-	RI, MS
17	Piperitenone	1315	1313	1900	-	-	0,1	RI, MS
18	Eugénol	1330	1329	2164	2,1	0,5	-	RI, MS
19	Piperiteneoxide	1333	1335	1945	-	-	0,1	RI, MS
20	Spathulenol	1564	1568	2103	-	-	0,9	RI, MS
21	Spathuléol	1572	1560	2120	-	0,3	-	RI, MS
22	Globulol	1589	1578	2067	-	0,3	-	RI, MS
23	Caryophyllène oxide	1578	1567	1969	1,3	1,4	-	RI, MS
24	(E)-Phytol	2103	2107	2615	-	-	8,9	RI, MS
25	6,7 Dihydroferruginol	2208	2207	-	-	-	6,5	RI, MS
26	cis-Ferruginol	2286	2283	-	-	-	3,6	RI, MS
27	Ferruginol	2330	2329	2882	-	-	32,5	RI, MS
<b>Total identification %</b>					<b>96,7</b>	<b>92,2</b>	<b>93,2</b>	



**Figure 17 :** les composés majoritaires des HEs et leurs fractions oxygénées.

**CHAPITRE IV :**  
**RÉSULTAT ET**  
**DISCUSSION :**  
**PARTIE BIOLOGIQUE**

## IV.1. Activité antioxydantes:

### IV.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés et individuelles des huiles essentielles et des fractions oxygénées par la méthode de DPPH :

#### ✓ Huiles essentielles individuelles

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pourcentage d'inhibition du DPPH• radical sont présentés sur le tableau 4. Il montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration en huiles essentielles. Toutes les HEs testées ont montré une activité antioxydante.

Les tests ont montré que l'huile essentielle de *S. argentea* avait la capacité de réduire le radical DPPH• à 88,4% lorsqu'elle été utilisée à une concentration faible de l'ordre de 1 mg/L. En revanche, l'huile essentielle de *T. fontanesii* nécessitait une concentration plus élevée (7,5 mg/L) pour obtenir un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 92%. D'autre part, la plus faible activité de piégeage des radicaux a été démontrée pour l'huile essentielle de *R. officinalis* (88,8%) à une concentration de 10 mg/L (Tableau 4).

**Tableau 4 :** pourcentage d'inhibition (%) du DPPH en fonction des concentrations des HEs et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.

Echantillons	Activité antioxydante (%)						
	Concentration (mg/mL)	0,25	0,5	1,25	2,5	5,0	7,5
<i>T. fontanesii</i>	Concentration (mg/mL)	0,25	0,5	1,25	2,5	5,0	7,5
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	32,1	58,9	69,2	87,9	90,5	92,2
<i>R. officinalis</i>	Concentration (mg/mL)	0,33	1,66	3,33	5,0	6,6	10
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	5,9	24,0	58,9	67,4	68,8	83,8
<i>S. argentea</i>	Concentration (mg/mL)	0,03	0,05	0,125	0,25	0,5	1,0
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	6,9	17,6	42,2	62,4	78,7	88,4
A. ascorbique	Concentration (mg/mL)	0,04	0,05	0,06	0,08	-	-
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	39,0	51,0	68,5	97,8	-	-

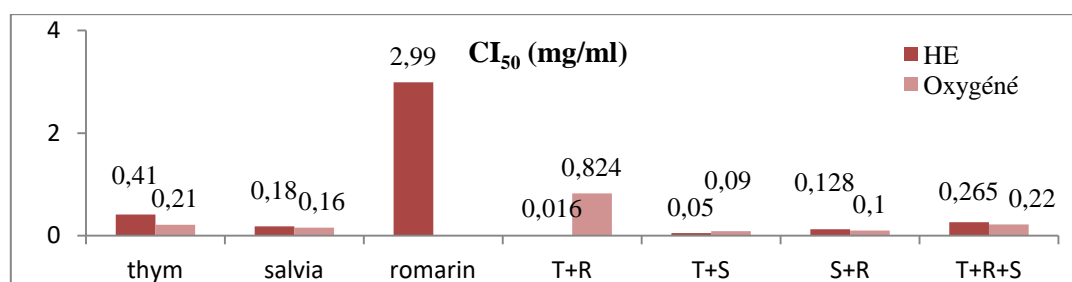
Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant des huiles étudiées, les valeurs des IC<sub>50</sub> (mg/ml) ont été déterminées. Plus la valeur de la CI<sub>50</sub> est faible plus l'activité est importante.

D'après le calcul des CI<sub>50</sub>, l'activité antioxydante la plus importante a été obtenue avec l'HE de *S. argentea* (0,18 mg/ml), suivi de l'HE de *T. fontanesii* (0,41 mg/ml). Cependant, l'effet balayage du radical DPPH le plus faible a été obtenu par l'HE de *R. officinalis* avec une CI<sub>50</sub>= 2,99 mg/ml qui a été largement inférieure à celle de l'acide ascorbique (0,049 mg/mL) (Figure 18).

#### ✓ Mélanges croisés

L'objectif de cette étude s'intéressé à l'étude du pouvoir antioxydant des combinaisons des HEs dont le but d'évalué leur effet synergique et/ou antagonisme. D'après les résultats de la figure 18, des activités antioxydantes synergiques ont été observés après le mélange des huiles : La

combinaison de l'HE de *T. fontanesii* avec celle de *R. officinalis* présentait une très forte inhibition avec une  $CI_{50}$  de 0,016 mg/L. On terme de comparaison avec le témoin, le mélange des huiles de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* (0,016 mg/ml) été trois fois plus actif que l'acide ascorbique (0,049 mg/mL). Suivi par le mélange entre les huiles du *T. fontanesii* et du *S. argentea*, ( $CI_{50}$  de 0,05 mg/ml) très proche de l'acide ascorbique (0,049 mg/ml). La combinaison de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *S. argentea* présentait aussi une intéressante inhibition ( $CI_{50}$  = 0,128 mg/ml) du radical DPPH mais qui été plus faible que l'acide ascorbique (Figure 18).



**Figure 18 :  $CI_{50}$  des huiles essentielles, fractions oxygénés et des mélanges croisés**

Le mélange entre les trois HES a donné une  $CI_{50}$  de 0,265 mg/ml, présentant un effet antagonique par rapport à l'huile du *S. argentea* qui a perdu de son pourcentage d'inhibition et un effet synergique par rapport à l'huile de *T. fontanesii*, et celle de *R. officinalis* qui est devenu onze (11) fois plus active que l'huile de romarin, et deux fois plus active que l'huile de thym (Figure 18).

#### ✓ **Fractions oxygénées croisées et individuelles**

Parmi les fractions testées, la fraction oxygénée de *S. argentea* possédait la plus forte capacité à réduire le radical DPPH, avec une  $CI_{50}$  de 0,16 mg/ml qui été presque égale à celle de l'HE (0,18 mg/ml). Suivie de celle de *T. fontanesii* avec une  $CI_{50}$  de 0,21 mg/ml, deux fois supérieure à celle de l'huile, mais qui reste moins importante que l'acide ascorbique (0,049 mg/mL) (Figure 18). La fraction de *S. argentea* combinée à la fraction de *T. fontanesii* présentait une activité ( $CI_{50}$  = 0,09 mg/mL) plus importante que son association avec la fraction de *R. officinalis* ( $CI_{50}$  = 0,1 mg/mL).

Un effet antagonisme a été détecté après l'association des fractions oxygénées du thym avec celui de romarin. Le mélange entre les trois oxygénées a donnait une  $CI_{50}$  de 0,22 mg/ml, qui présentait un effet antagonique par rapport aux fractions individuelles.

#### **IV.I.2. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés et individuelles des huiles essentielles et des fractions oxygénées par la méthode FRAP**

##### ✓ **Huiles essentielles individuelles**

Les mesures du pouvoir réducteur, obtenues pour les HES testées à différentes concentrations, ont permis de tracer les courbes représentés dans la Figure 19, ainsi que la courbe pour l'antioxydant de référence (acide ascorbique) utilisé comme standard.

D'après les résultats obtenus, on a constaté que toutes les HEs des plantes étudiées ont la capacité de réduire les ions ferrique  $Fe^{3+}$ . Les huiles essentielles testés présentaient une puissante réduction de fer mais qui été nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique. Cette réduction est beaucoup plus importante dans le cas de l'HE de *S. argentea* (Figure 19).

### ✓ Mélanges croisés

Des activités antioxydantes synergiques ont été observées pour le mélange des huiles : le mélange des huiles de *Salvia* et de *Thymus* été le mélange le plus actif, suivi du mélange de *R. officinalis* et de *S. argentea*. Cependant, le mélange des huiles de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* présentait l'activité la plus faible mais qui été plus élevé que les huiles individuelles. D'autre part, le mélange entre les trois HEs présentait un pouvoir antioxydant presque similaire que celui de l'HE de *S. argentea* seule et un effet synergique par rapport aux trois huiles individuelles (Figure 19). Ces mélanges restent moins actifs par rapport à l'acide ascorbique.

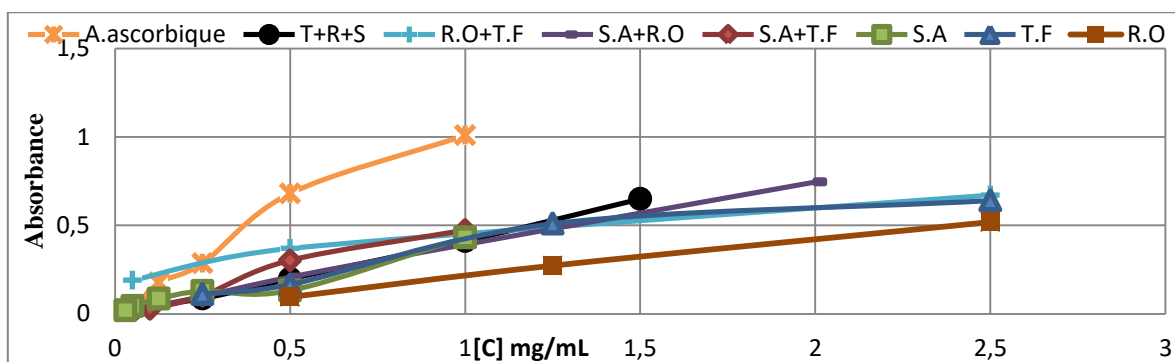


Figure 19 : Pouvoir réducteur des trois huiles essentielles, des mélanges croisés et du contrôle positif

### ✓ Fractions oxygénées individuelles et croisés

D'après les résultats obtenus (figure 20), on constate que seules les fractions oxygénées des huiles de *T. fontanesii* et de *S. argentea* étudiées avaient la capacité de réduire les ions ferrique  $Fe^{3+}$ . La réduction été plus élevée par rapport aux huiles individuelles. Alors que, la fraction oxygénée de *R. officinalis* ne présentait aucune capacité réductrice.

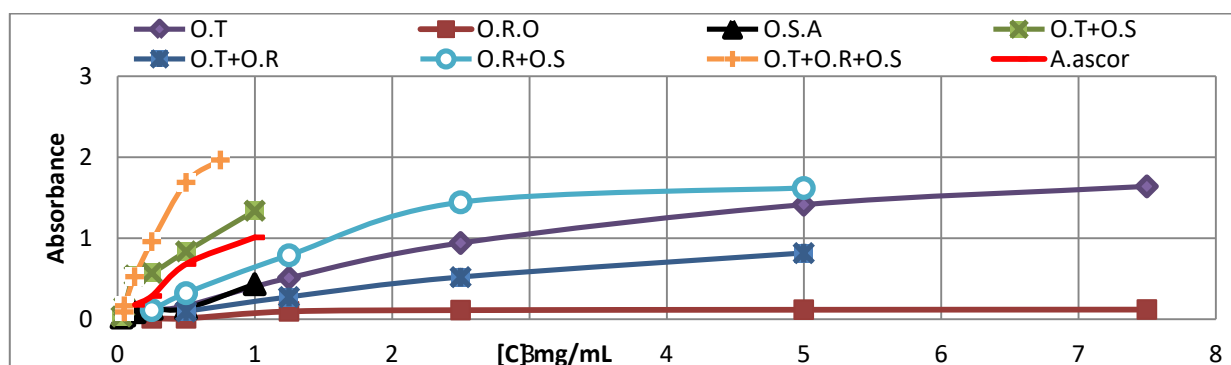


Figure 20 : Pouvoir réducteur des fractions oxygénées, des mélanges croisés et du contrôle positif

De plus, une activité synergique très élevée a été détectée après le mélange des trois fractions oxygénées et le mélange de la fraction de *Salvia* avec celle du Thym. Cette capacité est supérieure à celle de l'acide ascorbique. La combinaison de la fraction du *R. officinalis* et du *S. argentea* présentait aussi une activité antioxydante synergique intéressante (0,746 à 0,022). Alors que le mélange des fractions de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* représentait un effet antagoniste.

#### IV.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles et des fractions oxygénées par la méthode chélation de fer :

D'après les résultats obtenus (figure 21), nous pouvons déduire que toutes les huiles essentielles individuelles et des fractions oxygénées possédaient des activités chélatrices tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la phénanthroline. Cette capacité chélatrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des huiles essentielles.

L'huile ainsi que la fraction oxygénée de *S. argentea* présentait la plus haute capacité chélatrice, suivie par *T. fontanesii* et qui reste moins importante que celle de l'acide ascorbique. Alors que la plus faible capacité chélatrice été celle de *R. officinalis*.

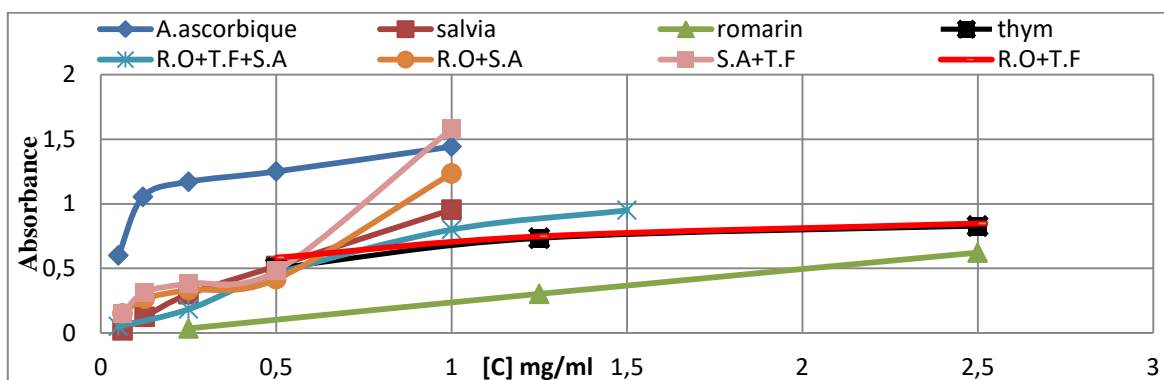


Figure 21 : Pouvoir chélateur des trois huiles, mélanges croisés, et du contrôle positif

Les résultats illustrés dans la figure 21 montrent que tous les mélanges croisés présentaient des effets synergiques dont lesquelles, les activités antioxydantes les plus importantes ont été observées pour *S. argentea* / *T. fontanesii* > *S. argentea* / *R. officinalis* > *R. officinalis* / *S. argentea* / *T. fontanesii* > *S. argentea* > *T. fontanesii* / *R. officinalis* > *T. fontanesii* > *R. officinalis*.

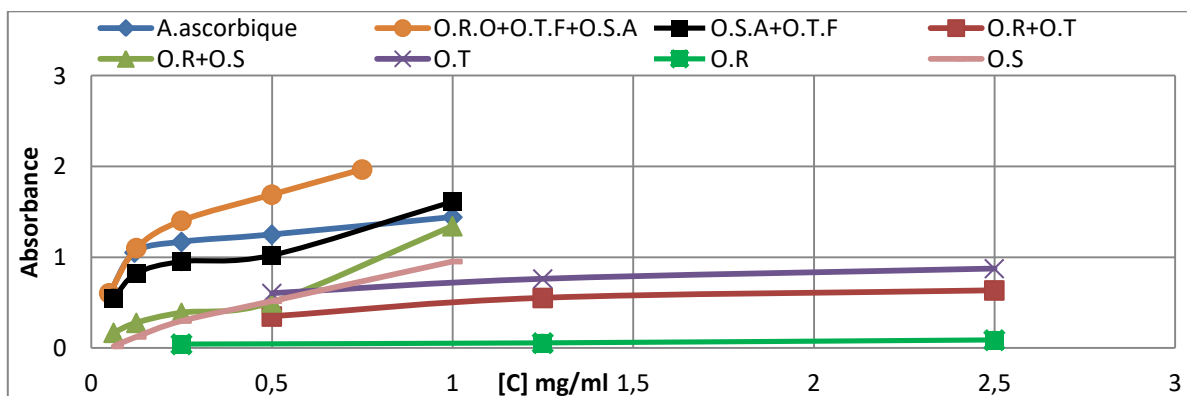


Figure 22 : Pouvoir chélateur des fractions oxygénées, des mélanges et du contrôle positif



D'autre part, les activités antioxydantes les plus importantes par rapport à l'acide ascorbique observées pour les mélanges des fractions oxygénées ont été observé pour le mélange de *R. officinalis*/*S. argentea*/*T. fontanesii* > **A. ascorbique** > *S. argentea*/*T. fontanesii* > *S. argentea*/*R. officinalis* > *T. fontanesii*/*R. officinalis*. (Figure 22)

### **Discussion :**

Les huiles essentielles de *S. argentea* et de *T. fontanesii* présentaient les effets antioxydants les plus élevés par les méthodes d'évaluation (DPPH, FRAP), probablement lié à leurs profils chimiques, en particulier le pourcentage relativement élevé de composés oxygénés comme le furriginol, le thymol et le p-cymène qui sont les constituants les plus fréquents des huiles essentielles obtenus avec de nombreuses activités biologiques [64]. Ils agissent également comme des antioxydants (piégeur de radicaux libres, agent peroxydant anti-lipide, etc.). [64] Cependant, l'huile essentielle de *R. officinalis* présentait une activité modérée, cette activité antioxydante pourrait être la conséquence d'une teneur appréciable en camphène, bornéol, verbénone, 1,8-cinéole et  $\alpha$ -pinène, représentant plus de 71% de l'huile totale.

Les résultats obtenus ont montré que les combinaisons des huiles essentielles appliquaient des effets antioxydants synergiques très puissant et prometteurs en diminuant les concentrations inhibitrices demi-maximales  $CI_{50}$ . Les plus forts effets synergiques ont été trouvés en combinant les huiles essentielles de *T. fontanesii* avec *R. officinalis* et de *T. fontanesii* avec *S. argentea* présentaient des activités plus actives à celle de l'acide ascorbique. Alors que les autres mélanges ont montré des activités antioxydantes proches de celui du standard l'acide ascorbique.

Il semble que l'association du thymol et du p-cymène, respectivement avec le 1,8-cinéole et le camphre, et avec du ferruginol et abitatriène augmente considérablement l'activité antioxydante. Les mélanges des huiles essentielles de *S. argentea* et de *R. officinalis* ainsi que des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *S. argentea* et de *R. officinalis* ont également montré une bonne capacité antioxydante par rapport à la valeur de l'antioxydant synthétique. Il est évident que cet effet synergique a été trouvé lorsque le ferruginol et abitatriène étaient associés au 1,8-cinéole et au camphre et de tous les composants majeurs.

D'autre part, les fractions oxygénées testés individuellement et des mélanges de ces fractions oxygénées du *T. fontanesii* et de *S. argentea* présentaient des activités antioxydantes plus élevée que les huiles correspondantes. Cette forte capacité antioxydante peut être due aux teneurs élevés dans les fractions oxygénées de thymol, ferruginol, 1,8 cineole et l'abitatriène.

Par ailleurs, ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres. [64]

## IV.2. Activité antimicrobienne

### IV.2.1. Méthode de disque :

#### ✓ Huiles essentielles

Le dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne in vitro des HEs contre huit (08) micro-organismes pathogènes a été étudié à l'aide de la technique de diffusion sur gélose sur papier filtre. Les résultats ont montré une variation des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des plantes (tableau 5). L'huile essentielle présentait une forte activité (zone d'inhibition > 20 mm), une activité modérée (zone d'inhibition <20–12 mm) et aucune inhibition (zone <12 mm).

**Tableau 5 :** Les activités antimicrobiennes (zones d'inhibition) des HEs et les mélanges croisés.

Microorganismes	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/ R.o /S.a</i>
<b>Gram-négative bactéries</b>							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	47 ± 3,2	17 ± 1,1	15 ± 0,5	18 ± 1,2	11 ± 1,1	08 ± 1,1	07 ± 1,3
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	18 ± 1,6	18 ± 1,6	12 ± 1,1	08 ± 1,0	06 ± 1,2	06 ± 1,0	08 ± 1,2
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	27 ± 3,6	11 ± 1,5	11 ± 1,0	13 ± 1,6	00 ± 00	14 ± 1,3	00 ± 00
<b>Gram-positive bactérie</b>							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	28 ± 5,2	14 ± 2,1	28 ± 0,33	18 ± 2,1	26 ± 2,6	19 ± 1,5	23 ± 2,6
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	15 ± 1,2	10 ± 2,8	14 ± 1,0	07 ± 1,0	06 ± 1,0	17 ± 1,8	23 ± 3,5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24 ± 2,5	11 ± 2,2	41 ± 2,0	15 ± 1,5	24 ± 3,2	17 ± 2,1	00 ± 00
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	25 ± 2,8	17 ± 1,5	09 ± 0,9	16 ± 1,3	10 ± 1,6	11 ± 1,5	11 ± 1,0
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	12 ± 1,6	24 ± 3,1	14 ± 1,0	12 ± 1,1	11 ± 2,1	20 ± 2,6	00 ± 00

L'activité la plus élevée (diamètre de la zone d'inhibition de 22 mm) a été démontrée pour les huiles de *S. argentea* et *T. fontanesii*. L'HE de *T. fontanesii* a été efficace contre 2 bactéries à gram-négative : *E. coli* (47 mm) et *S. typhi* (27 mm) et 03 bactéries à gram-positive *S. aureus* (28 mm), *B. subtilis* (24 mm) et *E. faecalis* (25 mm). L'HE de *S. argentea* été efficace contre 02 bactéries à gram-positive : *S. aureus* (28 mm) et *B. subtilis* (41 mm). Alors que, l'huile de *R. officinalis* été efficace uniquement sur la bactérie de *L. rhamnosus* (24 mm) (Tableau 5).

D'autre part, les résultats (Tableau 5) obtenus indiquent que tous les mélanges croisés se sont révélés actifs envers toutes les souches testées. Le diamètre d'inhibition le plus élevé a été détecté par le mélange des huiles de *T. fontanesii/ R. officinalis* sur *S. aureus* (26 mm), suivi par le mélange des trois HEs sur *S. aureus* (23mm), et sur *C. sporogenes* (23 mm). Tandis que la combinaison des HE des trois plantes n'a provoqué aucun effet synergique par la méthode de disque.

#### ✓ Fractions oxygénées :

La fraction oxygénée de *T. fontanesii* présentait un pouvoir antimicrobien très fort sur toutes les souches bactériennes testées avec des diamètres d'inhibitions variant de 34 à 48 mm, nettement plus élevée que l'HE. Le plus grand diamètre a été obtenu pour *E. coli* avec un diamètre de 48 mm.

La fraction oxygénée de *S. argentea* présentait une activité sur les bactéries de *S. aureus* (28 mm) et *B. subtilis* (41 mm).

Microorganismes	<i>S. argentea</i>	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>T.f/R.o</i>
<b>Gram-négative bactéries</b>				
<i>E. coli</i> ATCC 8739	15 ± 0,5	48 ± 5,2	08 ± 1,2	43 ± 6,2
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	12 ± 1,1	39 ± 4,3	00 ± 00	24 ± 4,2
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	11 ± 1,0	46 ± 3,9	13 ± 1,6	33 ± 3,1
<b>Gram-positive bactérie</b>				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	28 ± 0,33	36 ± 2,6	00 ± 00	29 ± 2,8
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	14 ± 1,0	34 ± 2,8	00 ± 00	19 ± 1,6
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	41 ± 2,0	42 ± 5,4	00 ± 00	17 ± 1,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	09 ± 0,9	43 ± 5,6	08 ± 1,0	16 ± 1,5
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	14 ± 1,0	44 ± 5,4	00 ± 00	32 ± 3,8

**Tableau 6 :** Activité antimicrobiennes (zones d'inhibition) des fractions oxygénées.

#### IV.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne (Méthode de la CMI)

##### ✓ Huiles essentielles

A la lecture des résultats de la CMI (Le tableau 7) on remarque que l'HE de *S. argentea* présentait une très bonne activité sur l'ensemble des souches testées. La meilleure activité a été observé pour *L. rhamnosus* (0,024 mg/mL) et *B. subtilis* (0,049 mg/mL), suivie par *E. coli* (0,781 mg/mL) et *S. aureus* (0,195 mg/mL). L'huile de *T. fontanesii* présentait des CMI allant de 1,563 à 6,25 mg/ml pour arrêter la croissance des souches. Quant à l'huile de *R. officinalis* son activité reste faible. Un effet synergique très intéressant a été détecté après la combinaison de l'huile de *S. argentea* et *T. fontanesii*, ce mélange a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des souches testées. Sauf sur *S. typhie* et *B. subtilis* (CMI= 6,25 mg/ml) qui se sont révélées résistantes (Tableau 7). Le mélange des trois huiles a exercé une importante activité synergique inhibitrice sur la plupart des souches testées. *S. aureus* été la plus sensible vis-à-vis du mélange des trois huiles, elle a été inhibée à partir de la concentration minimale de 0,098 mg/ml. Une concentration de 0,195 mg/ml a été suffisante pour inhiber la croissance de *C. sporogenes*.

**Tableau 7 :** CMI (mg/ml) des HES et des mélanges croisés

Microorganismes	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/ R.o /S.a</i>
<b>Gram-négative bactéries</b>							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	6,25	25,0	0,781	12,5	0,781	5,0	3,125
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	3,125	12,5	1,563	12,5	3,125	1,25	0,391
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	1,563	12,5	1,563	12,5	6,25	2,5	1,563
<b>Gram-positive bactérie</b>							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,563	12,5	0,195	12,5	0,098	0,625	0,098
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	3,125	12,5	3,125	12,5	0,098	2,5	0,195
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3,125	12,5	0,049	12,5	6,25	1,25	1,563

<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	1,563	1,563	3,125	12,5	0,781	5,0	3,125
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	12,5	25,0	0,024	6,25	6,25	1,25	6,25

✓ **Fractions oxygénées**

Les résultats présentés dans le tableau (8) montrent que toutes les fractions oxygénées présentaient une importante activité inhibitrice par rapport aux huiles. Pour les fractions oxygénées de *R. officinalis* et *T. fontanesii* une CMI allant 1,563 à 3,125 mg/mL a été suffisante pour inhiber la croissance des souches testés. Pour *S. argentea*, la croissance des souches a été inhibée pour une CMI de 0,024 à 3,125 mg/ml. Le mélange des fractions oxygénées de *R. officinalis* et *T. fontanesii* montrait une activité synergique sur la plupart des souches.

**Tableau 8 :** Concentration minimale inhibitrice des fractions oxygénées

Microorganismes	<i>T. fontanesii</i>	<i>S. argentea</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>Oxy T.f/ Oxy R.o</i>
<b>Gram-négative bactéries</b>				
<i>E. coli</i> ATCC 8739	3,125	0,781	3,125	6,25
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	1,563	1,563	1,563	1,563
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	3,125	1,563	1,563	1,563
<b>Gram-positive bactérie</b>				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,563	0,195	3,125	1,563
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	3,125	3,125	1,563	3,125
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3,125	0,049	3,125	3,125
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	3,125	3,125	1,563	3,125
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	3,125	0,024	1,563	3,125

**IV.2.3 Discussion :**

Les huiles essentielles de *S. argentea* et de *T. fontanesii* exerçaient une forte activité antimicrobienne contre toutes les souches bactéries testées. Ce grand pouvoir bioactif observé peut-être attribuait principalement à leurs teneurs élevées en composé oxygéné en particulier le thymol, furriginol, le p-cymène et la pulégone. En effet les composés oxygénés de nature phénolique avaient un large spectre d'inhibition, comprenant des bactéries à gram positive et à gram négative.

Toutefois il faut souligner qu'il existe une sensibilité différentielle des bactéries testées vis-à-vis des mélanges croisés qui montre parfois des effets de synergie et/ou d'antagonisme par le même mélange sur les différentes souches. Cette différence ne peut être expliquée que par la différenciation structurelle de la paroi de ces différentes souches vis-à-vis de l'interaction des composés majoritaires des mélanges croisés. [63] Les plus forts effets synergiques ont été trouvés par la méthode CMI en combinant les huiles de *T. fontanesii* avec *S. argentea*, et des trois huiles. Il est évident que cette activité est due à la synergie entre les composés des huiles en particulier l'association du thymol avec le pulégone et le feruginole. D'autre part, les fractions oxygénées montraient une activité antimicrobienne plus intéressante que ceux des huiles qui sont dues aux teneurs élevées en composés oxygénés.

# CONCLUSION

Dans la présente étude, l'objectif principal était d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et des fractions oxygénées de trois plantes connues dans la médecine traditionnelle à savoir *Salvia argentea*, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus fontanesii*. Ces espèces ont été explorées d'avantages, en termes d'études sur leur caractérisation chimique et les activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de leurs huiles essentielles et des fractions oxygénées.

L'extraction par hydrodistillation des HEs à partir des trois plantes étudiées : *T. fantensii* et *R. officinalis* ont fourni de bons rendements avec des pourcentages de 1,95 % ; 1,49 % respectivement. Alors que l'huile de *S. argentea* a fourni un rendement modéré de 0,102%.

L'aspect chimique des 03 plantes à montrer que les huiles essentielles et leurs fractions oxygénées présentent des molécules intéressantes. L'huile essentielle et la fraction oxygénée de *Thymus fantenesii* été riche en thymol, alors que l'huile et la fraction de *Rosmarinus officinalis* été caractérisée par la présence du 1,8-cinéole, le camphre. Alors que l'HE et la fraction oxygénée de *Salvia argentea* été riche en Pulegone.

Les huiles essentielles et les fractions oxygénées ont présenté des activités antioxydante très prometteuses mais qui reste moins efficace par rapport à l'acide ascorbique par les trois méthodes (DPPH, FRAP et Chélation de fer). Cependant, une très intéressante activité antioxydante synergique a été observée avec le mélange de *R. officinalis* et *T. fantensii* par la méthode DPPH, et du mélange des trois fractions oxygénées par les deux méthodes (FRAP et Chélation de fer), cette activité a été supérieure à celle du l'acide ascorbique.

Les HEs et les fractions oxygénées contenues dans ces trois plantes ont exercé une activité antimicrobienne intéressante avec une inhibition importante contre les souches testés. En effet l'association de *S. argentea* et *T. fantensii* a montré le plus fort effet synergique par la méthode CMI.

La présente étude permet de conclure que ces plantes constituent une importante source en HEs. Ces HEs et fractions oxygénées se caractérisent par des molécules particulièrement intéressantes qui sont douées de grandes activités antioxydante et antimicrobienne. De ce fait, ces résultats méritent d'être exploitées et pour cela il serait intéressant :

De compléter ces activités par d'autres tests biologiques telles que les activités anti-inflammatoires et anticancéreuses.

Etudier la toxicité des huiles essentielles et de leurs fractions pour leur utilisation éventuelle en produits cosmétiques et/ou pharmaceutiques.

# REFERENCES

1. Hilan C.; Sfeir R.; Jawish D.; Aitour S. huiles essentielles de certaines plantes médicinales Libanaises de la famille des lamiaceae. *Lebanese Science Journal*. **2006**, 7 (2):13-22.
2. Sanchez M.C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. **2002**, 8 (3): 121-137.
3. Atmani D.; Chaher N.; Berboucha M.; Ayouni K.; Lounis H.; Boudaoud H.; Debbach, N.; Atmani D. Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. **2009**, 112: 303- 309.
4. Pan Y.; Wang K.; Huang S.; Wang H.; Mu X.; He C.; Ji X.; Zhang J.; Huang F. Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*. **2008**, 106: 1264-1270
5. Valgimigli L. Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. In *Essential Oils as Natural Food Additives*, Ed.; Nova Science Publishers: New York, **2012**. 1–24.
6. Adorjan B.; Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*. **2010**, 25 (6): 407–426.
7. Kalembe D.; Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **2003**, 10 (17): 813-829.
8. Guerriaud M. Réglementation des huiles essentielles, un besoin de sécurité. *Actualités Pharmaceutiques*. **2018**, 57(580) : 21–25.
9. Benayad N. Thèse Sur : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohamed V-Agdal. Thèse de doctorat- Rabat, **2008**.
10. Bakkali F.; Averbeck S.; Averbeck D. Review MI-Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46 (2): 446-475.
11. Calsamiglia S.; Busquet M.; Cardozo P. W.; Castillejos L.; Ferret A. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. **2006**, 90(6): 2580–2595.
12. Alitonou G.; Avlessi F.; Wotto V.D.; Ahoussi E.; Dangou J.; Dominique C.K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. *Comptes rendus Chimie*. **2004**, 1051–1055
13. Avlessi F.; Dangou J.; Wotto V.D.; Alitonou G.A.; Sohounhloue D.K.; Menut C. Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes rendus. Chimie*. **2004**, 1057–1061
14. Bouyahya A.; Abrini J.; Bakri Y.; Dakka N. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action Essential Oils as Anticancer Agents: News on Mode of Action. *Phytothérapie*. **2016**, 16 (5): 254-267.
15. Gali-Muhtasib H.; Hilan C.; Khater C. Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 71: 513-520.
16. Ghelardini C.; Galeotti N.; Mazzanti G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica*. **1999**, 65: 700–703.
17. DARRIET-GIUDICELL Florent, Thèse Sur : Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum corse Sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*. Université Pascal Paoli, Corse-France. **2011**.
18. Essential oils -Analysis by gas chromatography on capillary columns - General method. **2015**, 7.
19. Ultee A.; Bennik M.H.; Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68 (4): 1561-1568.
20. Lambert R.J.; Skandamis P.N.; Coote P.J.; Nychas. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. **2001**, 91 (3): 453-462.
21. Cox S.D.; Man C.M.; Markham J.L. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. **2001**, 91 (3): 492-497.



22. Burton G.W.; Doba T.; Gabe E.J.; Hughes L.; Lee F.L.; Prasad L.; Ingold, K.U. Autoxidation of biological molecules. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *Journal of the American Chemical Society*. **1985**, 107 (24): 7053–1065.
23. Sunan W.; Kelly A.M.; Massimo F.M.; Yukio K.; Rong T. Synergistic, Additive, And Antagonistic Effects of Food Mixtures On Total Antioxidant Capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59 (3): 960-968.
24. Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. **2003**, 108-115.
25. Moreno S.; Scheyer T.; Romano C.S.; Vojnov A.A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*. **2006**, 40 (2): 223-231.
26. Wollinger A.; Perrin É.; Chahboun J.; Jeannot V.; Touraud D.; Kunz W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*. **2016**, 19 (6): 754–765.
27. Taoufik O.; Martins A.; Barreiro M.F.; Ferreira I.C.F.R. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science & Technology*. **2016**, 50: 193–210.
28. Ribeiro M.A.; Bernardo-Gil M.G.; Esqu'vel M.M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids*. **2001**, 21: 51–60
29. Yala D.; Merad A.S.; Mohamedi D.; Ouar Korich M.N. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*. **2001**, 91.
30. Dorman H. J. D.; Deans S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiologie*. **2000**, 88(2): 308-316.
31. Ouraïni D.; Agoumi A.; Ismaïli-Alaoui M.; Alaoui K.; Cherrah Y.; Alaoui M. A.; Belabbas M. A. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques. *Phytothérapie*. **2007**, 5(1) :6-14.
32. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. **2004**, 94: 223-253.
33. Bellakhdar J. Précis de phytothérapie moderne ; plantes médicinales au Maghreb et soin de base. *Edition le Fennec*. **2006**, 294-295.
34. Chevallier A.; Larousse encyclopédie des plantes médicinales identification, préparation soin. **2001**, 128.
35. Wang W.; Wu N.; Zu Y.G.; Fu Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. **2008**, 108 (3):1019-1022.
36. Elamrani A.; Zrha S.; BenjUali B. A Study of Moroccan Rosemary Oils. *Journal of Essential Oil Research*. **2000**, 12(4): 487-495.
37. Pintore G.; Usai M.; Bradesi P.; Juliano C.; Boatto G.; Tomi F.; Chessa M.; Cerri R. Casanova J. Chemical composition and anti-microbial activity of *Rosmarinus officinalis* L. from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. **2002**, 17(1):15-19.
38. Ono K.; Hasegawa K.; Naiki H.; Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimers b-amyloid fibrils in vitro. *Journal of Neuroscience Research*. **2004**, 75(6): 742-750.
39. Celiktas O.Y.; Kocabas E.E.H.; Bedir E.; Sukan F.V.; Ozek T.; Baser K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus oficinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **2007**, 100(2): 553–559.
40. Koschier E.H.; Sedy K.A. Labiate essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips Tabaci* lindeman. *Crop Protection*. **2003**, 22 (7): 929–934.
- 41.Haddouchi F.; Lazouni H.A.; Meziane A.; Benmansour A. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique SCIENCE*. **2009**, 05(2) : 246–259.
42. Nabet N.; Boudries H.; Loupassaki S.; Souagui S.; Madani K.; Carbonell-Barrachina A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut.

- and *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*. **2017**, 24: 2518-2525.
43. Bekhechi C.; Bekkara F.A.; Abdelouahid D.E.; Tomi F.; Casanova J. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. **2007**, 19 (6): 594-596.
44. Ghannadi A.; Sajjadi S. E. ; Kabouche A. ; Kabouche Z. *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. - A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 2004, 59 : 187-189.
45. Riccobono L.; Maggio A.; Rossella S.; Iardib V.; Senatorec F.; Bruno M. Chemical composition of volatile and fixed oils from of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research*. **2015**, 30(1) : 1-10
46. Holmen M.A.; Berrada M.; Bellakhdar J.; Illidrissi A.; Pinel A. comparative chemical study on essential oils from *Salvia officinalis*, *S. aucheri*, *S. verbenaca*, *S. phlomoides* and *S. argentea*. *Fitoterapia*. **1984**, 55 :143-148.
47. Couladis M.; Tzakou O.; Stojanovic D.; Mimica-Dukic N.; Jancic R. The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**, 16 (13): 227–229
48. Velickovic D.T; Ristic M.S; Milosavljevic N.P; Davidovic D.N; Bogdanovic S.Z. Chemical composition of the essential oil of *Salvia argentea* L. *Agro Food Industry Hi Tech*. **2014**, 25:70–72.
49. Ben Farhat M.; Landoulsi A.; Chaouch-Hamada R.; Sotomayor J.A.; Jordan M.J. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial crops and products*. **2013**, 49: 904–914.
50. Achenbach H.; Waibel R.; Nukaya M.H.H; Ween H. antimalarial compounds from *Hoslundia opposita*. *Phytochemistry*. **1992**, 31(11): 3781- 378.
51. Hamidpour M.; Hamidpour R.; Hamidpour S.; Shahlari M. Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. **2014**, 4 (2): 82-88.
52. Mona A. M.; Abd-Elmageed.; Hussein B.A. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers. *Sudan Journal of Medical Science*. **2008**, 3 (2): 127-132
53. Esmaili M.A.; Sonboli A. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48(3): 846-853.
54. Burgot G.; Burgot C.E. Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique. *Technique et Documentation*. **2002**.
55. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*. **2004**, 26(2) : 211-219.
56. Lamien-Meda A.; Lamien C.E.; Compaore M.M.Y. ; Meda R.N.T. ; Kiendrebeogo M. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*. **2008**, 13 (3): 581-594.
57. Qureshi N.N. ; Kuchekar B.S. ; Logade N.A. ; Haleem M.A. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Cordia macleodii* leaves. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2009**, (17) : 299– 302.
58. Eyquem A. ; Alouf J. ; Montagnier L. Traité de microbiologie clinique. Editeur : Piccin, Padou, Italie. **1998**.
59. Fechtal M.; Ismaili R.; Zine el Abidine A. Effet de la transplantation sur la qualité et le rendement en huiles essentielles du romarin (*Rosmarinus officinalis* L). *Annales de la recherche forestière au Maroc*. **2001**, 34: 94-102
60. Ayadi S.; Jerribi C.; Abderrebba M. Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *Journal of the Algerian chemical society*. **2011**, 21(1) :25–33.
61. Dob T.; Dahmane D.; Benabdelkader T.; Chelghoum C. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharmaceutical Biology*. **2006**, 44 (8) : 607-612.

62. Williams LR.; Lusunzi I. Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*: a potential source of high quality tea tree oil. *Industrial Crops and Products*. **1994**, 2: 211–217.
63. Mebarki N. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. *Philosophiæ doctor*. **2010**,
64. Miguel M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. **2010**, 25(5): 291-312.

# ANNEXES

