

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de
Doctorat en Sciences
Spécialité : Chimie organique
Option : Phytochimie

Par

ZEGHIB ASSIA

THEME

Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*.

Soutenue publiquement le 19-12-2013

Devant le jury :

Pr. Ahmed KABOUCHE, U. Constantine 1

Pr. Zahia KABOUCHE, U. Constantine 1

Pr. Claude-Alain CALLISTE, U. de Limoges

Pr. Chérifa BENLATRACHE, U. Constantine 3

Pr. Youcef NECIB, U. Constantine 1

Pr. Amar ZELLAGUI, U. Larbi Benmhidi- Oum El-Bouaghi

Président

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse

Examinatrice

Examineur

Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Constantine 1 (ALGERIE), sous la direction du Professeur Zahia KABOUCHE, et le Laboratoire de Biophysique, EA 1069 LCSN, Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges (FRANCE), sous la direction du Professeur Claude-Allain CALLISTE.

A l'issue de ce travail, j'ai l'immense plaisir de remercier tous ceux qui ont permis sa réalisation dans des conditions exceptionnelles.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Madame la Professeure Zahia KABOUCHE, pour m'avoir fait confiance, m'avoir conseillée tout au long de la réalisation de ce travail. Vous m'avez fait découvrir la phytochimie et le monde intéressant des plantes médicinales. Soyez assurée de ma profonde gratitude, pour vos directives, votre soutien et votre grande générosité.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Claude-Allain CALLISTE, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions que soient. Vous avez suivi ce travail pas à pas, je vous remercie pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique, votre disponibilité et, en particulier, pour votre soutien moral sans faille surtout dans les moments difficiles, qui a grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse et à l'enthousiasme ressenti lors de ce travail. Tous ces éléments m'ont permis de réaliser mes travaux de recherche avec une grande motivation; avec vous, j'ai découvert l'intérêt de la recherche scientifique portée sur les extraits bioactifs, qui pourraient être utilisés dans plusieurs domaines. Je suis très reconnaissante pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit. Soyez assuré de ma gratitude et de toute mon estime.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biophysique qu'il dirige afin de réaliser mes travaux de recherche. Soyez assuré de mon grand respect.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Ahmed KABOUCHE, pour le temps qu'il a pu consacrer à la lecture de ce manuscrit. Merci d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont également à ma directrice de thèse de Magister, Madame la Professeure Chérifa BENLATRACHE, Médecin-chef du service de Biochimie, CHU Benbadis de Constantine. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Voilà, de sujet de Magister en biologie clinique, je me suis lancée dans le monde des activités pharmacologiques des plantes médicinales, tout en espérant lancer, dans le futur, un axe de recherche travaillant les deux profils de formations acquises. Je tiens à vous exprimer ma gratitude, mon estime et mon profond respect.

Je suis particulièrement honorée de la présence, dans ce jury de thèse, de Monsieur le Professeur Youcef NECIB de l'Université de Constantine 1, et de Monsieur le Professeur Amar ZELLAGUI de l'Université Larbi Ben M'hidi (OEB), pour juger ce travail. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

Je remercie en particulier Monsieur le Professeur Alain SIMON, Laboratoire de Chimie Physique et Minérale, EA 1069 LCSN, Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges, pour m'avoir permis de réaliser les tests de l'activité antiproliférative et pour s'être montré toujours disponible à chaque fois que je vous ai sollicité, malgré vos innombrables tâches scientifiques et pédagogiques. Vos qualités humaines et morales, ainsi que vos compétences scientifiques m'ont profondément marqué. Soyez assuré de toute ma gratitude et de ma grande estime.

Un remerciement très sincère et amical pour Mme Aline PINON, ingénieure-chercheuse au Laboratoire de Chimie Physique et Minérale, EA 1069 LCSN, Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges, pour son assistance technique lors de la réalisation des tests de l'activité antiproliférative, pour sa gentillesse et sa bonté exceptionnelle. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je remercie également Monsieur le Docteur Yves CHAMPAVIER, Service de RMN - Plateforme SCRABL, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, pour la réalisation des analyses RMN. Je suis très reconnaissante pour le temps que vous avez

consacré pour la réalisation des analyses RMN, pour vos conseils et vos discussions enrichissantes. Votre soutien moral dans les moments difficiles, m'a toujours donné le courage pour mener à bien mes travaux de recherche. Soyez assuré de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

Je remercie Monsieur le Docteur Philippe BRESSOLIER, UIT du Limousin, Département Génie Biologique, LIMOGES Cedex, France, pour la réalisation des analyses GC-MS des huiles essentielles. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Aouni MAHDJOUR, directeur du Laboratoire des maladies transmissibles et substances biologiquement actives, Faculté de Pharmacie de l'Université de Monastir (TUNISIE), de m'avoir accueillie dans son laboratoire afin de réaliser les tests d'activités antibactérienne et antivirale, et ce dans le cadre d'un projet Algéro-Tunisien avec notre Laboratoire de recherche. Recevez mes plus sincères remerciements pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueillie dans votre service et pour la confiance que vous m'avez accordée. Je tiens à vous exprimer ma gratitude, mon estime et mon profond respect.

Mes sincères remerciements vont à Madame la Professeure Maha MASTOURI, médecin chef du Laboratoire de Microbiologie, CHU de Monastir (TUNISIE), et Madame la Professeure F SMATI, médecin chef du Laboratoire de Microbiologie, CHU Benbadis de Constantine, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires afin de réaliser le test d'activité antibactérienne. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

Je remercie mes collègues tunisiennes Imen BENSALAM, Rim CHARFEDDINE et Belsem MERZOUK, Laboratoire des maladies transmissibles et substances biologiquement actives, Faculté de Pharmacie de l'Université de Monastir, pour l'encadrement et l'assistance technique lors de la réalisation des tests d'activités antibactérienne et antivirale. Soyez assurées de ma gratitude et de mon amitié.

J'ai coeur à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur Patrick TROUILLAS, Laboratoire de Biophysique, EA 1069 LCSN, Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges, pour m'avoir permis de s'intégrer à son équipe de chimistes-théoriciens, qu'il dirige dans un axe de recherche très intéressant. Vos qualités humaines et morales, ainsi que vos compétences scientifiques m'ont profondément marqué. Soyez assuré de toute ma gratitude et de ma grande estime.

Je remercie Madame Marie-José HYVERNAUD, Ingénieur au Laboratoire de Biophysique, EA 1069 LCSN, Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges, pour ses précieuses aides à l'échelle administrative au cours de mon séjour en France, pour ses conseils, ses orientations et pour sa très grande bonté et sympathie. Soyez assurée de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

Je ne voudrais pas oublier de remercier tous mes amis et collègues que j'ai côtoyés à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges ainsi qu'au Laboratoire LOST de l'Université de Constantine 1 qui, à titre divers, m'ont aidé et soutenu dans toutes les situations et les circonstances, en particulier Naima BOUTAGHANE, Souheila LAGGOUNE, Habiba DAROU-MOKKADEM, Assia KHALFALLAH, Nadjoua-Djemaa BERRAHAL, Hichem LAKEHAL, Tarek BOUDIAR, Hani MAKHLOUFI, Florent DI MEO, Gabin FABRE, Emmanuel DENOYE, Pavlina COSINOVA, Imen BAYACHE, Elhassene ANOUAR, Koukeb REGUIEG, Mona FARHAT, Fella HADJ-RABIA, Naima TAHRAOUI, Mustapha EL DJAWHARI, Soha EL DJAWHARI, Adnane HALABI, Aurélien, Rima ZEIN et Nour MAMMERI. Soyez assurés de ma gratitude et de mon amitié.

Enfin, Je tiens à remercier le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien, pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre du BAF 2010/2012 afin de finaliser ma thèse.

ABREVIATIONS

Solvants et réactifs

AE	Acétate d'éthyle
Bu	<i>n</i> -butanol
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CH ₃ OH	Méthanol
DM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	1,1-Diphényl-2-Pyridyl-Hydrazyl
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EP	Ether de pétrole
H ₂ O	Eau distillée
HBSS-EDTA	Hank's Balanced Salt solution – Ethylenediaminetetraacetic acid
HCl	Acide chlorhydrique
ME	Méthanol
MTT	Bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5- diphényltétrazolium
PBS	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)
SDS	Sodium dodécyl sulfate

Techniques chromatographiques

CC	Chromatographie liquide sur Colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP/HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
GC	Chromatographie Gazeuse
GC/FID	Chromatographie Gazeuse/Détecteur à Ionisation de Flamme
GC-MS	Chromatographie Gazeuse Couplé à la Spectrométrie de Masse
CLMP/MPLC	Chromatographie Liquide a Moyenne Pression
C ₁₈	Silice greffée
SiO ₂	Silice normale

Espèces de *Thymus*

<i>T</i>	<i>Thymus</i>
<i>T. ciliatus</i>	<i>Thymus ciliatus</i>
<i>Tc</i>	<i>Thymus ciliatus</i>
<i>T. guyonii</i>	<i>Thymus guyonii</i>
<i>Tg</i>	<i>Thymus guyonii</i>
<i>T. hirtus</i>	<i>Thymus hirtus</i>
<i>T. numidicus</i>	<i>Thymus numidicus</i>
<i>Tn</i>	<i>Thymus numidicus</i>
<i>T. vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
<i>Tv</i>	<i>Thymus vulgaris</i>

Extraction/ Extraits, fractions et huiles essentielles

Ext	Extraction
E	Extrait
E AE	Extrait acétate d'éthyle
E Aq	Extrait aqueux
E DM	Extrait dichlorométhane
E EP	Extrait éther de pétrole
E ME	Extrait méthanol
E Et Tn	Extrait hydro-éthanolique de <i>Thymus numidicus</i>
F	Fraction
F Aq Tn	Fraction aqueuse de <i>Thymus numidicus</i>
F AE Tn	Fraction acétate d'éthyle de <i>Thymus numidicus</i>
F DM Tn	Fraction dichlorométhane de <i>Thymus numidicus</i>
F EP Tn	Fraction éther de pétrole de <i>Thymus numidicus</i>
F Bu Tn	Fraction <i>n</i> -butanol de <i>Thymus numidicus</i>
HE	Huile essentielle
HE-Tg	Huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i>
HE-Th	Huile essentielle de <i>Thymus hirtus</i>
HE-Tn	Huile essentielle de <i>Thymus numidicus</i>
Rendt.	Rendement

Activité antibactérienne / Souches bactériennes d'étude

Activité antibactérienne

AMC	Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg
ATB	Antibiotique
ATCC	American type culture collection
CAZ	Ceftazidime 30µg
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DZI	Diamètre de Zone d'Inhibition
GM	Gentamycine 500µg (10UI)
GN	Gélose Nutritive
GS	Gélose au sang
MA	Cefamandole 30µg
NCCLS	National committee for clinical laboratory standard
SH	Souche Hospitalière (Isolat)
TSA	Trypticase Soja Agar

Souches bactériennes d'étude

❖ Cocci Gram positif :

- ✓ **EF** : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- ✓ **SA** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

❖ Bacilles Gram négatif :

- ✓ **PA** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ✓ cinq pathovars d'*Escherichia coli* à savoir :
 - **EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragique ATCC EDL933^o (O157:H7), gènes de virulence : stx (codant pour la toxine : shiga like toxin), ehxA (codant pour une entérohémolysine)
 - **ETEC** : *Escherichia coli* entérotoxigène ATCC H10407, gène de virulence : elt (codant pour une toxine thermolabile)
 - **EIEC** : *Escherichia coli* entéroinvasive ATCC 11741, gène de virulence : ipaH (codant pour une invasine)
 - **EPEC** : *Escherichia coli* entéropathogène ATCC 2348/69 (O127:H6), gènes de virulence : eae (codant pour une intimine), bfpA (codant pour un antigène flagellaire)
 - **EAEC** : *Escherichia coli* entéroaggrégative ATCC 17-2, gène de virulence : astA et aaf-I (codant pour le pouvoir aggrégatif caractéristique des ECEA).

Activité antivirale

CV-B3
ECP

Souche de CoxsackieVirus B3
Effet Cytopathogène

Détermination structurale

¹³ C	Spectres carbone
¹³ C DEPT ₁₃₅	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
¹³ C J-mod	Spectre du carbone ¹³ réalisé en J modulation
COSY	¹ H – ¹ H COrrrelation SpectroscopY
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
¹ H	Spectres proton
HSQC	¹ H – ¹³ C Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMQC	¹ H – ¹³ C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	¹ H – ¹³ C Heteronuclear Multiple Bond Correlation
NOESY	¹ H – ¹ H Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
J (Hz)	constante de couplage exprimée en Hertz
<i>m</i>	multiplet
ppm	parties par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
δ _C	Déplacement chimique du carbone en ppm
δ _H	Déplacement chimique du carbone en ppm
Hz	Hertz

Symboles

%	pourcentage
°	degré
°C	degré celcius
Ca ²⁺	ion calcium
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
CO ₂	dioxyde de carbone
G	Giga
g	gramme
GHz	GigaHertz
H ₂ SO ₄	acide sulfurique
kHz	Kilohertz
L	litre
µL	microlitre
Kg	Kilogramme
M	molaire
Mg ²⁺	ion magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
msec	milliseconde
mW	milliwatt
m/z	masse/charge d'un ion
nm	nanomètre
U/mL	unités par millilitre
pH	potentiel hydrogène
v/v	volume à volume

Autres

ADN	Acide désoxyribonucléique
CC ₅₀	Concentration Cytotoxique 50% (Activité cytotoxique)
CI ₅₀	Concentration permettant d'inhiber 50% du Signal de référence (Activité antioxydante)
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice 50% (Activité antiproliférative)
CPT	Composés phénoliques totaux
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
IR	Indice de rétention
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LOST	Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SVF	Sérum de Veau Foetal
TR	Temps de rétention
U.V	Ultra Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les Acides Phénoliques du genre <i>Thymus</i>	12
Tableau 2 : Les principaux Flavonoïdes trouvés dans le genre <i>Thymus</i>	14
Tableau 3 (1) : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$, incluant le thymol et/ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de <i>Thymus</i>	20
Tableau 3 (2) : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$, incluant le thymol et/ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de <i>Thymus</i>	21
Tableau 3 (3) : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$, incluant le thymol et/ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de <i>Thymus</i>	22
Tableau 4 : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$, excluant le thymol et le carvacrol) d'huiles essentiels d'espèces de <i>Thymus</i>	23
Tableau 5 : Récapitulatif des masses (g) obtenues des différents extraits (E) de <i>Thymus</i>	63
Tableau 6 : Masses et rendements (%) des différents extraits (E) de <i>T. numidicus</i> (Tn).....	65
Tableau 7 : Masses et rendements de l'extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i> ainsi que ses différentes fractions.....	67
Tableau 8 : Les différentes concentrations d'échantillons d'étude (en mg/mL) testées pour la détermination de la CMI et la CMB.....	101
Tableau 9 : Sensibilité des bactéries d'étude aux antibiotiques-contrôles par détermination du diamètre de zone d'inhibition (DZI) en mm.....	102
Tableau 10 : Caractéristiques des Antibiotiques-contrôles utilisés.....	103
Tableau 11 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>T.</i> <i>numidicus</i> (Collecte de Mai 2012).....	117
Tableau 12 : Recherche de similarités de composés majoritaires trouvés dans <i>T. numidicus</i> , <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i> avec d'autres espèces du genre <i>Thymus</i>	121
Tableau 13 : Composants des huiles essentielles (%) des parties aériennes de deux espèces de <i>Thymus</i> (<i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>).....	124
Tableau 14 : Composants majoritaires des huiles essentielles (%) de trois espèces de <i>Thymus</i> (<i>T. numidicus</i> , <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>).....	128
Tableau 15 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des huiles essentielles de <i>Thymus</i> (<i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>) à 0,5 et 5 mg/mL.....	133
Tableau 16 : DZI de la croissance bactérienne (en mm) des deux huiles essentielles de <i>Thymus</i> et des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).....	136

Tableau 17 : Codification de la sensibilité bactérienne, en terme de DZI de la croissance bactérienne (en mm), vis-à-vis des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i> et des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).....	136
Tableau 18 : CMI et CMB des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i> (mg/mL).....	138
Tableau 19 : Détermination du rapport CMB/CMI des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i>	139
Tableau 20 : Activité antibactérienne (DZI et CMI) de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> (Collecte de Mai 2012).....	140
Tableau 21 : Détermination de la concentration cytotoxique 50 (CC ₅₀ , µg/mL) des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i> vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.....	142
Tableau 22 : Résultats des trois tests antiviraux, réalisés contre le coxsackievirus B3, des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i>	143
Tableau 23 : Masses (g) et rendements (%) des différents extraits de <i>Thymus</i>	148
Tableau 24 : Rendements (%) des extraits de <i>T. numidicus</i> issus des extractions de 25g et de 500g de matière végétale.....	149
Tableau 25 : CI ₅₀ (µg/mL) des extraits de <i>Thymus</i>	151
Tableau 26 : CI ₅₀ (µg/mL) des antioxydants de référence.....	152
Tableau 27 : Taux en composés phénoliques totaux (g/100g équiv. Pyrogallol) des extraits de <i>Thymus</i> (n = 3).....	153
Tableau 28 : Taux en composés phénoliques totaux (g/100g équiv. Pyrogallol) des antioxydants de référence (n = 3).....	154
Tableau 29 : CI ₅₀ des cinq extraits de <i>Thymus</i> les plus actifs vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29 (temps de contact : 48h, n = 3).....	158
Tableau 30 : Signification de codes utilisés pour l'évaluation des extraits de <i>Thymus</i>	159
Tableau 31 : Récapitulatif des activités antioxydante et antiproliférative ainsi que des rendements et de la teneur en phénols totaux déterminés pour les 4 espèces de <i>Thymus</i>	160
Tableau 32 : Masses (g) et rendements (%) des différentes fractions de l'espèce <i>T. numidicus</i> issues de l' extrait hydro-alcoolique	166
Tableau 33 : Inhibition du radical DPPH (CI ₅₀) et taux de composés phénoliques totaux de l' extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	167
Tableau 34 : Comparaison de l' extrait hydro-alcoolique par rapport aux extraits méthanol et aqueux de <i>T. numidicus</i>	168

Tableau 35 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé 1 dans CD ₃ OD.....	176
Tableau 36 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé 2 dans CD ₃ OD.	179
Tableau 37 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé 3 dans CD ₃ OD.....	183
Tableau 38 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (400 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé 4 dans CD ₃ OD.....	187
Tableau 39 : Masses (mg) et pourcentages (%) des quatre molécules purifiées à partir des sous-fractions SF₃₇ et SF₂₀₋₂₁ , issues de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE <i>Tn</i>).....	188
Tableau 40 : Activité antioxydante des quatre produits purifiés à partir de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE <i>Tn</i>).....	189
Tableau 41 : DZI de la croissance bactérienne (en mm) de l' extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i> ainsi que ses différentes fractions , comparés à ceux des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).....	190
Tableau 42 : Codification de la sensibilité bactérienne, en terme de DZI de la croissance bactérienne (en mm), vis-à-vis de l' extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i> ainsi que ses différentes fractions et des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).....	191
Tableau 43 : CMI et CMB de l' extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions (mg/mL).....	193
Tableau 44 : Détermination du rapport CMB/CMI de l' extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	193
Tableau 45 : Détermination de la concentration cytotoxique 50 (CC ₅₀ , µg/mL) de l' extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i> ainsi que ses différentes fractions , vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.....	195
Tableau 46 : Résultats des trois tests antiviraux, réalisés contre le coxsackievirus B3, de l' extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i> ainsi que ses différentes fractions	196

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures chimiques des polyphénols décrits dans les plantes de <i>Thymus</i>	18
Figure 2 : Formation et stabilisation par résonance du radical phénoxy lors de l'oxydation de l'ion phénate.....	26
Figure 3 : Exemple de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique les plus courants.....	30
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	32
Figure 5 : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes.....	34
Figure 6 : Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.....	35
Figure 7 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).....	37
Figure 8 : Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	38
Figure 9 : Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques (Loupy, 2006).....	44
Figure 10 : Exemples de structures de terpènes.....	47
Figure 11 : Diagramme d'obtention des différents extraits de polarité croissante des quatre espèces de <i>Thymus</i>	62
Figure 12 : Diagramme d'obtention des différents extraits de polarité croissante de <i>T. numidicus</i>	64
Figure 13 : Diagramme d'obtention des différentes fractions de polarité croissante de l'extrait hydro-éthanolique de <i>T. numidicus</i>	66
Figure 14 : Schéma de séparations et de purifications des produits A1, A2, A3, A4, A5 et A6 à partir des sous-fractions SF₂₀₋₂₁, SF₃₇ et SF₄₆ de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE Tn).....	80
Figure 15 : Schéma de la purification du produit A1 à partir de la sous-fraction SF₃₇ de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE Tn).....	81
Figure 16 : Schéma de la purification des produits A2, A3 et A4 à partir de la sous-fraction SF₂₀₋₂₁ de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE Tn).....	82
Figure 17 : Schéma de la purification des produits A5 et A6 à partir de la sous-fraction SF₄₆ de la fraction acétate d'éthyle de <i>T. numidicus</i> (F AE Tn).....	83
Figure 18 : Schéma des tentatives de purifications des produits antiprolifératifs à partir de l'extrait dichlorométhane de <i>T. numidicus</i> (E DM Tn).....	85
Figure 19 : Radical DPPH.....	86
Figure 20 : Réaction du radical DPPH avec un phénol.....	87

Figure 21 : Evolution du spectre RPE du radical du DPPH dans l'éthanol en fonction de différentes concentrations de vitamine E.....	88
Figure 22 : Inhibition de la prolifération des cellules HT-29, à une concentration de 50 µg/mL final, par deux huiles essentielles d'espèces endémiques de <i>Thymus</i>	134
Figure 23 : Activité anti-DPPH des extraits de <i>Thymus</i> à 0,125 mg/mL. Les barres sur les histogrammes représentent la déviation standard (SD) des mesures (n=3). Tn : <i>T. numidicus</i>; Tg : <i>T. guyonii</i>; Tc : <i>T. ciliatus</i> et Tv : <i>T. vulgaris</i>	150
Figure 24 : Corrélation entre l'activité antioxydante (représentée par 1/CI ₅₀) et le taux de phénols totaux des extraits de <i>Thymus</i>	155
Figure 25 : Inhibition de la prolifération cellulaire des cellules HT-29 par les extraits de <i>Thymus</i> après 48h, à une concentration de 50 µg/mL final (n = 3).....	157
Figure 26 : Spectre de RMN ¹ H du composé 1	171
Figure 27 : Spectre de RMN ¹³ C du composé 1	172
Figure 28 : Spectre COSY du composé 1	172
Figure 29 : Spectre COSY étalé du composé 1	173
Figure 30 : Spectre HMQC du composé 1	174
Figure 31 : Corrélations HMBC des protons 7'a et 7'b.....	174
Figure 32 : Spectre HMBC du composé 1	175
Figure 33 : Spectre de RMN ¹ H du composé 2	177
Figure 34 : Spectre de RMN ¹³ C du composé 2	177
Figure 35 : Spectre HMBC du composé 2	178
Figure 36 : Spectre de RMN ¹ H du composé 3	180
Figure 37 : Spectre de RMN ¹³ C du composé 3	181
Figure 38 : Spectre COSY du composé 3	181
Figure 39 : Spectre HMBC du composé 3	182
Figure 40 : Spectre de RMN ¹ H du composé 4	184
Figure 41 : Spectre HMQC du composé 4	185
Figure 42 : Spectre HMBC du composé 4	186
Figure 43 : Schéma de la présentation sur plaque CCM analytique de gel de silice du précipité à froid (Pf) au même niveau que l'acide ursolique (AU) (témoin antiprolifératif), révélation avec le réactif à la vanilline sulfurique.....	204

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	5
Chapitre 1 : Aperçu bibliographique sur le genre <i>Thymus</i>	6
I. La famille des LAMIACEAE	7
I.1. Présentation botanique et géographique	7
I.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel	8
II. Le genre <i>Thymus</i>	8
II.1. Histoire	8
II.2. Description morphologique	9
II.3. Classification taxonomique	9
II.4. Répartition géographique	9
II.5. Utilisations et activités biologiques	10
II.6. Métabolites isolés du genre <i>Thymus</i>	11
Chapitre 2 : Aperçu bibliographique sur les composés phénoliques	24
I. Définition	25
II. Structure de base	26
III. Composés phénoliques connus pour leur activité antioxydante	27
III.1. Les acides phénoliques	27
III.1.1. Structure de base	27
III.1.2. Relation structure-activité antioxydante	28
III.1.3. Activités biologiques	31
III.2. Les flavonoïdes	32
III.2.1. Structure de base	32
III.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes	35
III.2.3. Relation structure-activité antioxydante	38
III.2.4. Activités biologiques	39
Chapitre 3 : Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles	41
I. Définition	42
II. Répartition	42
III. Localisation	43
IV. Origine dans les végétaux	43

V. Composition chimique	44
VI. Rôle des huiles essentielles	47
VII. Domaines d'utilisation	48
VII.1. Phytothérapie	48
VII.2. Utilisation en aéro-ionisation	49
VII.3. Parfumerie et cosmétologie	49
VII.4. Conservation des denrées alimentaires	49
VIII. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	50
Chapitre 4 : Méthodes d'étude des activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale	52
I. Méthodes d'études du piégeage des radicaux libres	53
I.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	53
I.2. Test de blanchissement du β-carotène	54
II. Méthode d'étude de l'activité antiproliférative : Technique du MTT	54
III. Méthode d'étude de l'activité antibactérienne : Technique de diffusion en milieu gélosé (Méthode de Vincent)	55
IV. Méthode d'étude de l'activité antivirale : Observation visuelle de l'Effet CytoPathogène (ECP)	56
<u>MATERIEL & METHODES</u>	58
I. Matériel végétal et réalisation des différents extraits, fractions et huiles essentielles	59
I.1. Matériel végétal	59
I.1.1. Espèces endémiques Algériennes de <i>Thymus</i> (<i>T</i>)	59
I.1.1.1. <i>T. numidicus</i> (Poiret)	59
I.1.1.2. <i>T. ciliatus</i> Desf.	59
I.1.1.3. <i>T. guyonii</i> de Noé	60
I.1.1.4. <i>T. hirtus</i> Willd.	61
I.1.2. <i>T. vulgaris</i> (Thym commun)	61
I.2. Réalisation des différents extraits, fractions et huiles essentielles	62
I.2.1. Réalisation des extraits de <i>Thymus</i>	62
I.2.2. Extraction de <i>T. numidicus</i> à plus grande échelle	63
I.2.3. Extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i>	65

I.2.4. Obtention des huiles essentielles de <i>T. numidicus</i>, <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>	67
II. Méthodes chromatographiques analytiques	68
II.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	68
II.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP, HPLC)	69
II.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	70
II.3.1. Données GC-MS pour les huiles essentielles des deux espèces de <i>Thymus</i> (Collecte de 2010)	70
II.3.2. Données GC-MS pour l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> de la collecte 2012	70
II.3.3. Identification des composants d'huiles essentielles	71
III. Méthodes préparatives	72
III.1. Partage liquide-liquide	72
III.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	72
III.3. Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP, MPLC)	73
IV. Méthodes d'analyses physico-chimiques	74
IV.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	74
IV.2. Spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	75
V. Détermination du taux des composés phénoliques des différents extraits et fractions (Folin Ciocalteu)	76
V.1. Principe	76
V.2. Mode opératoire	76
V.2.1. Détermination de l'absorbance des polyphénols totaux	76
V.2.2. Mesure de l'absorbance du témoin pyrogallol	77
V.3. Méthode de calcul	77
VI. Procédures de séparation et de purification des molécules d'intérêt de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> (colonne ouverte)	78
VI.1. Séparation chromatographique par adsorption	78
VI.2. Purification chromatographique par phénomène d'exclusion stérique	79
VII. Procédures utilisées pour la recherche de molécules antiprolifératives dans l'extrait dichlorométhane de <i>T. numidicus</i> (E DM <i>Tn</i>)	84
VIII. Tests d'activités biologiques	86

VIII.1. Détermination de l'activité antioxydante	86
VIII.1.1. Test d'activité anti DPPH	86
VIII.1.1.1. Principe	86
VIII.1.1.2. Mode opératoire	88
VIII.1.1.3. Méthode de calcul	89
VIII.1.2. Test de blanchissement du β-carotène	89
VIII.1.2.1. Principe	89
VIII.1.2.2. Mode opératoire	89
VIII.2. Détermination de l'activité antiproliférative	91
VIII.2.1. Lignée cellulaire utilisée (HT-29)	91
VIII.2.2. Conditions de culture	91
VIII.2.2.1. Matériel	91
VIII.2.2.2. Milieux de culture	91
VIII.2.2.3. Ensemencement cellulaire	92
VIII.2.3. Test d'activité antiproliférative (technique du MTT)	93
VIII.2.3.1. Principe	93
VIII.2.3.2. Mode opératoire	93
VIII.2.3.2.1. Traitement des cellules avec les extraits/ huiles essentielles à tester	94
VIII.2.3.2.2. Mode de lecture et expression des résultats	94
VIII.3. Détermination de l'activité antibactérienne	96
VIII.3.1. Souches bactériennes testées	96
VIII.3.2. Préparation des inoculums	97
VIII.3.3. Test d'activité antibactérienne par diffusion en milieu solide	97
VIII.3.4. Evaluation du pouvoir antibactérien	99
VIII.3.4.1. Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)	99
VIII.3.4.2. Détermination de la CMB (concentration minimale bactéricide)	101
VIII.3.5. Effet des antibiotiques (ATB)	102
VIII.4. Détermination des activités cytotoxique et antivirale	104
VIII.4.1. Détermination de l'activité cytotoxique	104
VIII.4.1.1. Lignée cellulaire Vero	104

VIII.4.1.2. Culture cellulaire de la lignée Vero	105
VIII.4.1.3. Conservation des cellules	106
VIII.4.1.3.1. Congélation	106
VIII.4.1.3.2. Décongélation	106
VIII.4.1.4. Test de cytotoxicité par la technique du MTT	107
VIII.4.2. Détermination de l'activité antivirale	108
VIII.4.2.1. Multiplication de la souche virale	108
VIII.4.2.2. Titrage de la souche virale	109
VIII.4.2.3. Le test antiviral	110
VIII.4.2.3.1. Incubation de l'échantillon d'étude avec la suspension virale	110
VIII.4.2.3.2. Incubation des cellules avec l'échantillon d'étude	111
VIII.4.2.3.3. Incubation des cellules avec la suspension virale	111
<u>RESULTATS & DISCUSSION</u>	112
Chapitre 1 : Evaluation des activités biologiques de quatre espèces endémiques de <i>Thymus</i> poussant en Algérie	113
Chapitre 1.1 : Analyse GC-MS et évaluation des activités biologiques des huiles essentielles de trois espèces endémiques de <i>Thymus</i> poussant en Algérie	115
I. Analyse GC-MS	117
I.1. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> (Collecte de Mai 2012)	117
I.2. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de <i>T. hirtus</i>	124
I.3. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de <i>T. guyonii</i>	127
I.4. Analyse GC-MS comparative des trois huiles essentielles de <i>Thymus</i> (<i>T. numidicus</i> , <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>)	128
I.5. Recherche, dans d'autres espèces du genre <i>Thymus</i> , des composés majoritaires déterminés dans <i>T. numidicus</i> , <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i>	130
II. Détermination de l'activité antioxydante	133
III. Détermination de l'activité antiproliférative	134
IV. Détermination de l'activité antibactérienne	135
IV.1. Les huiles essentielles des deux espèces de <i>Thymus</i> (Collecte de Mai 2010)	135
IV.1.1. Effet des deux huiles essentielles de <i>Thymus</i> sur la croissance bactérienne	135

IV.1.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des deux huiles essentielles de <i>Thymus</i>	137
IV.1.3. Pouvoir antibactérien des deux huiles essentielles de <i>Thymus</i>	138
IV.2. L'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> (Collecte de Mai 2012)	140
V. Détermination des activités cytotoxique et antivirale	141
VI. Bilan des résultats & discussion	144
Chapitre 1.2 : Evaluation des activités biologiques des extraits de trois espèces endémiques de <i>Thymus</i> poussant en Algérie	146
I. Obtention des extraits	147
II. Test d'activité antioxydante	149
II.1. Détermination de pourcentages d'inhibition du radical DPPH	149
II.2. Détermination de la CI ₅₀ des extraits	151
II.3. Comparaison entre l'activité antioxydante des extraits de <i>Thymus</i> et les antioxydants de référence	151
III. Activité antioxydante et composition phénolique	152
III.1. Détermination du taux des composés phénoliques des extraits	152
III.2. Comparaison entre l'activité anti-DPPH et le taux des composés phénoliques	154
IV. Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HT-29	156
IV.1. Détermination de pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire	156
IV.2. Détermination de la CI ₅₀ des extraits actifs	157
V. Bilan des résultats & discussion	159
Chapitre 2 : Etude biologique et phytochimique des fractions issues de l'extrait hydro-alcoolique de <i>Thymus numidicus</i>	164
I. Obtention de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	166
II. Détermination de l'activité antioxydante (DPPH) et du taux de composés phénoliques de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	166
II.1. Comparaison de l'extrait hydro-alcoolique par rapport aux extraits polaires (méthanol et aqueux) de <i>T. numidicus</i> en terme d'activité antioxydante	167
II.2. Comparaison entre l'activité antioxydante de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et les antioxydants de référence	168

II.3. Comparaison des différentes fractions issues de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i>	169
II.4. Bilan	169
III. Détermination de la structure des composés isolés	170
III.1. Détermination structurale du composé 1	170
III.2. Détermination structurale du composé 2	177
III.3. Détermination structurale du composé 3	179
III.4. Détermination structurale du composé 4	184
IV. Activité antioxydante des produits isolés	189
V. Détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	190
V.1. Effet de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions sur la croissance bactérienne	190
V.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	192
V.3. Pouvoir antibactérien de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	193
VI. Détermination des activités cytotoxique et antivirale de l'extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i> et de ses différentes fractions	194
VI.1. Activité cytotoxique	195
VI.2. Activité antivirale	196
VII. Bilan des résultats & discussion	199
Chapitre 3 : Recherche de molécules antiprolifératives dans les extraits apolaires de <i>Thymus numidicus</i>	202
I. Etude de la nature des 3 composés majoritaires détectés par test de précipitation à froid de molécules de type terpéniques	203
II. Bilan	204
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	205
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	210
<u>ANNEXE</u>	244
<u>RESUMES EN FRANÇAIS, ANGLAIS ET ARABE</u>	

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'intérêt porté aux plantes aromatiques et médicinales, n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine végétale, il est préférable de se baser sur le choix de plantes utilisées en médecine traditionnelle ou populaire, qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales.

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément. A cette grande diversité floristique, s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. En effet, malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations, notamment celles des campagnes et des régions rurales, ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants lors de leur utilisation.

La flore Algérienne, avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques (Quezel & Santa, 1963), reste très peu explorée aussi bien sur le plan pharmacologique que phytochimique.

La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale, sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique Algérienne et aura un impact économique certain.

Dans ce contexte, et notamment dans le cadre du programme de recherche lancé par notre laboratoire sur les plantes médicinales, notre choix s'est porté sur quatre plantes du genre *Thymus*.

Le genre *Thymus* L. (Famille des Lamiaceae, Sous-famille des Nepetoïdeae, Tribu des Mentheae) possède plusieurs noms communs : "Zaatar" en Arabe, "Thym" en Français, "Thyme (syn. common thyme, garden thyme)" en Anglais (Fecka & Turek, 2008; Nasab et al., 2012), "Kekik" en Turquie (Ündeğer et al., 2009; Ozen et al., 2011) et "Azorbe/Avishan" en Persan (Nasab et al., 2012).

Plusieurs **activités pharmacologiques** ont été rapportées aussi bien pour **les extraits** que **les huiles essentielles** de *Thymus*. Ces activités seraient dues, en grande partie, à la présence de **composés phénoliques** dans ce genre.

Le sol Algérien compte neuf espèces endémiques de ce genre parmi onze (Morales, 2002) ou douze (Quezel & Santa, 1963) qui y poussent. Notre choix d'étude s'est porté sur quatre d'entre elles : *Thymus numidicus* (Poiret), *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf. et *Thymus hirtus* Willd.

La **sélection de ces espèces** est basée essentiellement sur leur **endémisme** et leurs **utilisations éventuelles en médecine traditionnelle** (Kabouche Z et al., 2005), en vue d'une **investigation biologique assez complète**, suivie d'une **investigation phytochimique** pour l'espèce aux **meilleurs potentiels pharmacologiques**.

Ainsi, le présent travail vise à déterminer **le potentiel**, en terme **d'activités biologiques**, aussi bien des **extraits** que des **huiles essentielles** de ces espèces endémiques de *Thymus*. L'**étude phytochimique** sera orientée par **bioguidage**, vers l'espèce aux **meilleurs potentiels biologiques**.

Notre travail sera structuré en trois parties : **Etude bibliographique, Matériels & Méthodes, Résultats & Discussion**, et se termine par une **Conclusion générale**.

L'**étude bibliographique** comporte quatre chapitres.

- ✓ Le premier chapitre sera consacré à un aperçu bibliographique sur le genre *Thymus*, tout en décrivant la famille à laquelle il appartient, la famille des Lamiaceae.
- ✓ Le deuxième chapitre sera consacré à un aperçu bibliographique sur les **composés phénoliques**, qui sont les **principaux métabolites** trouvés dans le genre *Thymus*.
- ✓ Le troisième chapitre sera consacré à un aperçu bibliographique sur les **huiles essentielles**, qui sont **largement trouvés** dans les espèces de *Thymus*, leur **conférant** leurs **caractères de plantes aromatiques**.
- ✓ Le quatrième chapitre sera consacré aux **méthodes d'étude** des **activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale**. Ici, ne seront décrites, brièvement, que les méthodes que nous avons utilisées pour déterminer les potentiels biologiques de nos plantes d'étude.

Dans la partie **Matériels & Méthodes**, après **description du matériel végétal** et **obtention d'échantillons d'étude** (extraits, fractions et huiles essentielles des plantes de *Thymus*), nous décrirons en **détail** toutes **les méthodes** utilisées dans la présente étude pour **l'exploration biologique** (de toutes les plantes de *Thymus*) et **phytochimique** (de la plante de *Thymus* à meilleur potentiel biologique).

La partie **Résultats & Discussion** comporte trois chapitres.

- ✓ Le premier chapitre sera consacré à **l'évaluation des activités biologiques des quatre espèces endémiques de *Thymus*** aussi bien pour les **huiles essentielles** (Chapitre 1.1) que les **extraits** (Chapitre 1.2).
- ✓ Le deuxième chapitre sera consacré à **l'étude biologique et phytochimique** des fractions issues de l'extrait hydro-alcoolique de *Thymus numidicus* (espèce aux **meilleurs potentiels biologiques**).
- ✓ Le troisième chapitre sera consacré à la recherche de molécules antiprolifératives dans les extraits apolaires de *Thymus numidicus*.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Aperçu bibliographique sur le genre *Thymus*

Dans ce chapitre, nous présenterons un aperçu bibliographique sur le genre *Thymus* auquel appartiennent nos plantes d'étude. Ce genre fait partie des *Lamiaceae* qui est l'une des familles les plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie. Après une description botanique et géographique de la famille des *Lamiaceae* et du genre *Thymus*, nous présenterons les différentes utilisations et activités biologiques de ce genre. Nous terminerons ce chapitre, en donnant quelques exemples des principaux métabolites rencontrés dans le genre *Thymus*, à savoir les acides phénoliques et les flavonoides. Ce genre fait partie des plantes aromatiques et est très riche en huiles essentielles.

I. La famille des LAMIACEAE

I.1. Présentation botanique et géographique

La famille des Lamiacées (*Lamiaceae*) ou Labiées (*Labiatae*) est une importante famille de plantes dicotylédones, comprenant environ 6000 espèces et près de 210 genres répartis dans le monde entier, mais surtout dans la région méditerranéenne. Elles sont réparties en sept sous-familles (*Ajugoïdeae*, *Chloanthoïdeae*, *Lamioïdeae*, *Nepetoïdeae*, *Scutellarioïdeae*, *Teucroïdeae*, *Viticoïdeae*, *Pogostemoïdeae*).

Le plus souvent, ce sont des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répartis autour du monde et dans tout type de milieux. La forme de lèvre de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille. Pour la plupart des genres, la section carrée de la tige et les feuilles opposées sont aussi des caractéristiques. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles (**Guignard, 2001**).

Les plantes de cette famille sont rarement ligneuses, souvent velues, à tige généralement quadrangulaire. Les feuilles sont opposées et décussées (disposées en paire se croisant d'un noeud à l'autre), dépourvues de stipules, à limbe généralement denté. Les fleurs généralement sont hermaphrodites, à symétrie bilatérale ou parfois presque radiaire. Les sépales (calice) et les pétales (corolle) sont soudés en tubes comportant habituellement quatre ou cinq lobes, ou lèvres, de forme irrégulière (symétrie bilatérale). Les deux, quatre ou cinq étamines sont attachées à l'intérieur du tube corollaire. L'ovaire est supère, libre et possède deux carpelles (**Bonniere & Douin, 1992**).

Les Lamiacées possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles les rendant très odorantes. On note le caractère aromatique des plantes de cette famille, la plupart étant riches en huile essentielles (**Quezel & Santa, 1963**).

I.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel

Cette famille est une importante source d'huiles essentielles, d'infusion et d'antibiotiques pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques. On y rencontre beaucoup d'espèces cultivées comme plantes condimentaires (sauge, thym, basilic, menthe, etc...). On y trouve aussi des plantes ornementales (sauge, lavande, etc..) (**Lambinon et al., 2004**).

II. Le genre *Thymus*

II.1. Histoire

Thymus provient du grec *thumon* qui signifie « offrande (que l'on brûle) » et « parfum », à cause de l'odeur agréable que la plante dégage naturellement ou lorsqu'on la fait brûler (**Rey, 1992**).

L'utilisation du thym dans la vie humaine date depuis très longtemps; il a été surtout utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses rituels culinaires se limitent à aromatiser le fromage et les liqueurs.

Mélangé aux onguents, il a été utilisé par les Égyptiens et les Étrusques pour embaumer leurs morts. Pensant que cette plante était source de courage, les Grecs en brûlaient devant l'autel de leurs dieux, les places publiques et les riches demeures. En plus de ses rituels culinaires, ils s'en servaient aussi pour parfumer l'eau des bains. Théophraste connaissait deux espèces de thym, l'un blanc, médicinal et très mellifère, l'autre noir, « qui corrompt l'organisme et suscite la bile ».

Le thym est diffusé en Europe par les Romains, qui en faisaient de nombreuses sortes de cosmétiques et s'en servaient pour purifier leurs pièces d'habitation et pour « donner du parfum aux fromages et liqueurs ».

Ce symbole de courage se perpétue au Moyen Âge, notamment lors des Croisades. Il était placé sous les oreillers (car il favoriserait le sommeil en chassant les cauchemars et la mélancolie) et sur les cercueils, lors des funérailles, car on pensait qu'il facilitait le passage dans l'autre vie.

Dans le langage des fleurs, il est symbole de courage, amour durable, esprit de créativité, dynamisme et résistance physique (**Histoire**).

II.2. Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse, odorante, formant des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailloux et dans les garrigues.

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice, quant à lui, est tubuleux et la corolle est plus au moins exserte (Quezel & Santa, 1963).

II.3. Classification taxonomique

Le *Thymus* est un genre de plantes (couramment appelées **thym** ou **serpolet**) de la famille des Lamiacées. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet, portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques (*Thym*).

Classification	
Règne	Plantae (végétal)
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>

II.4. Répartition géographique

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Naghbi et al., 2005). Il est composé d'environ 928 espèces distribuées principalement dans les pays méditerranéens, la partie du nord de l'Afrique et le Groenland du Sud (Sunar et al., 2009). Plusieurs auteurs (Cronquist, 1988; Heywood, 1993; Morales, 2002 ainsi que Stahl-Biskup & Saez, 2002), rapportent que la région de la Méditerranée peut être décrite comme le centre de ce genre.

C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. Elle est trouvée également en Sibérie et même en Himalaya (Dob et al., 2006).

II.5. Utilisations et activités biologiques

Selon **Fecka & Turek (2008)**, le thym est inscrit dans les éditions actuelles de la Pharmacopée européenne, la Pharmacopée des États-Unis ou des pharmacopées nationales, par exemple, la Pharmacopée polonaise. Thymi herba (du *Thymus vulgaris* L.) est officiellement dans la Pharmacopée européenne 5 (PH. Eur. 5). Le *Thymus vulgaris* L est une herbe vivace, indigène dans le centre et le sud de l'Europe, de l'Afrique et de l'Asie, qui est riche en huiles essentielles et en substances phénoliques antioxydantes (**WHO, 1999**).

Depuis les Grecs antiques, les Egyptiens et les Romains, le thym était généralement utilisé en alimentation et en médecine populaire (**Ündeğer et al., 2009**).

Plusieurs auteurs rapportent l'utilisation de thym comme épices et condiments dans des produits alimentaires, principalement pour ses vertus de saveur, d'arôme et de conservation (**Ündeğer et al., 2009; Ozen et al., 2011; Nasab et al., 2012**). Il est aussi connu l'utilisation de *Thymus* comme infusion ou tisane, insecticide et comme agent d'assaisonnement (**Ozen et al., 2011; Nasab et al., 2012**).

L'utilisation de thym en médecine populaire a été rapportée par plusieurs auteurs. Les propriétés aromatiques et médicinales du genre *Thymus* ont rendu cette plante médicinale la plus populaire (**Nickavar et al., 2005**). Son huile est parmi les dix premières huiles essentielles du monde (**Rahimmalek et al., 2009**). À cause de leurs propriétés antiseptique, carminative, expectorante, antispasmodique et anti-inflammatoire, les espèces de *Thymus* ont été utilisées le plus fréquemment en phytothérapie traditionnelle (**Nasab et al., 2012**).

Plusieurs auteurs (**Knols et al., 1994; Pattnaik et al., 1996; Ernst et al., 1997; Marino et al. 1999 ; Youdim et al., 1999**) montrent diverses activités pharmacodynamiques aussi bien pour les extraits que les huiles essentielles de thym. **Sunar et al. (2009)** ont montré que ce genre possède de fortes activités antifongique, antivirale, antibactérienne, antiparasitaire, antioxydante et spasmolytique.

Fecka & Turek (2008) rapportent que le thym et ses extraits sont utilisés par voie orale pour traiter la dyspepsie et d'autres perturbations gastro-intestinales, la toux due au froid, la coqueluche, la bronchite, la laryngite et l'angine (par gargarisme). Les préparations de thym sont utilisées dans le traitement de blessures mineures, le rhume, les troubles de la cavité buccale et dans l'hygiène bucco-dentaire. En Europe, le thym est considéré comme un bronchospasmodique, un expectorant et un antimicrobien. Il est utilisé pour le catarrhe des voies respiratoires supérieures et contre les symptômes de bronchite (les monographies WHO, ESCOP, la Commission allemande E).

II.6. Métabolites isolés du genre *Thymus*

Le genre *Thymus* a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et biologiques. L'investigation phytochimique extensive, a révélé la présence de plusieurs composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpenoïdes, les huiles essentielles (**Boros et al., 2010; Hossain et al., 2010**), les oligomères d'acide caféique (connu comme labiataetannins), les dérivés d'hydroquinone, les biphényles, etc. Sa qualité est généralement déterminée par son contenu d'huile essentielle (**Fecka & Turek, 2008**).

➤ Les acides phénoliques

Petersen & Simmonds (2003) rapportent que l'acide rosmarinique est l'un des plus importants polyphénols antioxydants dans le thym et il est aussi largement trouvé dans les plantes de la famille des Lamiaceae.

L'investigation phytochimique de la plante *Thymus capitatus* (**Achour et al., 2012**) a conduit à l'isolement de l'acide carnosique et l'acide rosmarinique à partir de l'extrait aqueux.

Nous présentons dans le **Tableau 1** et la **Figure 1** les Acides Phénoliques trouvés dans le genre *Thymus*.

Tableau 1 : Les Acides Phénoliques du genre *Thymus*.

Acides phénoliques	Espèces de <i>Thymus</i>
Dérivés de l'acide caféique	
Acide caféique (1)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹⁻⁸
	<i>T. serpyllum</i> ^{4, 6, 9, 10}
	<i>T. quinquecostatus</i> ¹¹
Acide chlorogénique (2)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁷
	<i>T. serpyllum</i> ⁹
	<i>T. webbianus</i> ¹²
Acide caféique éthyle ester (3)	<i>T. serpyllum</i> ⁹
Acide caféique glucoside (4)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{7, 13}
Acide dicafféoylquinique (5)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁷
	<i>T. webbianus</i> ¹²
Acide rosmarinique (6)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1-4, 6, 8, 13-18}
	<i>T. serpyllum</i> ^{4, 6, 9, 10}
	<i>T. sipyleus</i> ¹⁹
	<i>T. quinquecostatus</i> ¹¹
	<i>T. capitatus</i> ²⁰
Acide lithospermique (7)	<i>T. serpyllum</i> ⁶
Glucoside acide rosmarinique (8)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹³
3'- <i>O</i> -(8''- <i>Z</i> -Cafféoyl) acide rosmarinique (9)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹⁶
Rosmarinate de méthyle (10)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁶
Acide Salvianolique I (11)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹³
Acide Salvianolique K (12)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹³
Autres acides phénoliques	
Acide gentisique (13)	<i>T. vulgaris</i> L. ²
Acide protocatechuique (14)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{2, 7}
Acide hydroxybenzoïque (15)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{2, 4, 7}
	<i>T. serpyllum</i> ⁹
Acide férulique (16)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{5, 7}
<i>p</i> - Acide coumarique (17)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1, 2, 7}
	<i>T. webbianus</i> ¹²
	<i>T. serpyllum</i> ⁹
Acide gallique (18)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1, 3, 7}
	<i>T. webbianus</i> ¹²
Acide syringique (19)	<i>T. vulgaris</i> L. ²
Acide hydroxybenzoïque- <i>O</i> -hexoside (20)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁷
Acide vanillique (21)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{2, 7}
	<i>T. serpyllum</i> ⁹

¹ Shan et al. (2005). ² Zgorcka & Glowniak (2001). ³ Hossain et al. (2011). ⁴ Kulisic et al. (2006). ⁵ Wojdylo et al. (2007). ⁶ Fecka & Turek (2008). ⁷ Hossain et al. (2010). ⁸ Wang et al. (2004). ⁹ Miron et al. (2011). ¹⁰ Janicsak et al. (1999). ¹¹ Lee et al. (2011). ¹² Blazquez et al. (1994). ¹³ Nagy et al. (2011). ¹⁴ Kosar et al. (2005). ¹⁵ Zheng & Wang (2001). ¹⁶ Dapkevicius et al. (2002). ¹⁷ Reichling et al. (2008). ¹⁸ Justesen (2000). ¹⁹ Ozgen et al. (2011). ²⁰ Achour et al. (2012).

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires largement répandus dans le genre *Thymus*. Certains d'entre eux servent de chémomarqueurs des espèces *Thymus* : la lutéoline, la 6-hydroxylutéoline et la thymusine (5,6-dihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone) (Tomas-Barberan et al., 1987; Tomas-Barberan & Gil, 1990; Tomas-Barberan & Wollenweber, 1990; Kulevanova et al., 1998). L'importance biologique des flavonoïdes a été largement démontrée.

La recherche bibliographique réalisée sur les flavonoïdes du genre *Thymus*, montre la présence de : flavones, flavanones, flavonols et dihydroflavonols. Nous présentons dans le **Tableau 2** et la **Figure 1** les principaux Flavonoïdes trouvés dans le genre *Thymus*.

L'investigation phytochimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *Thymus hirtus* (Algérie) a abouti à l'isolement de huit flavonoïdes : trois **FLAVONES** communes (Apigénine, Lutéoline et Diosmétine), **trois dérivés des ces flavones** (8C-(hydroxybenzyl)apigénine, 8C-(hydroxybenzyl)lutéoline, 8C-(hydroxybenzyl)diosmétine), **un dérivé de quercétine** (8C-(hydroxybenzyl)quercétine) et **un dérivé de kaempférol** (8C-(hydroxybenzyl)kaempférol) (Merghem et al., 1995).

A partir des extraits éther diéthylique des parties aériennes de l'espèce *Thymus herba barona* (Espagne), Corticchiato et al. (1995) ont isolés les **FLAVANONES** (Eriodictyol, Naringénine) et les **FLAVONES** (Lutéoline, Sorbifoline, Thymusine, Cirsiliol, Apigénine, Sidéritoflavone, Cirsimaritrine, Cirsilinéol, Xanthomicrol, 8-méthoxy cirsilinéol et Genkwanine).

Horwath et al. (2008) ont réalisé une investigation phytochimique des extraits éther diéthylique, de 71 populations de *Thymus hyemalis* et *Thymus baeticus* ainsi que les hybrides entre les deux espèces, prélevés de 12 sites dans différentes régions climatiques du Sud-est de l'Espagne. Cette étude a abouti à l'isolement de **FLAVANONES** (Naringénine; Eriodictyol; Sakuranétine; "Xanthomicrol flavanone"; "3'-Méthoxy-xanthomicrol flavanone"), de **DIHYDROFLAVONOLS** (Aromadendrine, Taxifoline), de **FLAVONOLS** (Quercétine), de **FLAVONES** (Apigénine; Genkwanine; Sorbifoline; Cirsimaritrine; Lutéoline; Lutéoline 7-méthyl éther; Velutine; Lutéoline 7,3',4'-triméthyl éther; Thymusine; Xanthomicrol; Gardénine B; Cirsiliol; 6-OH lutéoline 7,3'-diméthyl éther; Cirsilinéol; 5-Desméthyl-sinensétine; Sidéritoflavone; Thymonine; 3'-Méthoxy-xanthomicrol; Thymonine 4'-méthyl éther; 5-Desméthyl-nobiletine).

A partir de l'extrait acétonique de *Thymus vulgaris* L., Miura & Nakatani (1989) ont isolé six **FLAVONES** (5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3' tetraméthoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-6,7,3' triméthoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone; 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone).

Tableau 2 : Les principaux Flavonoïdes trouvés dans le genre *Thymus*.

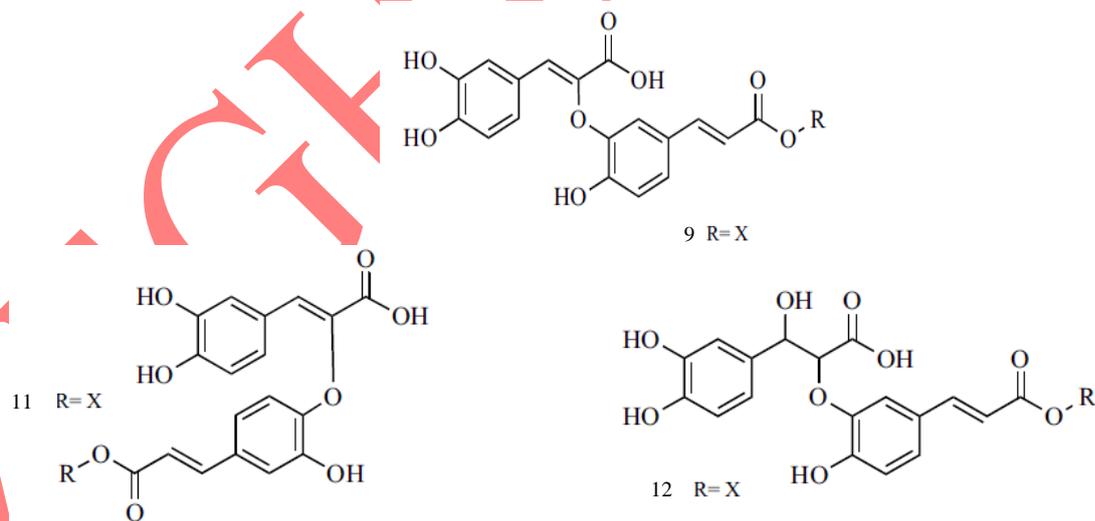
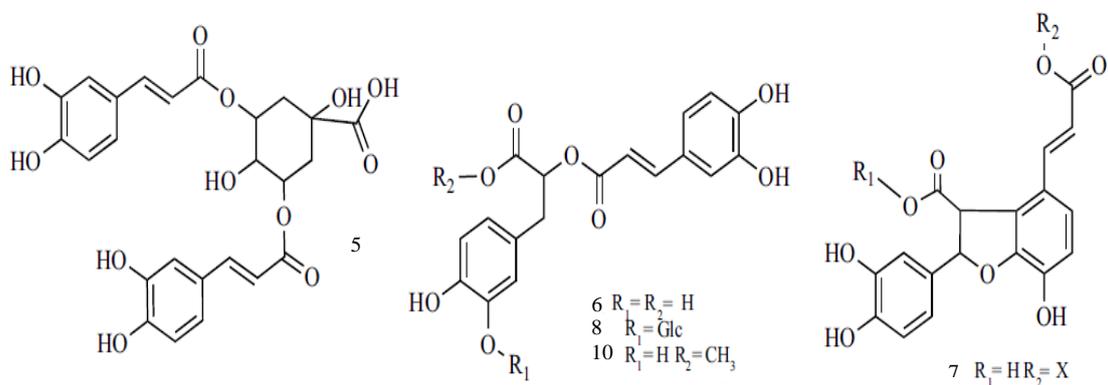
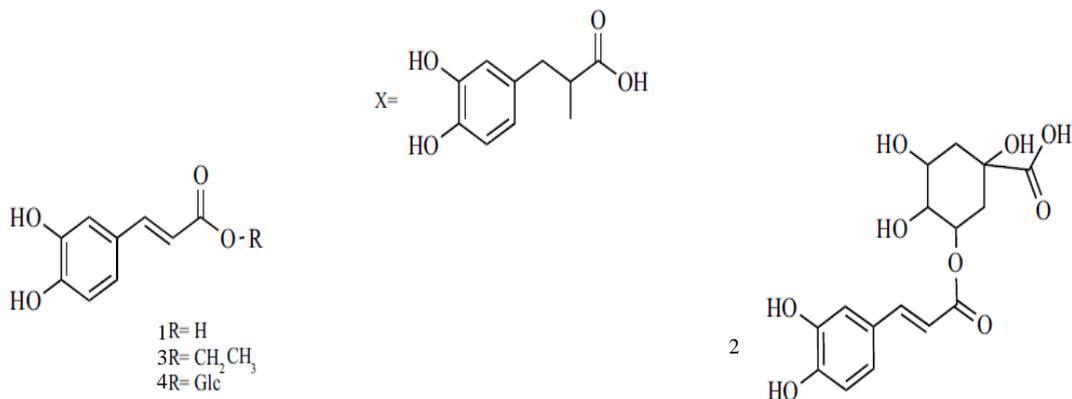
Flavonoïdes	Espèces de <i>Thymus</i>
Flavones	
Lutéoline (22)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹⁻⁶
	<i>T. serpyllum</i> ^{3, 4, 7}
	<i>T. sipyleus</i> ⁸
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
	<i>T. hirtus</i> ²⁰
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Lutéoline- <i>O</i> -glucoside (23)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1, 3, 5, 6, 12, 13}
	<i>T. serpyllum</i> ^{3, 7}
	<i>T. sipyleus</i> ⁸
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
Lutéoline- <i>O</i> -rutinoside (24)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{4, 5}
	<i>T. serpyllum</i> ⁴
Lutéoline- <i>O</i> -glucuronide (25)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{4, 5, 13-15}
	<i>T. serpyllum</i> ^{4, 7}
	<i>T. sipyleus</i> ⁸
Lutéoline- <i>O</i> -diglucoside (26)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹³
Lutéoline-acétyle- <i>O</i> -glycoside (27)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹³
Lutéoline-7- <i>O</i> -(6''-feruloyl)-s glucopyranoside (28)	<i>T. sipyleus</i> ⁸
Apigénine (29)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1, 3, 5}
	<i>T. serpyllum</i> ^{3, 7}
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
	<i>T. hirtus</i> ²⁰
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Apigénine-7- <i>O</i> -rutinoside (30)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵
Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside (31)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{3, 5, 16}
	<i>T. serpyllum</i> ³
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
Apigénine-7- <i>O</i> -glucuronide (32)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{6, 13, 14}
	<i>T. serpyllum</i> ⁷
Apigénine-6,8-di- <i>C</i> -glucoside (33)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁶
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
Thymusine (34)	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹

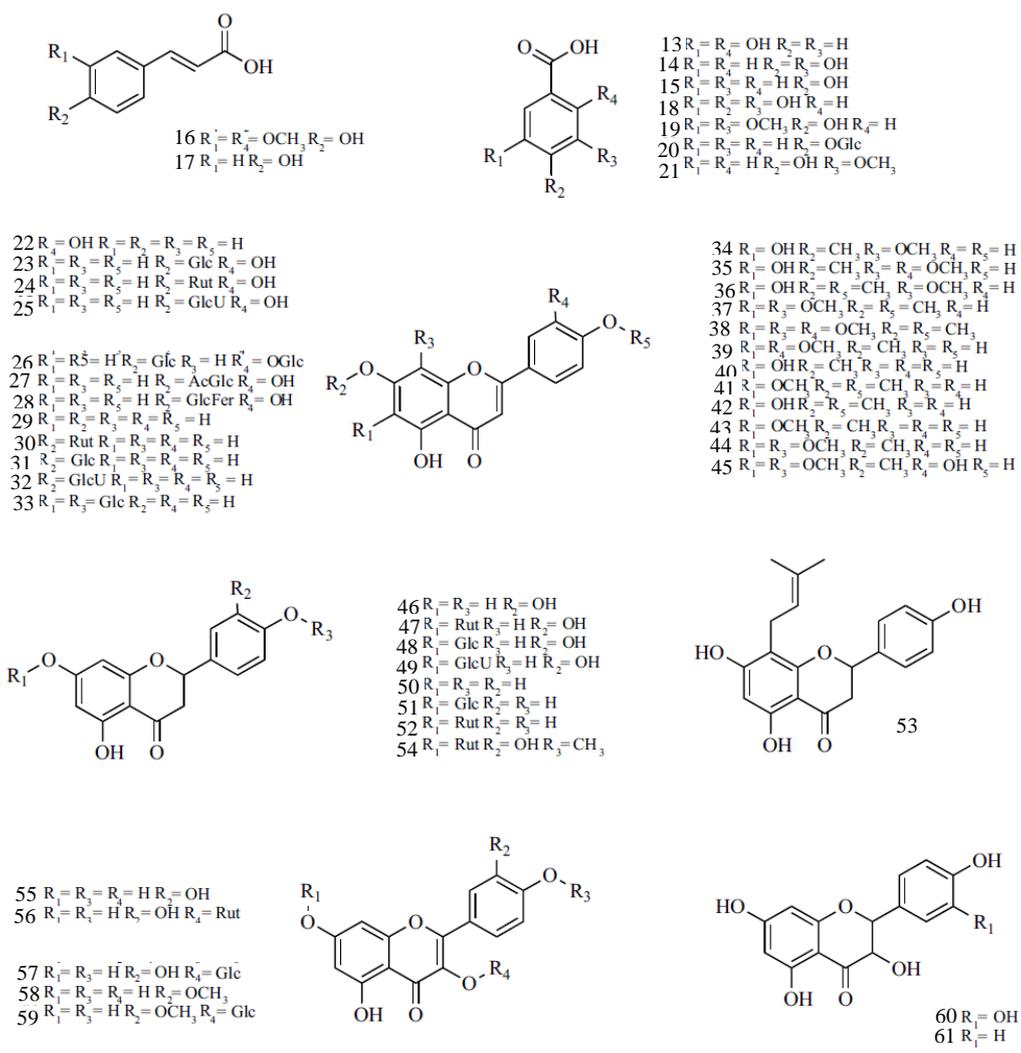
Thymonine (35)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Pebrelline (36)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
Gardénine B (37)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Desméthylnobiletine (38)	<i>T. striatus</i> ^{10,19}
Cirsilinéol (39)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹⁷
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Sorbifoline (40)	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Salvigénine (41)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
Ladanéine (42)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
Cirsimaritine (43)	<i>T. serpyllum</i> ⁷
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Xanthomicrol (44)	<i>T. striatus</i> ¹⁰
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Sidéritoflavone (45)	<i>T. herba-barona</i> ⁹
Flavanones	
Eridioctyol (46)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{1, 4, 15}
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. serpyllum</i> ^{4,7}
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Eriocitrine (47)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{3, 4, 12}
	<i>T. serpyllum</i> ^{3,4}
Eridioctyol- <i>O</i> -glucoside (48)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{4,14}
Eridioctyol- <i>O</i> -glucuronide (49)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{13,14}
	<i>T. serpyllum</i> ⁷
Naringénine (50)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁴
	<i>T. herba-barona</i> ⁹
	<i>T. webbianus</i> ¹¹
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Naringénine-7- <i>O</i> -glucoside (51)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁴
Naringénine-7- <i>O</i> -rutinoside (52)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁴
Prénylnaringénine (53)	<i>T. serpyllum</i> ⁷
Hespéridine (54)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁴
Flavonols & dihydroflavonols	
Quercétine (55)	<i>T. vulgaris</i> L. ^{3,5}
	<i>T. serpyllum</i> ³
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Rutine (56)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵
Quercétine-3- <i>O</i> -hexoside (57)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵
Isorhamnétine (58)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵
Isorhamnétine- <i>O</i> -glucoside (59)	<i>T. vulgaris</i> L. ⁵

Taxifoline (60)	<i>T. vulgaris</i> L. ¹⁵
	<i>T. quinquecostatus</i> ¹⁸
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹
Aromadendrine (61)	<i>T. quinquecostatus</i> ¹⁸
	<i>T. hyemalis</i> et <i>T. baeticus</i> ²¹

¹ Kosar et al. (2005). ² Zheng & Wang (2001). ³ Kulisic et al. (2006). ⁴ Fecka & Turek (2008).
⁵ Hossain et al. (2010). ⁶ Reichling et al. (2008). ⁷ Miron et al. (2011). ⁸ Ozgen et al. (2011).
⁹ Corticchiato et al. (1995). ¹⁰ Marin et al. (2005). ¹¹ Blazquez et al. (1994). ¹² Wang et al.
(1998). ¹³ Justesen (2000). ¹⁴ Nagy et al. (2011). ¹⁵ Dapkevicius et al. (2002). ¹⁶ Hossain et al.
(2011). ¹⁷ Miura & Nakatani (1989). ¹⁸ Lee et al. (2011). ¹⁹ Voirin et al. 1999. ²⁰ Merghem et
al. (1995). ²¹ Horwath et al. (2008).

ZEGHIB ASSA





GlcU- Glucuronide unit; Glc- Glucoside unit; Rut- Rutinoside unit; Ac- Acetyl unit; Fer- Feruloyl unit

Figure 1 : Structures chimiques des polyphénols décrits dans les plantes de *Thymus*.

➤ Les huiles essentielles

Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés phénoliques trouvés dans les huiles essentielles du genre *Thymus*, ainsi que le para-cymène, le 1,8-cinéol (eucalyptol), le linalol et d'autres monoterpènes, triterpènes. Les espèces peuvent être regroupées selon des chémotypes identifiés par la richesse en certains composants (*Composants*):

- **chémotype 1** : huile riche en carvacrol,
- **chémotype 2** : huile riche en monoterpènes aromatiques (principalement thymol) et plus pauvre en carvacrol, α -terpinène et méthyl carvacrol,
- **chémotype 3** : huile riche en 1,8-cinéol,
- **chémotype 4** : huile riche en linalol,
- **chémotype 5** : huile riche en citral,
- **chémotype 6** : huile riche en α -terpinéol,
- **chémotype 7** : huile riche en monoterpènes aromatiques et bornéol,
- **chémotype 8** : huile riche en géraniol,
- **chémotype 9** : huile riche en 1,8-cinéol, camphre et thymol,
- **chémotype 10** : huile riche en *cis*- et *trans*-hydrates de sabinène et terpinène-4-ol,
- **chémotype 11** : huile riche en cétone,
- **chémotype 12** : huile riche en citronellal.

La recherche bibliographique réalisée sur les huiles essentielles du genre *Thymus*, montre la présence de chémotypes incluant (**Tableaux 3 (1), 3 (2), 3 (3)**) ou excluant (**Tableau 4**) le thymol / carvacrol.

Tableau 3 (1) : Composants majoritaires (% $\geq 5,0$, incluant le thymol et / ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de *Thymus*.

Composé (%)	T. <i>numidicus</i> (Algérie)			T. <i>fontanesii</i> (Algérie)		T. <i>palloscens</i> (Algérie)	T. <i>ciliatus</i> (Algérie)		T. <i>kotshyanus</i> (Iran)		T. <i>daenensis</i> (Iran)	T. <i>pubescens</i> (Iran)	T. <i>persicus</i> (Iran)	T. <i>x-prolock</i> (Iran)	T. <i>eriocalyx</i> (Iran)	T. <i>carmanicus</i> (Iran)
	1	2	3	4	5		7	8	9	10						
	a	B	c	a	b		a	B	a	b						
Thymol	68,0	68,2		29,3	67,8		79,1		13,94	41,6	51,3	19,1	10,38	31,7	63,8	6,0
Carvacrol		16,9	28,1			65,0		80,3	82,05		9,2	32,1	25,71			68
<i>p</i> -cymène	5,8		8,0	15,9	13,0	15,1	5,6				7,6	6,1				8,9
γ -terpinène	8,5			21,7	15,0	17,4					10,1		5,63			8,0
α -terpinéol												14,6				
1,8- cinéole													5,24			
β -phellandrène													11,62	38,7	13,30	
Linalool		11,5														

¹ Laouer et *al.*, (2009). ² Kabouche A et *al.*, (2005). ³ Hazzit et *al.*, (2007). ⁴ Dob et *al.*, (2006). ⁵ Kabouche Z et *al.*, (2005). ⁶ Hazzit et *al.*, (2009). ⁷ Kabouche et *al.*, (2009). ⁸ Bousmaha-Marroki et *al.*, (2007). ⁹ Jamshidi et *al.*, (2006). ¹⁰ Kizil et *al.*, (2006). ¹¹ Barazandeh et *al.*, (2007). ¹² Morteza-Semnani et *al.*, (2006). ¹³ Meshkatsadat et *al.*, (2006). ¹⁴ Rasooli et *al.*, (2005). ¹⁵ Nejad Ebrahimi et *al.*, (2008).

Tableau 3 (2) : Composants majoritaires (% \geq 5,0, incluant le thymol et / ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de *Thymus*.

Composé (%)	T. <i>quincestatus</i> (Chine) 16 17		T. <i>capitatus</i> (Tunisie) 18	T. <i>capitatus</i> (Maroc) 19	T. <i>ciliatus</i> (Maroc) 20	T. <i>longiculis</i> (Turquie) 21	T. <i>ericalyx</i> (Turquie) 22	T. <i>linearis</i> (Inde) 23	T. <i>baicalensis</i> (Russie) 24	T. <i>zygioides</i> (Grèce) 25	T. <i>pulegioides</i> (Roumanie) 26	T. <i>mastichina</i> (Italie) 27
	a	b										
Thymol	28,54	12,20	89,06	22,9	44,2	27,65	79	66,65		19,5		
Carvacrol	11,45	9,0		50,92					28,3		62,6	75,0
<i>p</i> -cymène		17,39	5,04			19,38		21,60	27,8	19,4	7,1	
γ -terpinène						27,80		12,48	14,3	17,2	9,9	
1,8- cinéole							9,88					15,3
Bornéol		12,08					11,98		13,3			
α -terpinène				20,2	12,3							
β -ocymène					25,8							

¹⁶ Yang et al., (2004). ¹⁷ Chen et al., (2009). ¹⁸ Mkaddem et al., (2010). ¹⁹ Hazzit et al., (2009). ²⁰ El Ajjouri et al., (2010). ²¹ Sarikurku et al., (2010). ²² Kucukbay et al., (2010). ²³ Verma et al., (2010). ²⁴ Zhigzhitzhapova et al., (2008). ²⁵ Tzakou et al., (2008). ²⁶ Pavel et al., (2010). ²⁷ Bentes et al., (2009).

Tableau 3 (3) : Composants majoritaires (% \geq 5,0, incluant le thymol et / ou carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de *Thymus*.

Composé (%)	T. <i>trautvetteriklokov</i> (Ecosse) 28	T. <i>vulgaris</i> (Estonie) 29	T. <i>vulgaris</i> (Espagne) 30	T. <i>zygis</i> (Espagne) 31	T. <i>marcshallianus</i> (Espagne) 32	T. <i>proxinus</i> (Espagne) 32	T. <i>vulgaris</i> (Allemagne) 33	T. <i>vulgaris</i> (Cuba) 34
Thymol	24,43	30,6	47,5	20,8	28,0	32,9	49,6	37
Carvacrol	5,07	41,1		22				
<i>p</i> -cymène	10,09	11,2	27,8		7,7	25,4	16,4	62,1
γ -terpinène	7,78	9,5	16,8		18,0	22,4	8,0	
α -terpinéol	6,31							
Bornéol	11,36							
α -pinène	5,29							
Géraniol				10,8				
Acétate de Géranyl				15,8				
Linalool				25,0				

²⁸ Shahnazi et al., (2007). ²⁹ Mkaddem et al., (2010). ³⁰ Laouer et al., (2009). ³¹ Goncalves et al., (2010). ³² Jia et al., (2010). ³³ Gerhard et al., (2008). ³⁴ Martinez-Perez et al., (2007).

Tableau 4 : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$, excluant le thymol et le carvacrol) d'huiles essentielles d'espèces de *Thymus*.

Composé (%)	T. <i>capitelatus</i> (Italie) 1	T. <i>camphoratus</i> (Italie) 2	T. <i>glabrescens</i> (Roumanie) 3	T. <i>algeriensis</i> (Algérie) 4	T. <i>bracteosus</i> (Croatie) 5 6 7		T. <i>algeriensis</i> (Maroc) 8	T. <i>daensis</i> (Iran) 9	T. <i>citriodorus</i> (Iran) 10
	<i>p</i> -cymène					10,2			
Bornéol	19,5								
Acétate de linalyl	27,5	15,0							
β -caryophyllène					14,6	13,1	9,7		
1,8-cinéole	47,5	11,0							
α -pinène					7,2		6,3	20,5	
Linalool		17,0							
Géraniol			55,5					37,2	45,4
Acétate de Géranyl				16,4				18,7	
Germacrène					15,5	29,0			
Acétate de Neryl			11,1						
β - bisabolène			6,7						
Oxyde de caryophyllène				5,0					
Camphre							27,7		
Géranial								11,2	13,9
Nérol							8,3		5,2
Néral							9,3		10,1
Myrcène									7,2

¹ Salgueiro et al., (2006). ² Miguel et al., (2005). ³ Pavel et al., (2010). ⁴ Hazzit et al., (2007) ⁵ Slavkovska et al., (2006). ⁶ Bucar et al., (2005).

⁷ Brantner et al., (2005). ⁸ El Ajjouri et al., (2010). ⁹ Hashemi et al., (2010). ¹⁰ Omidbaigi et al., (2005).

Chapitre 2

Les composés phénoliques

Les diverses activités pharmacodynamiques rapportées aussi bien pour les extraits que les huiles essentielles des espèces de *Thymus*, seraient dues en grande partie à la présence de composés phénoliques dans ce genre.

Les composés phénoliques constituent un groupe de substances qui sont largement présents dans le règne végétal, où plus de 8,000 sont connus, avec des activités et structures chimiques différentes. Ils ont une large gamme d'actions incluant les activités antitumorale, antivirale, antibactérienne, cardioprotective, et antimutagéniques (**Rice-Evans & Miller, 1996; Benavente-García et al., 1997; Sergediene et al., 1999**). Parmi les propriétés des composés phénoliques, il a été trouvé qu'ils protègent les plantes contre les dommages oxydatifs et peuvent avoir le même rôle chez les humains (**Duthie et al., 1997; Skaper et al., 1997**).

Ces composés sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les noisettes, les cacahuettes, les graines, ainsi que dans le thé, le vin rouge, les agrumes, et bien d'autres sources alimentaires. Ils font partie de la consommation régulière dans l'alimentation humaine (**Benavente-García et al., 1997; Middleton et al., 2000**). Les principales classes des composés phénoliques trouvés dans l'alimentation, sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les coumarines, et les tannins (**Harborne, 1993**).

Les composés phénoliques, dont font partie les acides phénoliques ainsi que les flavonoïdes, sont recherchés dans nos plantes d'étude (voir Matériels et Méthodes). Ces composés vont être décrits dans ce chapitre.

I. Définition

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise, est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction. Cette fonction peut être de type éther, ester ou hétéroside. Cette définition purement chimique est, toutefois, insuffisante pour caractériser les composés phénoliques végétaux. Si l'on s'en tient à cette définition, de nombreux métabolites secondaires possédant ces éléments structuraux, seraient inclus dans ce groupe, alors qu'ils font partie d'autres groupes phytochimiques. Afin de limiter ce groupe, il est nécessaire, pour le définir, de faire intervenir des critères biosynthétiques, en plus, des critères chimiques. Ces critères sont la voie de synthèse du noyau aromatique. Les composés

phénoliques des végétaux, sont les composés issus de deux grandes voies d'aromagenèse, que sont la voie issue du métabolisme de l'acide shikimique et la voie issue du métabolisme des polyacétates. Certains sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant, ainsi, la formation de composés mixtes. Cette voie intermédiaire est notamment à l'origine de tous les flavonoïdes.

Les composés phénoliques peuvent donc être définis comme des dérivés non azotés, dont le ou les cycles aromatiques, sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate.

II. Structure de base

L'élément structural de base des composés phénoliques est donc le groupement phénol. Cette structure présente la particularité de s'oxyder facilement. Cette oxydation va conduire, à la suite de la perte d'un proton et d'un électron, à la formation du radical phénoxy. Ce radical phénoxy pourra être stabilisé grâce à la possibilité de résonance qu'offre le noyau aromatique (**Figure 2**).

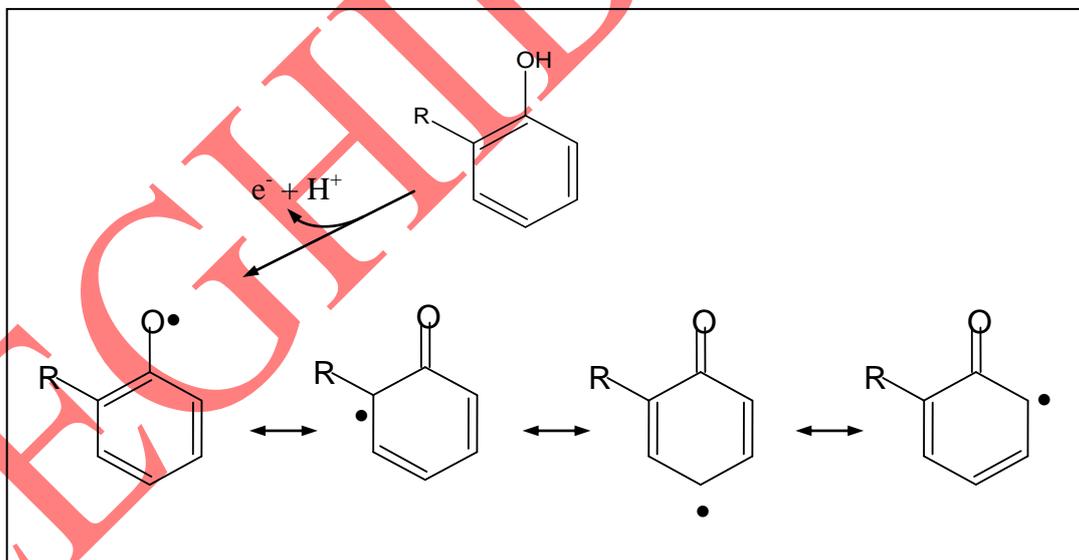


Figure 2 : Formation et stabilisation par résonance du radical phénoxy lors de l'oxydation de l'ion phénate.

Cette instabilité relative des noyaux phénoliques, permet d'expliquer leur très forte réactivité et leur capacité à piéger les radicaux libres.

L'oxydation des phénols est, de plus, une des réactions impliquées dans la formation même des composés phénoliques (par couplage oxydatif) ainsi que dans les processus de clivage ou d'hydroxylation des noyaux aromatiques.

La mise en évidence de ce type de composés est relativement simple. Outre la possibilité d'observer certains d'entre eux directement grâce à leur coloration naturelle (anthocyanes), ils peuvent être mis en évidence par observation en lumière ultra-violette ou par réaction colorée. Il existe aussi de nombreux réactifs généraux des phénols permettant de les mettre en évidence, notamment le réactif phosphomolybdotungstique (Réactif de Folin-Ciocalteu) que nous avons utilisé pour le dosage de polyphénols (voir Matériel & Méthodes).

III. Composés phénoliques connus pour leur activité antioxydante

Les composés phénoliques typiques qui possèdent une activité antioxydante, sont principalement les acides phénoliques et les flavonoïdes (Spiridon *et al.*, 2011). Dans ce paragraphe, nous verrons quelle est la structure de ces composés, les critères structuraux nécessaires à l'activité antioxydante de ces molécules. Pour finir, nous aborderons certaines de leurs propriétés biologiques.

III.1. Les acides phénoliques

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservée aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

III.1.1. Structure de base (Bruneton, 1999)

Ces composés sont des dérivés benzoïques (C_6-C_1) et cinnamiques (C_6-C_3) (Figure 3).

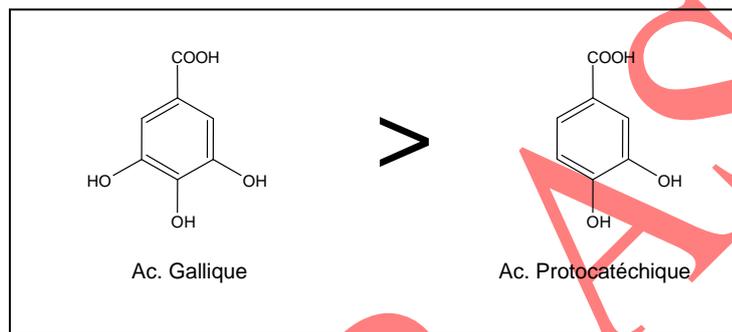
Les acides phénoliques dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont des composés très communs dans la nature. On trouve ces composés aussi bien sous forme libre que combinée, à l'état d'ester ou d'hétéroside.

Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique tels que les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique ont une distribution très large. Ces composés sont rarement présents sous forme libre. On les trouve sous forme estérifiée notamment sous la forme d'esters d'alcools aliphatiques (ac. mono- et dicaféyl-tartrique, féruloyl-tartrique,

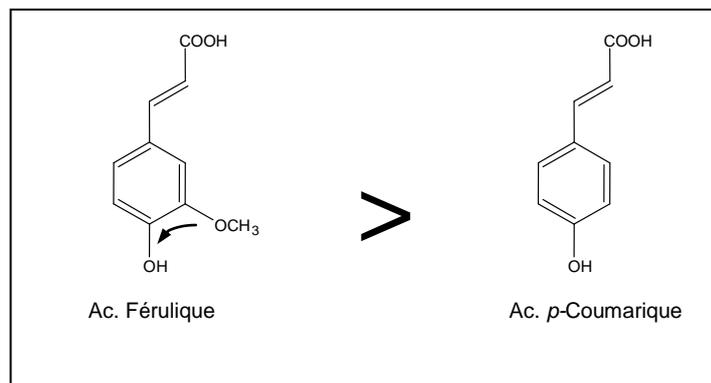
etc...) ou d'esters de l'acide quinique (ac. chlorogénique) et depsides (ac. rosmarinique et lithospermique) (**Figure 3**).

III.1.2. Relation structure-activité antioxydante

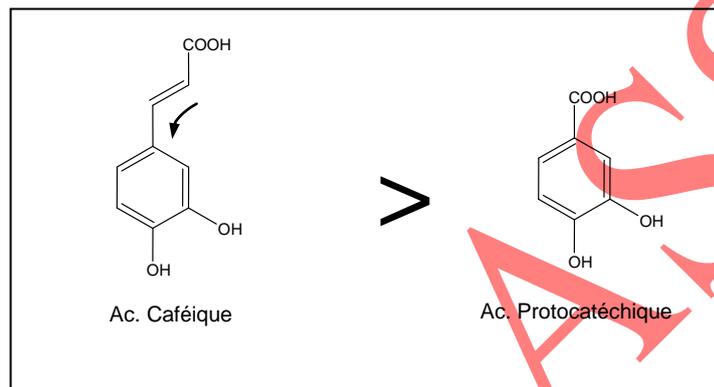
L'activité antioxydante des acides phénoliques va dépendre de plusieurs critères. Le premier critère étant le nombre de groupements hydroxyles de la molécule. Les composés polyphénoliques présenteront une activité antioxydante supérieure aux composés monophénoliques (**Cuvelier et al., 1992; Terao et al., 1993; Natella et al., 1999**).



Le second critère sera la présence ou non d'un méthoxyle sur le cycle. La présence d'un ou plusieurs méthoxyles substitués en *ortho* par rapport à un hydroxyle, va permettre d'augmenter l'activité d'une molécule. Cette substitution *ortho* par un groupement méthoxyle va permettre, grâce à sa propriété électrodonneur, d'augmenter la stabilité du radical aryloxy lors de l'oxydation de la molécule et donc d'augmenter son activité antioxydante (**Cuvelier et al., 1992; Terao et al., 1993; Natella et al., 1999**).



Enfin, les dérivés de l'acide cinnamique présentent une meilleure activité antioxydante que leurs homologues dérivés de l'acide benzoïque (Cuvelier *et al.*, 1992; Rice-Evans & Miller, 1996; Natella *et al.*, 1999). Cette différence d'activité serait due à la double liaison de la chaîne latérale des dérivés cinnamiques. Celle-ci aurait un effet stabilisateur du radical phénoxy par un phénomène de résonance (Natella *et al.*, 1999).



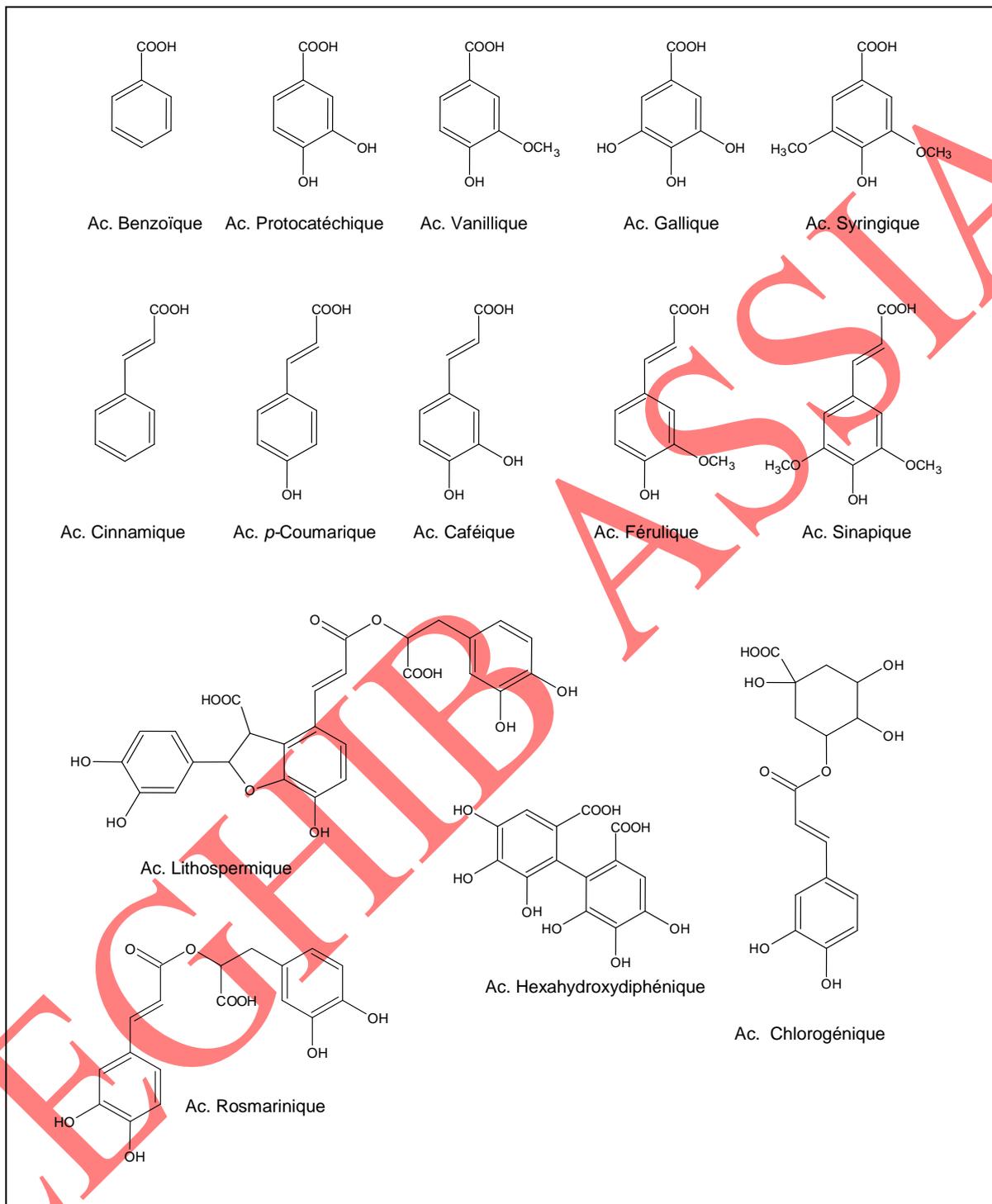


Figure 3 : Exemple de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique les plus courants.

III.1.3. Activités biologiques

Les acides phénoliques sont des composés connus pour leurs propriétés antioxydantes. Cette capacité à piéger les radicaux libres leur permet d'intervenir dans de nombreux phénomènes biologiques.

Certaines études ont montré que les propriétés antioxydantes de ces composés, permettent de protéger la cellule contre un stress oxydant. Des composés tels que l'acide gallique et l'acide protocatéchique (**Figure 3**), sont capables d'augmenter le taux de survie de cellules de peau soumises à un stress oxydant important (**Masaki et al., 1997**).

Plus généralement, ces composés sont non seulement capables d'inhiber l'oxydation de composés, tels que les protéines ou l'ADN, soumis à un stress oxydant (**Makris & Rossiter, 2001**) mais, aussi, d'inhiber la peroxydation lipidique. Cette capacité à inhiber la peroxydation lipidique a été plusieurs fois démontrée *in vitro* sur des LDL humains isolés. Ainsi, les acides phénoliques, qu'ils soient dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique, sont capables de diminuer la sensibilité de ces structures complexes vis-à-vis d'un stress oxydant (**Laranjinha et al., 1994; Nardini et al., 1995**). Ces phénomènes observés *in vitro* ont pu être confirmés *in vivo*. Ainsi, une étude réalisée sur les rats, montre que le fait d'ajouter à leur nourriture de l'acide caféique, pendant 6 semaines, a permis d'augmenter la résistance de leurs LDL à un stress oxydant, par rapport au groupe témoin (**Nardini et al., 1997**). Par ailleurs, il a été constaté qu'avec ce régime alimentaire, il y a une augmentation du taux d' α -tocophérol dans le plasma et les LDL de ces animaux.

Les acides phénoliques ne sont pas seulement connus pour leur activité antioxydante. Des études ont montré qu'ils présentent également des activités anti-inflammatoire et anti-carcinogène. Certains acides phénoliques, particulièrement l'acide caféique, exerçaient une activité anti-inflammatoire en inhibant, de manière spécifique, la synthèse des leucotriènes (**Koshihara et al., 1984**). Ces composés, impliqués dans l'initiation des phénomènes inflammatoires, sont synthétisés à partir d'un lipide membranaire particulier, l'acide arachidonique. L'acide caféique bloque la synthèse de ces composés en inhibant de manière spécifique l'enzyme responsable de leur biosynthèse, la 5-lipoxygénase.

L'activité anti-carcinogène des acides phénoliques a été démontrée, à plusieurs reprises, lors d'études réalisées *in vitro* et *in vivo*. Une de ces études a montré que l'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque), administré oralement, peut diminuer le

pouvoir carcinogène qu'exerce le diéthylnitrosamine sur les cellules hépatiques de rat (Tanaka *et al.*, 1993).

III.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, au sens large, sont des pigments quasiment universels des végétaux (Rice-Evans & Miller, 1996). Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. Plus ou moins hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas notamment des flavonoïdes jaunes dont font partie les chalcones, les aurones et les flavonols jaunes, mais aussi, des anthocyanosides qui peuvent être de couleur rouge, bleue ou violette. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration en jouant le rôle de co-pigments. Ces co-pigments sont notamment des flavones ainsi que des flavonols incolores. Certaines de ces molécules absorbent dans une zone proche de l'ultraviolet. La « coloration » de ces molécules n'est alors perçue que par les insectes qui, étant attirés par ces couleurs, vont permettre la pollinisation des végétaux et assurer ainsi la survie de l'espèce.

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, au niveau desquelles ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire.

III.2.1. Structure de base

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure 4).

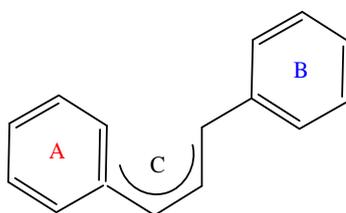


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.

Les diverses classes de flavonoïdes (Figure 5), diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, alors que les composés individuels au sein d'une classe, diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes

de flavonoïdes présentées, nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (**Harborne, 1988**).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles peuvent être méthylés, acétylés, phénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme *C*- ou *O*-glycolysés; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les *O*-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les *C*-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C₆ et/ou C₈. La formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s), est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (**Bruneton, 1999**).

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le *D*-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant. D'autres hexoses (le *D*-galactose et le *D*-mannose) ainsi que des pentoses (le *D*-xylose, le *L*-arabinose et le *D*-apiose), sont fréquents avec le *L*-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide *D*-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent, à leur tour, être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (**Hollman & Arts, 2000**).

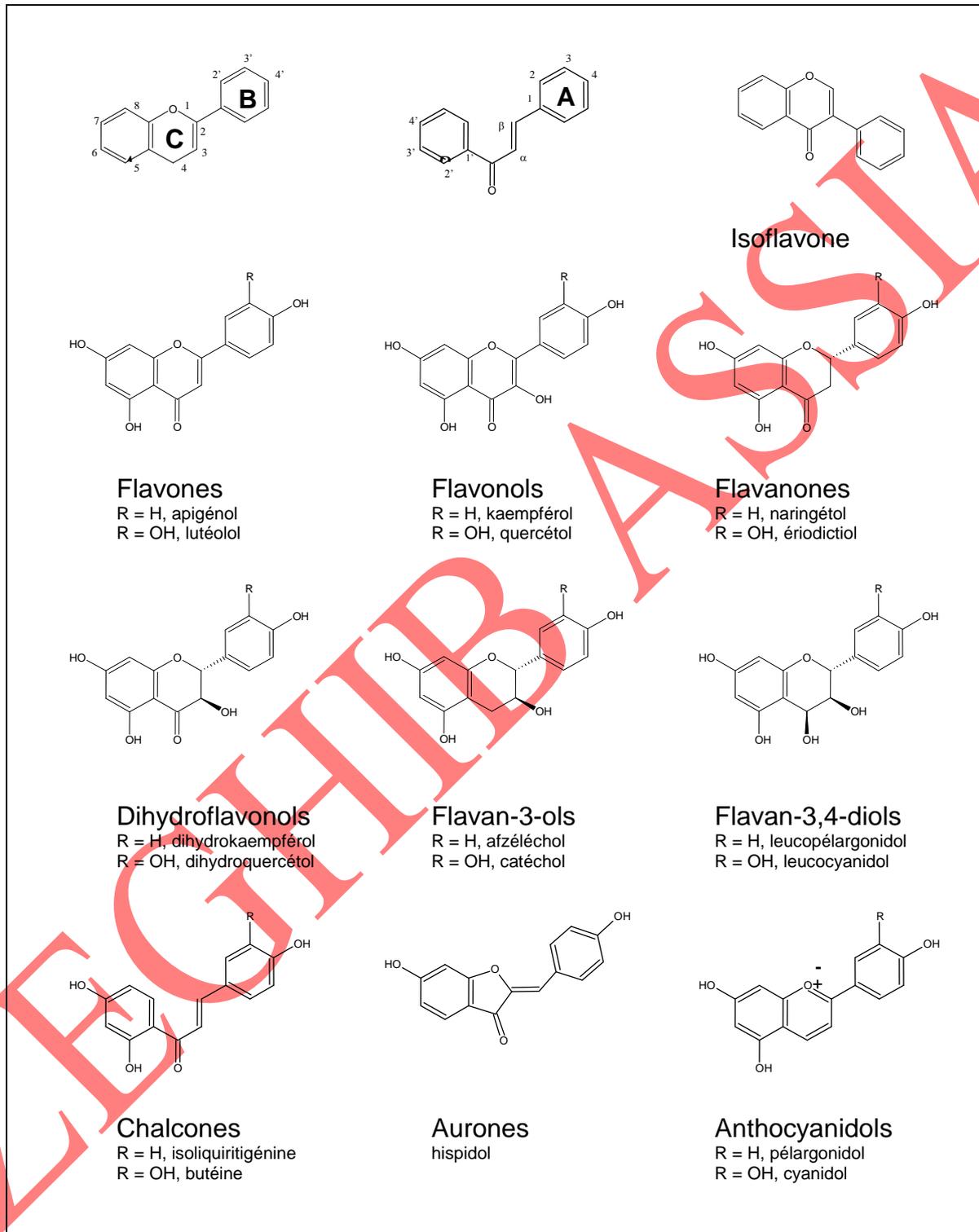


Figure 5 : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes.

III.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Malgré leur diversité structurale importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie biosynthétique commune.

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonoïque est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate, à partir de malonyl-CoA, avec la 4-coumaroyl-CoA, pour donner l'intermédiaire en C₁₅, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (Richter, 1993). Cette chalcone peut être obtenue par la voie de shikimate et elle est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des différentes classes de flavonoïdes (Figure 6).

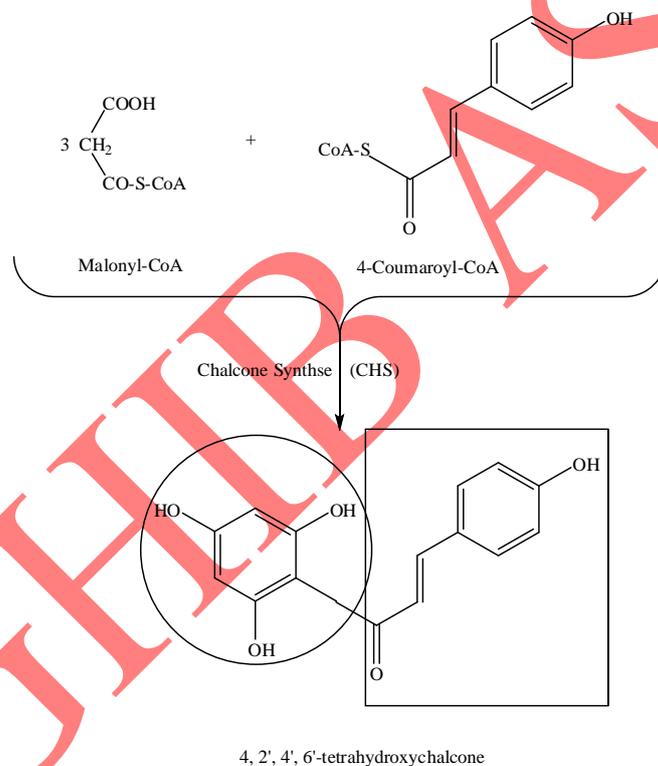


Figure 6 : Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.

La biosynthèse (Figure 7) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' - tétrahydroxychalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3) : (2R, 3R)- dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment,

la première introduit la double liaison entre les carbones C₂ et C₃, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C₃. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-O-glucoside (**Bruneton, 1999**).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C₃ intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

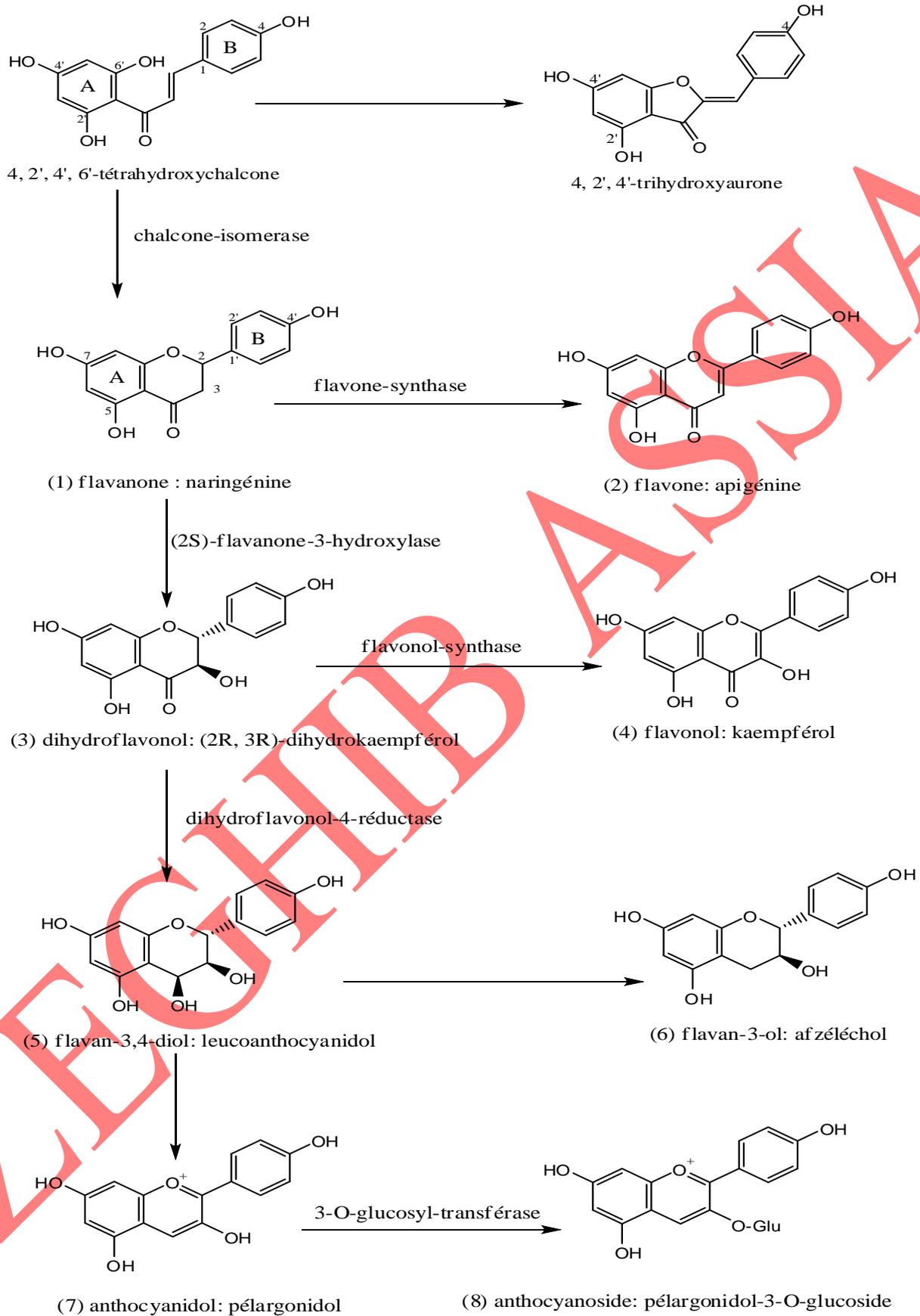


Figure 7 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

III.2.3. Relation structure-activité antioxydante

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (Van Acker *et al.*, 1996; Aliaga & Lissi, 2004) (Figure 8). Il s'agit de :

- La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B.

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en *ortho* de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

- La présence de la fonction 4-one dans le cycle C.

La double liaison entre C₂ et C₃ et la fonction carbonyle en C₄, permettent une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

- La présence de groupement hydroxyle en position 3 sur le cycle C.

La présence d'un groupement hydroxyle en position 3, renforce les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut, aussi, contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones (Heim *et al.*, 2002). La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués.

Le critère dominant permettant l'activité antiradicalaire de ce type de molécules reste, toutefois, la présence de la double liaison 2-3 couplée à la fonction 4-one sur le cycle C.

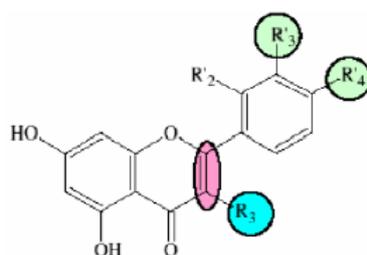


Figure 8 : Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.

III.2.4. Activités biologiques

Les flavonoïdes ne sont pas seulement des composés capables de piéger les radicaux libres, ils présentent aussi des propriétés anti-carcinogènes, œstrogéniques, inhibitrices de certaines enzymes et anti-microbiennes. En fait, les propriétés biologiques attribuées à ces composés sont pratiquement les mêmes que celles attribuées aux acides phénoliques. Ceci se conçoit aisément, puisque les propriétés de ces composés sont principalement attribuées à la présence, dans ces molécules, d'un ou plusieurs cycles aromatique hydroxylés.

Une étude épidémiologique hollandaise a démontré que le risque de développer des maladies cardio-vasculaires, chez des sujets masculins d'âge moyen, est inversement proportionnel à la quantité journalière de flavonoïdes qu'ils consomment (**Hertog et al., 1993**). Ils seraient impliqués dans la prévention de l'athérosclérose, qui est responsable de nombreux problèmes, principalement, coronaires et cérébraux. La probabilité que ces composés puissent jouer un rôle préventif dans ce type de maladie, est renforcée par le fait que ces composés sont connus pour avoir un effet inhibiteur de l'oxydation des LDL. On sait que la quercétine est capable de limiter l'oxydation de LDL humains soumis à un stress oxydant (**Lebeau et al., 2000**).

Malgré les incertitudes qui planent sur l'effet réel qu'exerceraient ces molécules sur l'organisme, de nombreuses études nous permettent d'être plus affirmatif quant à leur efficacité sur des systèmes biologiques plus restreints.

De très nombreuses études ont signalé la capacité des flavonoïdes à neutraliser les radicaux libres. Ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) générés par la réaction de Fenton ainsi que le radical stable DPPH (**Gao et al., 1999; Guo et al., 1999**). Ils piègent également les radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) issus du système xanthine/xanthine oxydase (**Cos et al., 1998**).

Les flavonoïdes sont aussi efficaces dans des systèmes plus « biologiques ». Ils sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique induite par différents systèmes générateurs (Fe^{2+} -ascorbate, Fe^{3+} -ADP/NADPH) sur des microsomes (**Rodriguez et al., 2001**). Mais aussi de prévenir l'oxydation des protéines et de l'ADN soumis à un stress oxydant (**Makris & Rossiter, 2001**).

D'autres études ont permis de démontrer que ces composés sont, aussi, capables d'exercer leur effet protecteur de manière plus globale sur la cellule, lorsque celle-ci est soumise à un stress oxydant. C'est le cas des neuroblastes soumis à un stress oxydant généré

par le peroxyde d'hydrogène (**Gao et al., 1999**) ou des cellules de rétine de poulet stressées par le système Fer (II)/ascorbate (**Areias et al., 2001**).

Les isoflavonoïdes (qui ne font pas partie des flavonoïdes au sens strict) tels que la daidzéine (7,4'-dihydroxyisoflavone), la génistéine (5,7,4'-trihydroxyisoflavone) et leurs dérivés glycosylés, présentent une activité œstrogénique (**Le Bail et al., 2000**). Ces composés sont capables de se fixer sur les récepteurs et de déclencher une activité œstrogénique, généralement faible. Ce type d'activité se retrouve également pour les chalcones (**Calliste et al., 2001**).

Les isoflavonoïdes présentent aussi une activité anti-tumorale. Ils sont actifs au niveau de la cancérogenèse mammaire et prostatique. Ils possèdent aussi une activité antioxydante non négligeable bien que celle-ci soit en général inférieure à celle des flavonoïdes.

Une étude récente réalisée sur des lymphocytes humains, a montré que la génistéine diminue les lésions occasionnées par le peroxyde d'hydrogène sur l'ADN de ces cellules. Ce composé agit à des concentrations physiologiques et inférieures à celles de l'acide ascorbique ou de l' α -tocophérol (**Coward et al., 1993; Sierens et al., 2001**).

Les flavonoïdes ont également un effet potentialisateur de la vitamine C. Ils auraient pour rôle d'éviter l'oxydation de la vitamine C par les métaux, tels que le fer ou le cuivre, et pourraient aussi avoir pour rôle de régénérer la vitamine C oxydée. Le mécanisme exact par lequel les flavonoïdes interagissent avec l'acide ascorbique n'a pas été clairement identifié, mais on sait, qu'*in vitro*, les flavonoïdes ont la capacité de retarder considérablement son oxydation (**Kandaswami & Middleton, 1994**).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes interviennent dans la défense des plantes, comme agents protecteurs contre les invasions microbiennes (**Harborne, 1985; Cowan, 1999**). Certaines études ont étendu cet effet à une activité antifongique (**Gafner et al., 1996**). Par ailleurs, beaucoup d'isoflavonoïdes sont considérés comme des phytoalexines, connues pour leur réponse à l'attaque microbienne (**Dixon, 2004**).

Chapitre 3

Aperçu bibliographique sur les huiles essentielles

Le genre *Thymus* fait partie des plantes aromatiques et est riche en huiles essentielles qui lui confèrent une grande variété d'activités biologiques.

Les végétaux fabriquent leurs huiles essentielles pour se réparer, attirer les insectes pollinisateurs, se protéger du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, ou encore à guérir blessures et attaques diverses.

Les huiles essentielles contiennent des corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs telles que l'huile de tournesol, l'huile de maïs, l'huile d'amande douce, etc.... Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et d'épices, sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles (**Garnero, 1996; AFNOR, 2000**). Elles sont généralement présentes à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Elles sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques. L'huile, ainsi, obtenue possède certaines caractéristiques physico-chimiques qu'il est possible de mesurer, au laboratoire, à l'aide de techniques simples ou d'appareillages plus complexes.

Les huiles essentielles doivent répondre à des critères physiques imposés par les normes. En effet, elles sont liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, rarement colorées, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage. Elles sont peu polaires, et il convient de les conserver à l'abri de l'air et de la lumière (**Durvelle, 1893; Durvelle, 1930**).

Ce chapitre présente un aperçu bibliographique sur les huiles essentielles.

I. Définition

La norme AFNOR NF T-75-006 définit l'huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est alors séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

II. Répartition

Les huiles essentielles sont presque exclusives de l'embranchement des spermaphytes, elles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres qui sont capables d'élaborer ces principes volatils sont répartis sur presque une soixantaine de familles

(Benyahia, 2006). Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Lamiaceae (Katsiotis et al., 1990; Lorenzo et al., 2002; Amarti et al., 2010), les Asteraceae (Gazim et al., 2008), les Lauraceae (Chaverri & Ciccio, 2005) et les Apiaceae (Djarri et al., 2006; Oroojaliana et al., 2010).

III. Localisation

Les huiles essentielles peuvent être localisées dans tous les organes végétaux : fleurs (*Ferulago angulata*) (Akhlaghi, 2008), feuilles (*Torilis arvensis*) (Saad et al., 1995) et bien que cela semble peu commun, dans : les racines (*Heracleum persicum*) (Mojab & Nickavar, 2003), les rhizomes (*Zingiber officinale*) (Geiger, 2005), le bois (*Santalum album*) (Howes et al., 2004), les écorces (*Cinnamomum verum*) (Jham et al., 2005), les fruits (*Daucus carota*) (Glisic et al., 2007) ou les graines (*Daucus carota*) (Özcan & Chalchat, 2007).

Si tous les organes d'une même espèce renferment une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (Bruneton, 2009).

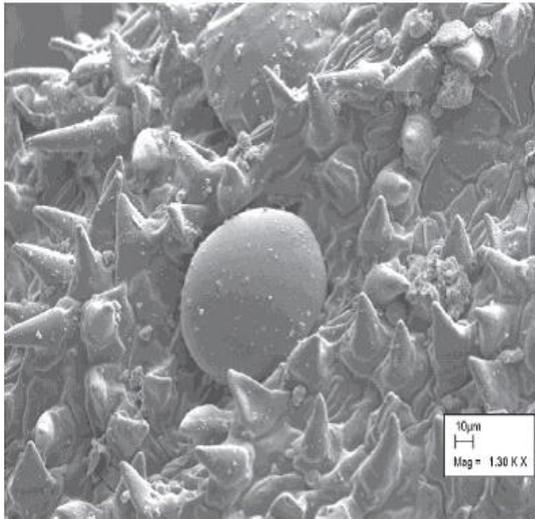
IV. Origine dans les végétaux

Dans la plus part des cas, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules, où elles se rassemblent en gouttelettes, comme la plupart des substances lipophiles, ou bien elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales. Selon les périodes, ces essences traversent la paroi cellulaire vers l'extérieur de la cuticule sous forme de vapeurs.

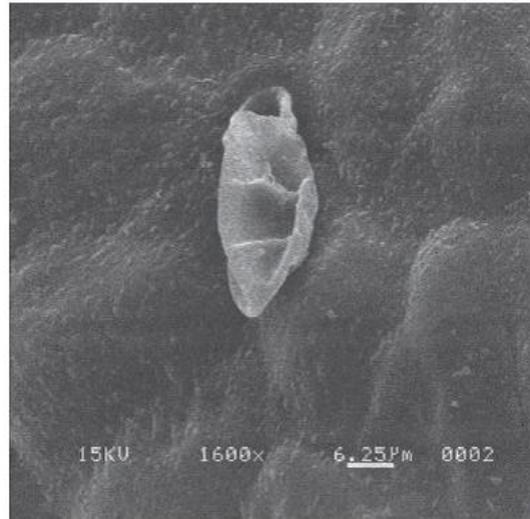
Considérées comme des produits du métabolisme secondaire des plantes (Hatanaka et al., 1987), les huiles essentielles sont produites et stockées dans des structures cellulaires spécialisées, qui sont divisées en deux groupes (Svoboda, 2000):

- Celles qui produisent l'huile essentielle sur la surface de la plante et qui sécrètent habituellement des substances directement à l'extérieur de la plante (sécrétion exogène).
- Celles qui produisent les huiles essentielles dans le corps de la plante et sécrètent ces substances dans les espaces intercellulaires spécialisés (sécrétion endogène).

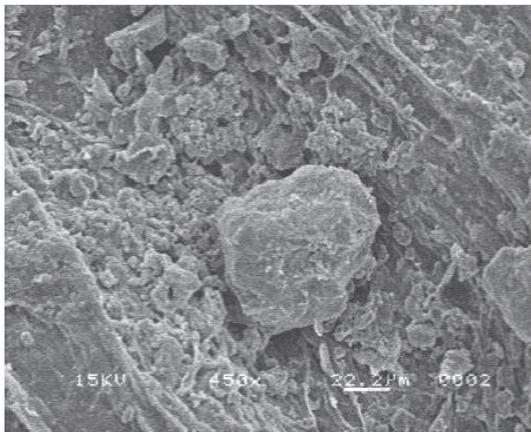
La Figure 9 illustre la localisation des structures sécrétrices d'huile essentielle pour quelques plantes aromatiques (Loupy, 2006).



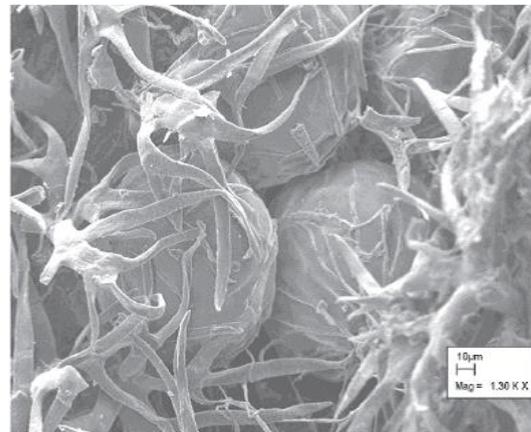
Thym



Menthe



Carvi



Lavande

Figure 9 : Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques (Loupy, 2006).

V. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants hétérogènes. Ces constituants appartiennent, de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpénoïdes, d'une part, et le groupe des aromatiques et des aliphatiques (alcane, alcène, alcénol, phénol etc...), de l'autre.

Dans chaque groupe de terpènes, un précurseur unique conduit aux différents constituants connus, par une succession de réactions classiques (Kurt & Torsell, 1998). Les plus connus de ces produits sont les monoterpènes qui répondent à la formule brute ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) et les diterpènes ($C_{20}H_{32}$).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes se retrouvent, presque toujours, dans les huiles essentielles sous forme acyclique, monocyclique ou bicyclique avec l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, peroxydes).

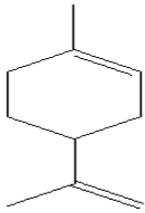
Du fait que les terpènes proviennent de l'isoprène, ils sont également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Plus strictement, le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène.

La **Figure 10** montre des exemples de structures de terpènes.

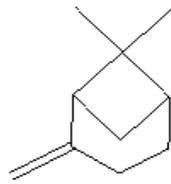
ZEGHIB ASSIA

Monoterpènes

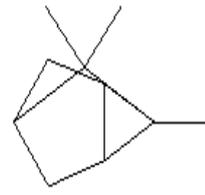
Hydrocarbures



Limonène
Odeur fraîche
rappelant l'orange

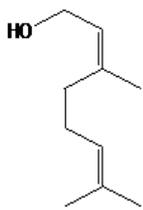


α-pinène
Odeur de pin

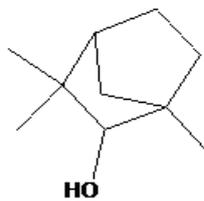


Tricyclène
Présent dans beaucoup
d'huiles essentielles

Alcools

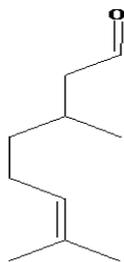


Nérol
Odeur agréable de rose

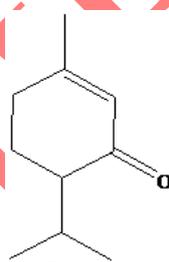


Endo-fenchol

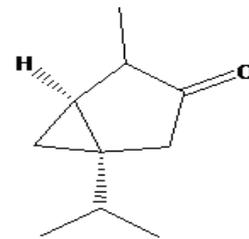
Aldéhydes et cétones



Citronellal
Odeur fraîche
de citronnelle

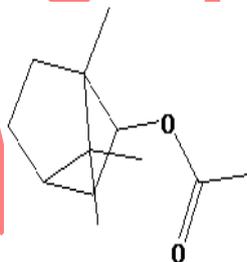


Pipéritone
Odeur de menthe
poivrée

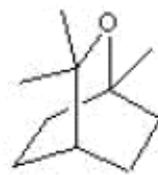


Cis-Thujone

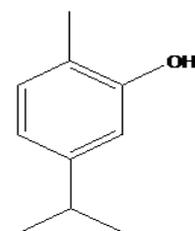
Esters, éthers et phénols



Acétate de Bornyle



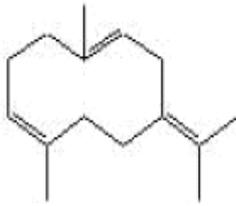
1,8-cinéole
Odeur typique de
l'*Eucalyptus globulus*



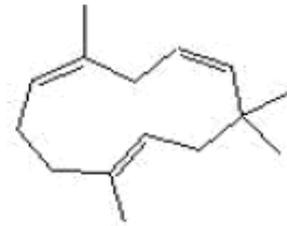
Carvacrol
odeur de thymol présent
dans certains origans

Sesquiterpènes

Hydrocarbures

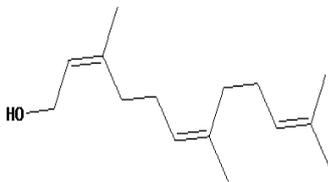


Germacrène B

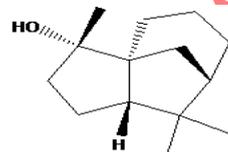


α -Humulène

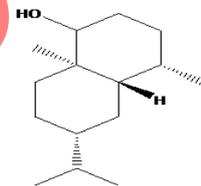
Alcools



Cis-Cis-Farnésol



Cédranol



Eudesmol

Figure 10 : Exemples de structures de terpènes.

VI. Rôle des huiles essentielles

Les terpènes avec les flavonoïdes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux. Les huiles essentielles, qui sont principalement composées de terpènes, n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs et sont stockées dans toutes les parties (fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, fruits et graines).

Les rôles biologiques des terpènes et des huiles essentielles sont souvent obscurs. Il est, toutefois, vraisemblable qu'ils jouent un rôle écologique dans les interactions : végétal-végétal, végétal-animal et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs (**Bruneton, 2009**).

En effet, les huiles essentielles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et les insectes responsables de la pollinisation (**Ricciardelli d'Albore, 1986**),

protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes.

Pour les plantes désertiques, l'utilité des huiles essentielles a été rattachée à la conservation de l'humidité indispensable à la vie des plantes. Exposées à des climats désertiques, les vapeurs aromatiques ont pour propriété de saturer l'air autour de la plante, empêchant la température de l'air de monter le jour et de baisser la nuit, de façon excessive jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale.

Elles peuvent aussi servir de solvants bioactifs pour les composés lipophiles (Hay-Robert, 1993).

VII. Domaines d'utilisation

VII.1. Phytothérapie

Le terme d'aromathérapie apparaît en 1937 (Gattefossé, 1937). C'est une branche de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles pour traiter un certain nombre de maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux).

Plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants en médecine dentaire, dans la désinfection de la pulpe dentaire ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Sourai, 1989; Kato et al., 1990; Schwartz & Hilton, 1992). La listerine, qui est une solution constituée d'huile essentielle, de thymol et d'eucalyptol, possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato et al., 1990).

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de thym et ses constituants actifs, a été mis en évidence pour *Salmonella thyphimurum* (Juven et al., 1994).

L'effet antiviral de l'huile essentielle d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex, a été montré par une étude *in vitro* (Siddiqui et al., 1996).

L'huile essentielle des feuilles de la Menthe poivrée (*Mentha piperita*) lui confère un grand pouvoir calmant des spasmes intestinaux.

Des études très récentes ont montré que le géraniol a une action sur les cellules cancéreuses du colon (Carneseccchi et al., 2001), en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence (Siani et al., 1999).

VII.2. Utilisation en aéro-ionisation

Dans les locaux, l'atmosphère peut être aseptisée avec un ionisateur d'huile essentielle. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère (**Taldykin, 1979; Makarchuk et al., 1981; Inyoue et al., 1983**).

VII.3. Parfumerie et cosmétologie

Dans ce domaine, les huiles essentielles semblent reprendre actuellement le dessus sur les produits de synthèse classiques.

Le cinéole, par exemple, entre dans la fabrication des savons de toilette, des aérosols et des lotions désodorisantes (**Borris, 1996**). De même, **Beylier-Maurel (1976)** a réuni une vingtaine de composés bactériostatiques en formulation harmonieuse de point de vue olfactif. Elle a aussi démontré la grande activité de l'huile essentielle de bois de Santal, sur la microflore de la peau, d'où son utilisation en cosmétique. Des usages similaires ont été réalisés avec les essences de Camomille (**Schilcher, 1985**).

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels, permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (**Maruzzella, 1962; Roulier, 1992; Vargas et al., 1999**).

VII.4. Conservation des denrées alimentaires

La préservation des produits alimentaires à caractère périssable, constitue un des domaines d'utilisation des plantes aromatiques et médicinales.

La lutte contre les champignons toxigènes est l'un des objectifs de cette conservation. En effet, ces micro-organismes élaborent des substances toxiques, les aflatoxines, les ochratoxines et les zéaralenones, réputés pour leurs effets hépatotoxique et cancérigène (**Hitokoto et al., 1980; Tantaoui-Elaraki & Beraoud, 1994; Fan & Chen, 1999**).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques, ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (**Hitokoto et al., 1978; Beraoud et al., 1991; Lachowicz et al., 1998; Arora & Kaur, 1999**). La quantité d'épices et d'aromates habituellement utilisés étant faible, leur pouvoir antimicrobien semble synergique (**Beuchat, 1976; Madhyasta & Bhat, 1984; Bilgrami et al., 1992**).

Le carvacrol, un des constituants chimiques des huiles essentielles qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (**Hammer et al., 1999**). Il y est rajouté pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (**Busta & Foegeding, 1980; Hitokoto et al., 1980**).

L'eugénol et le cinnamaldéhyde, extraits à partir d'huile essentielle du *Cinnamum*, comptent parmi les principaux agents de conservation alimentaire, d'origine végétale. Ils sont employés comme additifs pour la préservation des olives de table contre la flore cryptogamique (**Kiwank & Akgul, 1990; Wild, 1994**).

VIII. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Il semblerait que ce sont les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4 000 ans, qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. De petits vases ayant semble-t-il contenus des essences et parfums, ont été retrouvés dans les sarcophages des rois.

Plus tard, la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, donna une grande impulsion à l'Art de la distillation, grâce à un éminent savant « Abu Ali al-Husayn ibn Abd Allah ibn Sina » (930-1037), connu en Occident sous le nom d'Avicenne, qui inventa autour de l'an 1000 l'alambic et, ainsi, l'extraction des huiles essentielles par distillation est née (**Zhiri, 2006**).

Grâce à la découverte de la distillation et à la compréhension des phénomènes qui la régissent, de nombreuses autres techniques d'extraction utilisant un chauffage, ont vu le jour. C'est ainsi que l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur furent utilisés pour extraire l'huile essentielle d'une grande partie de végétaux.

L'hydrodiffusion (une variante de l'entraînement à la vapeur), l'extraction par les fluides supercritiques et l'extraction aux micro-ondes, sont d'autres méthodes d'extraction des huiles essentielles.

Nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles des plantes de notre étude.

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (**AFNOR, 1992**). Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique.

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi, le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique, alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle).

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation (AFNOR, 1992).

Chapitre 4

**Méthodes d'étude des activités antioxydante,
antiproliférative, antibactérienne et antivirale**

Les composés phénoliques et les huiles essentielles confèrent aux plantes du genre *Thymus* leurs vertus pharmacodynamiques. Plusieurs méthodes existent pour étudier les activités biologiques de plantes médicinales.

Dans ce chapitre, nous décrivons les méthodes d'étude des activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale, déterminées pour les plantes de notre étude.

I. Méthodes d'études du piégeage des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques extrêmement réactives, qui sont produites et éliminées de manière continue par l'organisme. En cas de déséquilibre de la balance Production/Élimination de ces radicaux, on entre dans une phase dite de stress oxydant. L'implication du stress oxydant dans de nombreux processus pathologiques, a conduit la communauté scientifique à tenter d'étudier, en détail, les dommages causés par ces espèces chimiques mais, aussi, à rechercher des composés capables de piéger ces radicaux, afin de limiter leurs effets néfastes. Avant cette étape, il est nécessaire de « visualiser » ces radicaux, à la fois de manière qualitative et quantitative afin d'évaluer la capacité des antioxydants à les piéger.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydante de composés, parmi lesquelles la technique de **Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)** et le **Test de blanchissement du β -carotène**, que nous avons utilisé dans notre étude.

I.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La méthode de RPE est satisfaisante, spécialement lorsque des mécanismes radicalaires sont mis en jeu. En effet, l'analyse du spectre obtenu en RPE est spécifique du radical étudié (**Trouillas, 2003**).

Outre le fait qu'elle permet l'identification du radical étudié, la RPE a la capacité de détecter les radicaux libres dès les plus faibles concentrations (seuil de sensibilité $\sim 10^{-8}$ M). Sa précision en fait un des outils de choix pour l'étude de l'activité antioxydante de composés biologiques ou de molécules (**Rimbach et al., 1999**). Les mesures effectuées en RPE se basent sur deux techniques différentes, le « spin-labelling » et le « spin-trapping ». Dans notre étude, nous avons réalisé la première technique, dont le principe et le protocole expérimental sont présentés dans la partie Matériels & Méthodes.

I.2. Test de blanchissement du β -carotène

Les radicaux peroxydes, générés par l'oxydation de l'acide linoléique, oxydent le β carotène entraînant, ainsi, la disparition de sa couleur rouge. La présence d'un antioxydant, entraîne la neutralisation de ces radicaux prévenant, ainsi, l'oxydation et le blanchissement du β carotène (**Kartal et al., 2007**). Le protocole expérimental de cette méthode est présenté dans la partie Matériels & Méthodes.

II. Méthode d'étude de l'activité antiproliférative : Technique du MTT

Les années récentes ont vu une augmentation considérable des études concernant les effets des polyphénols sur différents types de cancers. Les composés phénoliques peuvent agir sur différents stades de développement de tumeurs malignes, en protégeant l'ADN des dommages oxydatifs. Ils inactivent les carcinogènes en inhibant l'expression des gènes mutagéniques; ils inactivent aussi les enzymes chargés de l'activation des procarcinogènes et activent les systèmes responsables de la détoxification des xénobiotiques (**Bravo, 1998**).

Le cancer de colon est la troisième cause de décès en USA, basé sur le rapport de 2009 de l' American Cancer Society, et le quatrième type de cancer le plus commun au monde (**Boyle & Langman, 2000**). La recherche de nouveaux anticancéreux d'origine végétale est la motivation de plusieurs chercheurs.

La technique du MTT est couramment utilisée pour déterminer la viabilité cellulaire de molécules ou d'extraits de plantes sur de nombreux types cellulaires (**Joshi et al., 2000; Shirataki et al., 2000**). Nous avons utilisé cette technique pour tester l'effet antiprolifératif de nos plantes d'étude sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29.

Le MTT (bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium), est un colorant pouvant être réduit à différents niveaux de la chaîne respiratoire (**Slater et al., 1963**). Le MTT a été utilisé notamment pour visualiser et quantifier l'activité des lactate et malate déshydrogénases (**Laycock et al., 1965; Kellen & Krcméry, 1966**), ainsi que l'activité de la succinate déshydrogénase (**Schanenstein & Hoffer-Bergthaler, 1972**). La réduction du MTT semble dépendre majoritairement de l'activité des déshydrogénases mitochondriales (**Mosmann, 1983**), mais aussi des activités des déshydrogénases cytoplasmiques étroitement associées à la glycolyse (**Vistica et al., 1991**). Ces caractéristiques ont été appliquées à l'étude de la prolifération cellulaire (**Green et al., 1984; Denizot & Lang, 1986; Gerlier & Thomasset 1986; Alley et al., 1988**). La réduction du MTT en formazan est habituellement analysée par colorimétrie dans des tests de viabilité (**Carmicheal et al., 1987; Pieters et al.,**

1991), en utilisant le protocole utilisé par Mosman en 1983. Le principe ainsi que le protocole expérimental de la technique du MTT, sont présentés dans la partie Matériels & Méthodes.

III. Evaluation de l'activité antibactérienne : Technique de diffusion en milieu gélosé (Méthode de Vincent)

La consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotiques, ont conduit à l'émergence de bactéries multirésistantes constituant, actuellement, un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème, sont sérieuses du fait que la plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves, sont de plus en plus difficiles à traiter (OMS, 2005).

Le recours aux ressources naturelles, en général, et aux plantes médicinales, en particulier, devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer, pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (Wright & Sutherland, 2007).

Parmi les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne d'une plante donnée (extrait ou huile essentielle), la technique de l'antibiogramme, utilisée pour tester les antibiotiques, est la plus couramment utilisée. Quand il s'agit de tester l'huile essentielle d'une plante donnée, on parle d'aromatogramme au lieu d'antibiogramme. En d'autres termes, l'aromatogramme est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (Girault & Bourgeon, 1971; Belaiche, 1979), permettant de mesurer in vitro leur pouvoir antibactérien.

Différents types d'aromatogrammes /antibiogrammes en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible. Ainsi, pour notre étude de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles essentielles de *Thymus*, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (Sacchetti et al., 2005; Celiktas et al., 2007) dont le protocole expérimental sont présentés dans la partie Matériels & Méthodes.

➤ **Technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme/aromatogramme) : Méthode de Vincent**

Elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Dayal & Purohit, 1971). Dans cette méthode, des disques de papier filtre imprégnés d'extrait ou d'huile essentielle de plantes, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé, en surface, d'une suspension bactérienne.

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de puits, à l'emporte pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. Le puits est rempli d'un volume donné d'extrait ou d'huile essentielle de plantes, qui va diffuser dans la gélose (Beylier-Maurel, 1976).

Dans l'une ou l'autre de ces deux variantes de cette technique, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne (en mm) après incubation à 37°C.

IV. Méthode d'étude de l'activité antivirale : Observation visuelle de l'Effet Cytopathogène (ECP)

La recherche de nouvelles substances naturelles, surtout d'origine végétale, à potentiel antiviral, est la motivation de nombreux chercheurs.

L'application thérapeutique à visée antivirale des polyphénols a été bien rapportée (Chattopadhyay & Naik, 2007; Chattopadhyay & Bhattacharya, 2008; Naithani et al., 2008). Le mécanisme antiviral de ces composés phénoliques pourrait être expliqué sur la base de leurs activités antioxydantes, capacités de piégeage, inhibition de la synthèse d'ADN/d'ARN, inhibition de l'entrée virale ou l'inhibition de la reproduction virale, etc (Chattopadhyay & Naik, 2007; Chattopadhyay & Khan, 2008; Naithani et al., 2008).

Les méthodes communes d'analyse de l'activité antivirale consistent en deux types de tests : indirects et directs. L'observation visuelle de l'Effet Cytopathogène (ECP) d'un virus est un test indirect permettant de déterminer si une substance naturelle donnée possède un effet antiviral. Ce test dont le protocole est détaillé dans la partie Matériels & Méthodes, a été réalisé dans notre étude pour déterminer le potentiel antiviral de nos plantes d'études.

Après culture cellulaire (monocouche de 18 h : 80-100% de confluence) dans des plaques 96 puits, les cellules sont infectées par le virus en présence ou en absence de drogues (extrait/huile essentielle). Le milieu de culture est drainé et chaque concentration du composé-test ou placebo, est ajoutée avant ou après infection des cellules en culture par le virus.

La plaque 96 puits est fermée et incubée pendant une période de temps standard, requise pour induire presque un ECP viral maximal. Après chaque 24h jusqu'à la fin de l'expérience, la plaque 96 puits est visualisée à l'aide d'un microscope pour voir s'il y'a des changements dans l'apparence de la cellule, par comparaison aussi bien aux cellules contrôles normales non infectées (Témoin négatif) qu'aux cellules infectées par le virus sans présence de drogue (Témoin positif).

Une désignation conforme au degré de cytotoxicité observée, est donnée à ces changements : T (100% toxic), PVH (partially toxic - very heavy - 80%), PH (partially toxic – heavy - 60%), P (partially toxic - 40%), PS (partially toxic - slight - 20%), ou 0 (no toxicity - 0%) (Chattopadhyay *et al.*, 2009).

ZEGHIB ASSIA

MATERIEL & METHODES

ZEGHIB MASSIA

I. Matériel végétal et réalisation des différents extraits, fractions et huiles essentielles

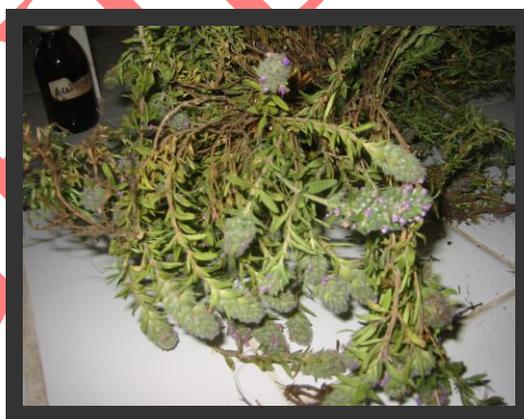
I.1. Matériel végétal

I.1.1. Espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T*)

L'identification des espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T*) a été faite par le professeur Gérard De Belair (Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar d'Annaba, ALGERIE). Des échantillons de référence ont été déposés au Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Université de Constantine 1, ALGERIE.

I.1.1.1. *T. numidicus* (Poiret)

L'espèce *T. numidicus* (Poiret) (cf. photo) a été récoltée dans le lieu dit Djebel El Ouahch (Constantine, Est Algérien). Vu ses activités biologiques intéressantes, comme il sera démontré ultérieurement pour les extraits, deux récoltes ont été faites pour *T. numidicus*, en mois de Mai de 2007 et de 2010. Une fois séchée dans un endroit sec, à l'abri de la lumière directe du soleil, puis broyée, nous avons obtenu 3,5 Kg de *T. numidicus*. Une autre collecte de *T. numidicus* a été faite en Mai 2012 et a été utilisée à l'état frais pour la réalisation d'huile essentielle.



T. numidicus Poiret

T. numidicus Poiret : Tiges érigées, plante buissonnante, feuilles en général lancéolées, 2-5 fois plus longues que larges, feuilles florales nettement plus larges, fleurs roses sessiles ou presque (Quezel & Santa, 1963).

I.1.1.2. *T. ciliatus* Desf.

L'espèce *T. ciliatus* Desf. (cf. photo) a été récoltée en Mai 2010 à Bir Echouhada (Oum El Bouaghi, Est Algérien) et ce pour l'étude des extraits. La plante a été séchée dans un

endroit sec, à l'abri de la lumière directe du soleil, puis a été broyée fournissant, ainsi, 574,77 g de matière végétale.



***T. ciliatus* Desf.**

***T. ciliatus* Desf.** : Feuilles florales différentes des feuilles caulinaires en général fortement dilatées à leur portion inférieure, épis florifères larges de 16-20 mm, fleurs très grandes, rouges ou violacées, dépassant 1cm de long (Quezel & Santa, 1963).

I.1.1.3. *T. guyonii* de Noé

***T. guyonii* de Noé** (cf. photo) a été récolté à Msila (Sud Centre Algérien), en Mai 2010. Il a été broyé avant utilisation après séchage dans un endroit sec, à l'abri de la lumière directe du soleil (1Kg).



***T. guyonii* de Noé**

***T. guyonii* de Noé** : Feuilles de 5-7 mm, ovoïdes, tout au plus 2 fois plus longues que larges. Calice glabre. Fleurs blanches petites (5-6 mm), en inflorescences courtes (1-2 cm). Tiges prostrées rampantes (Quezel & Santa, 1963).

I.1.1.4. *T. hirtus* Willd.

L'espèce *T. hirtus* Willd. (cf. photo) a été récoltée en Mai 2010 à Bekira (Constantine, Est Algérien) et a été utilisée à l'état frais pour la réalisation d'huile essentielle.



***T. hirtus* Willd.**

T. hirtus Willd. : Pédicelles bien plus courts que le calice. Feuilles florales plus courtes que les fleurs. Plante basse, diffuse, peu hispide, à fleurs pâles (Quezel & Santa, 1963).

I.1.2. *T. vulgaris* (Thym commun)

T. vulgaris a été fourni par IPHYM – PHARMA & PLANTES 01700 BEYNOST sous forme sèche (quantité de 1Kg).



T. vulgaris

T. vulgaris : Sous arbrisseau de 10 à 30 cm, vivace. Très aromatique. Tige ligneuse tortueuse, rameaux ascendants. Feuille petite, opposée, lancéolée ou linéaire, enroulée sur les bords. Fleurs roses ou blanchâtres, bilabiées d'un 1/2 cm, groupées en glomérule formant une sorte d'épi plus ou moins serré (*Phytothérapie & Aromathérapie*).

I.2. Réalisation des différents extraits, fractions et huiles essentielles

I.2.1. Réalisation des extraits de *Thymus*

Les trois espèces endémiques Algériennes de *Thymus*, *T. numidicus* (*Tn*), *T. ciliatus* (*Tc*) et *T. guyonii* (*Tg*), ainsi que l'espèce de référence *T. vulgaris* (*Tv*), ont été extraites en utilisant des solvants de polarité croissante : éther de pétrole (**EP**), dichlorométhane (**DM**), acétate d'éthyle (**AE**), méthanol (**ME**) et eau distillée (**Aq**). Chaque extraction a été effectuée avec 250 mL de solvant pour 25g de plante, pendant 24 heures à température ambiante ($\times 2$). Les extraits (**E**) obtenus à partir des plantes ont été évaporés à sec. La procédure d'extraction est détaillée dans la **Figure 11**.

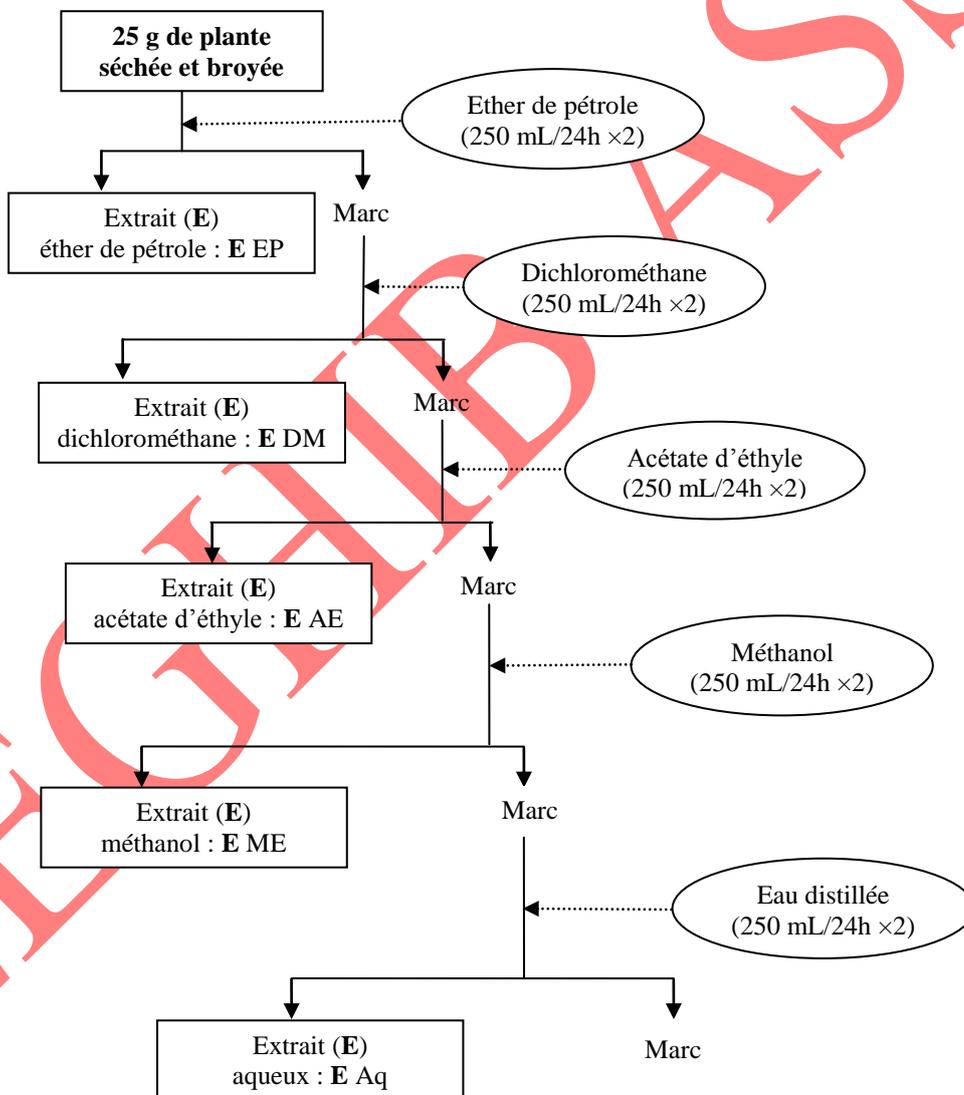


Figure 11 : Diagramme d'obtention des différents extraits de polarité croissante des quatre espèces de *Thymus*.

Les masses des différents extraits de *Thymus* obtenus via le protocole décrit, sont présentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Récapitulatif des masses (g) obtenues des différents extraits (E) de *Thymus*.

	Masse (g)			
	E Tn	E Tg	E Tc	E Tv
EP	0,3	0,3	0,2	0,4
DM	0,8	0,4	0,9	0,9
AE	0,3	0,2	0,1	0,3
ME	2,0	2,8	0,7	2,8
Aq	2,6	3,8	2,1	5,1

Les activités antioxydante et antiproliférative ont été testées pour tous ces extraits. Les résultats sont présentés dans la suite de ce travail.

I.2.2. Extraction de *T. numidicus* à plus grande échelle

Le bioguidage nous ayant permis de mettre en évidence le potentiel du *T. numidicus*, nous avons réalisé une seconde extraction à partir de 500 g de plante broyée. Le protocole utilisé dans la section (I.2.1) a été adapté et il est détaillé dans la **Figure 12**.

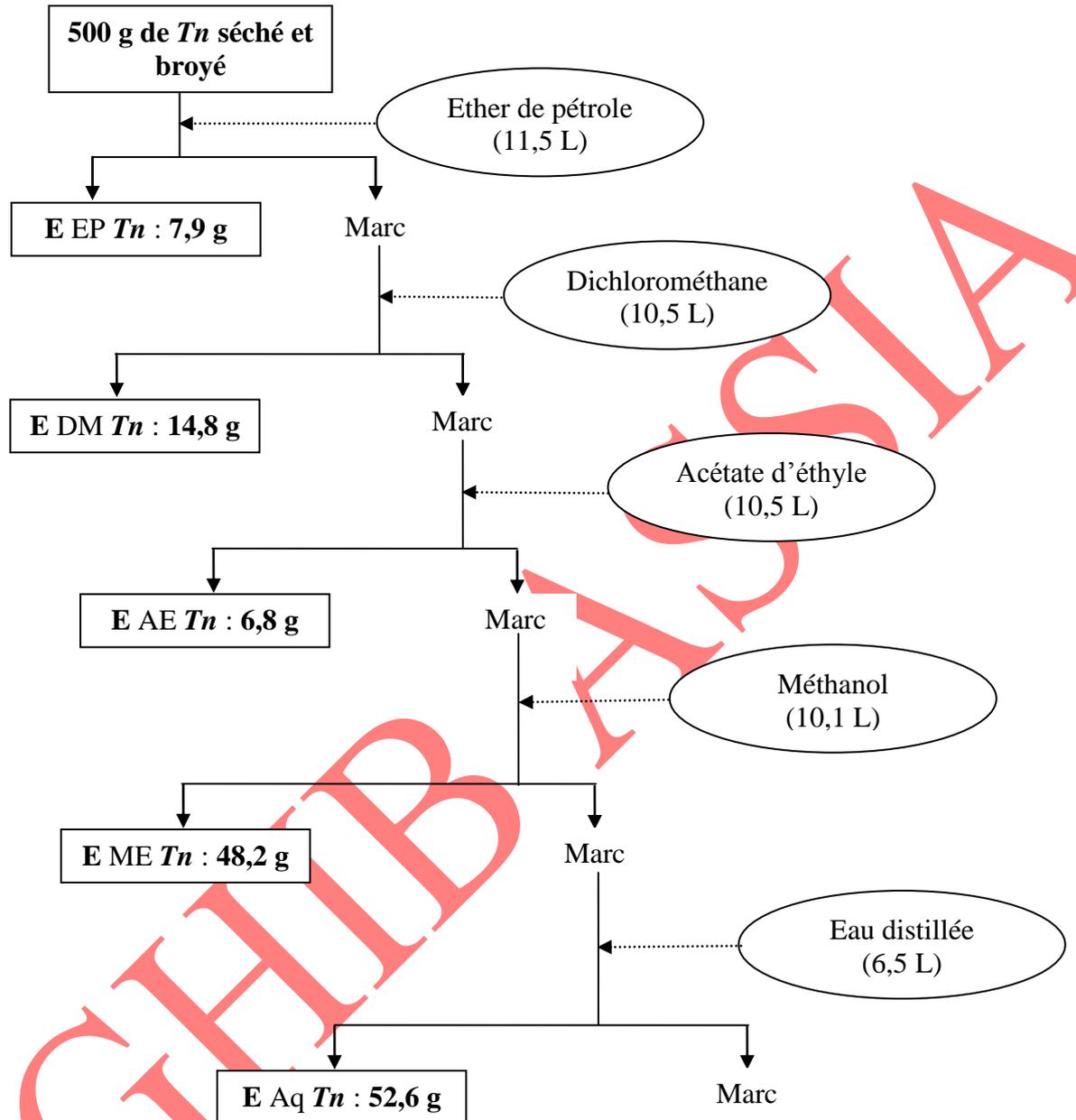


Figure 12 : Diagramme d'obtention des **différents extraits** de polarité croissante de *T. numidicus*.

Les masses et les rendements des extraits issus de cette extraction sont présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Masses et rendements (%) des différents extraits (**E**) de *T. numidicus* (**Tn**).

Extraits de <i>T. numidicus</i>	Masse (g)	Rendt. (%)
E EP Tn	7,9	1,58
E DM Tn	14,8	2,96
E AE Tn	6,8	1,36
E ME Tn	48,2	9,64
E Aq Tn	52,6	10,52

Rendt. : Rendement

I.2.3. Extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus*

2 Kg de matière végétale (parties aériennes broyées), ont subi une macération dans un mélange de solvants Ethanol/Eau distillée : 80/20 (v/v) pendant 48 heures, à température ambiante ($\times 4$); le volume total de solvants utilisés est de 23 L. Les macérats ont été filtrés et évaporés à sec. Nous avons obtenu 373 g d'extrait hydro-éthanolique (18,65 %). Ce dernier a été repris dans l'eau distillée (1L) puis filtré. Une partie de cet extrait hydro-éthanolique (50g) a été évaporée à sec et constitue l'extrait de référence appelé **E Et Tn**. Le reste (323 g) a subi une extraction liquide-liquide, dans une ampoule à décanter de 2L, avec des solvants de polarité croissante : éther de pétrole (**EP**), dichlorométhane (**DM**), acétate d'éthyle (**AE**) et *n*-butanol (**Bu**). Les 4 fractions (**F EP Tn**, **F DM Tn**, **F AE Tn**, **F Bu Tn**), ainsi que la phase aqueuse restante en fin d'extraction (fraction **F Aq Tn**) ont été évaporées à sec puis pesées. Le protocole d'obtention des fractions de *T. numidicus* ainsi que les masses correspondantes sont présentées dans la **Figure 13** et le **Tableau 7**, respectivement.

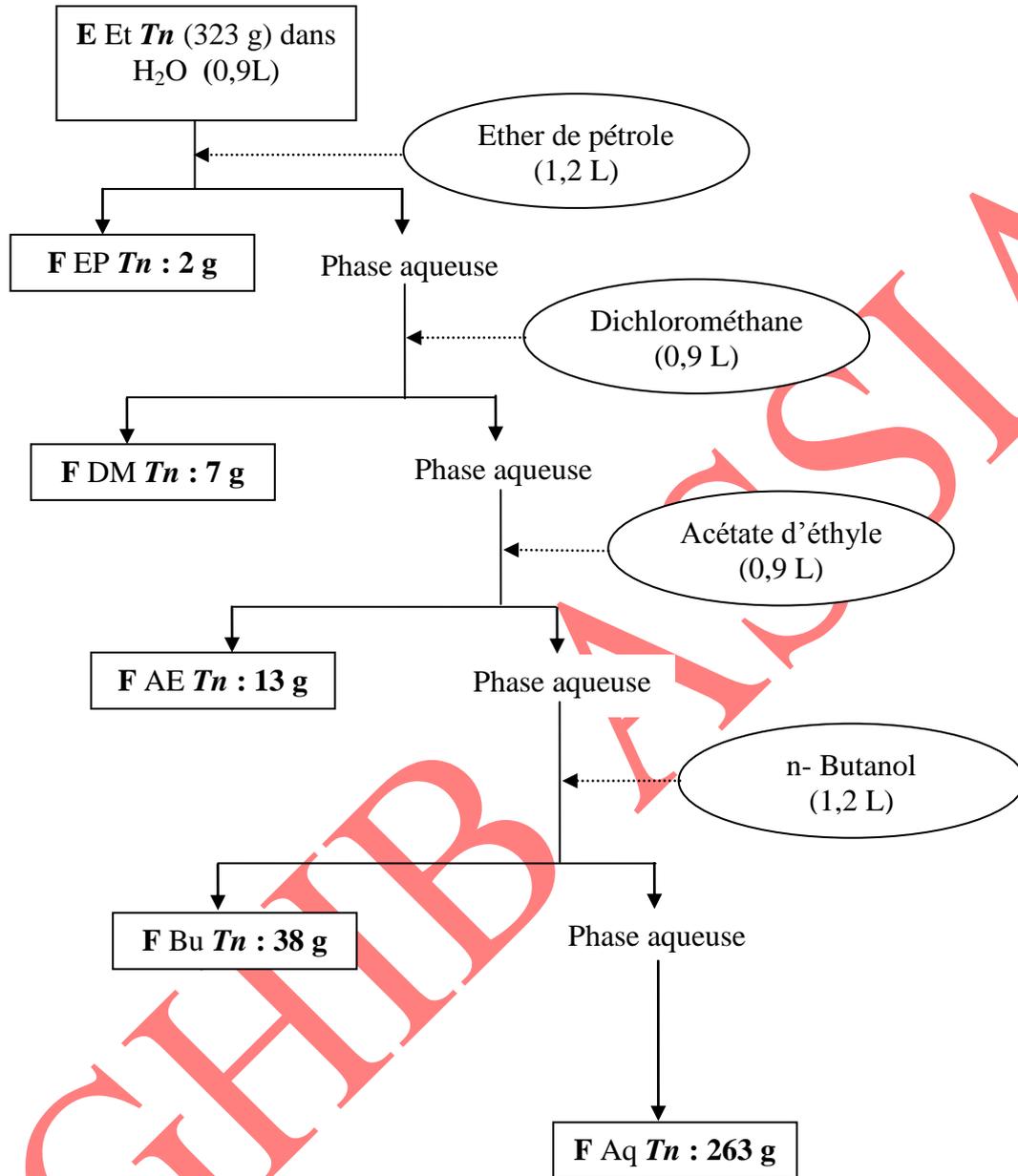


Figure 13 : Diagramme d'obtention des **différentes fractions** de polarité croissante de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus*.

Le **Tableau 7** représente les masses et les rendements obtenus à l'issu du traitement de 2 Kg de *T. numidicus*.

Tableau 7 : Masses et rendements de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions.

<i>T numidicus</i>	Masse (g)	%
E Et <i>Tn</i>	50	-
F EP <i>Tn</i>	2	0,1
F DM <i>Tn</i>	7	0,35
F AE <i>Tn</i>	13	0,65
F Bu <i>Tn</i>	38	1,9
F Aq <i>Tn</i>	263	13,2

Les activités antioxydante, antibactérienne et antivirale de ces différentes fractions ont été déterminées et seront décrites dans la suite de ce travail.

I.2.4. Obtention des huiles essentielles de *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*

L'hydrodistillation des plantes de *Thymus* a été faite dans un Clevenger, conformément à la « british pharmacopeia », durant 3 heures et a permis l'obtention d'huiles essentielles, possédant toutes une odeur très agréable :

- 300 g des parties aériennes fraîches de *T. hirtus* (collecte de Mai 2010), a donné 1,5 % d'huile essentielle de couleur jaune très claire;
- 200 g de plante sèche de *T. guyonii* (collecte de Mai 2010), a donné 1,5 % d'huile essentielle de couleur jaune foncé;
- 100 g des parties aériennes fraîches de *T. numidicus* (collecte de Mai 2012) a donné 2 % d'huile essentielle de couleur jaune.

Les huiles essentielles ont été conservées à +4°C jusqu'à l'analyse de leur composition, par GC-MS, et la détermination de leurs activités biologiques (activités antibactérienne, antivirale, antioxydante et antiproliférative).

II. Méthodes chromatographiques analytiques

II.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

❖ CCM analytique

Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM), sont réalisées sur plaques de silice, Silicagel 60 F₂₅₄, (Merck); plaques de (20×20 cm), avec support aluminium recouvert de 0,2 mm de gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV₂₅₄.

Deux types de réactifs ont été utilisés pour la révélation :

- Le réactif à la vanilline sulfurique (réactif des alcools supérieurs, des phénols, des stéroïdes et des huiles étherées), composé de la façon suivante : 1 g de vanilline est dilué dans 100 mL d'éthanol 95° avec ajout de 1 mL d'acide sulfurique concentré.

- Le réactif de Neu (révélateur des flavonoïdes) : (2-aminoéthyl-diphénylborate) à 1 % dans du méthanol (CH₃OH) pur (m/v).

Les plaques sont pulvérisées avec l'un ou l'autre de ces réactifs, puis chauffées jusqu'à apparition de taches colorées.

❖ CCM préparative

Les CCM préparatives sont réalisées sur des plaques en verre (20×20 cm) recouvertes de silice PLC Silica gel 60 F₂₅₄, 2 mm (Merck).

Les CCM analytiques ont été utilisées pour déterminer les systèmes adéquats de chromatographie sur colonne et pour l'analyse des fractions qui en sont issues. Les CCM préparatives ont permis la séparation et la purification des molécules.

Les phases mobiles utilisées sont :

Mélange M1 : CH₂Cl₂ (100 %)

Mélange M2 : CH₂Cl₂/CH₃OH (9,5:0,5)

Mélange M3 : CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1)

Mélange M4 : CH₂Cl₂/CH₃OH (8,5:1,5)

Mélange M5 : CH₂Cl₂/CH₃OH (8:2)

Mélange M6 : CH₂Cl₂/CH₃OH (7,5:2,5)

Mélange M7 : AE/CH₃OH/H₂O (10:1:1)

Mélange M8 : AE/CH₃OH/H₂O (10:2:1)

Mélange M9 : AE/CH₃OH (10:1)

Mélange M10 : AE/CH₃OH/H₂O (10:1:1) + 100 µL Acide acétique

Mélange M11 : Hexane/AE (50:50) + 100 µL Acide acétique

Mélange M12 : AE/CH₃OH (9:1) + 100 µL Acide acétique

Mélange M13 : CHCl₃/CH₃OH/H₂O (7:3:0,5).

II.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP, HPLC)

Les solutions aussi bien d'extraits de plantes que des fractions issues des séparations/purifications, sont analysées par CLHP. L'appareil utilisé est de marque Waters équipé de :

- une pompe quaternaire modèle 600
- un détecteur UV/visible à barrette de diodes PDA 996
- un contrôleur modèle 600.

Le système CLHP est combiné avec un logiciel (Millennium) qui permet de gérer la phase mobile de l'injection en cours, d'analyser et de stocker les résultats ainsi obtenus.

La phase stationnaire du système CLHP est constituée d'une colonne 250 mm C₁₈ Atlantis (5 µm : granulométrie des particules, 250 × 4,6 mm : longueur × diamètre).

La phase mobile est constituée de deux types de solvants :

- méthanol
- eau distillée/méthanol (80:20) + 1% acide acétique.

Tous les solvants sont filtrés et dégazés à l'hélium avant utilisation. Les analyses sont effectuées en utilisant différentes combinaisons des solvants cités (30:70 à 100:0), avec un débit de 1 mL/min.

II.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

II.3.1. Données GC-MS pour les huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* (Collecte de 2010)

GC/MS : Les huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*, collecte de Mai 2010), ont été analysées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Shimadzu Modèle GC2010, couplé à un spectromètre de masse Shimadzu MS modèle QP2010, équipé d'une colonne DB5 MS de (30m × 0,25mm; épaisseur de film 0,25µm). La température de four a été programmée de 50°C (5 min) à 300°C à une vitesse de 5°C/min (5 min), avec une température d'injection et de détection de 250 et 280°C, respectivement et un volume injecté de 0,1 µL. Le gaz vecteur est l'Hélium dont le débit est fixé à 1 mL/min. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/30). La MS fonctionne avec un détecteur à impact d'électrons, 70 eV; multiplicateur d'électrons, 2500 V; température de trappe d'ions, 180°C; les données des spectres de masse étaient obtenus en mode scan dans la gamme m/z 33-450.

GC/FID : Les huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*, collecte de Mai 2010), ont été analysées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Shimadzu Modèle GC2010, équipé d'une colonne DB5 MS (30m × 0,25mm; épaisseur de film 0,25µm). La température de four a été programmée de 50°C (5 min) à 300°C à une vitesse de 5°C/min (5 min), avec une température d'injection et de détection de 280 et 300°C, respectivement et un volume injecté de 0,1 µL. Le gaz vecteur est l'Hydrogène dont le débit est fixé à 1 mL/min. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/60). Les huiles essentielles sont diluées dans l'hexane: 1/30.

II.3.2. Données GC-MS pour l'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte 2012

GC/MS : L'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012, a été analysée en utilisant GC-Shimadzu modèle GC17A et un couplage avec un détecteur sélectif de masse, de type Shimadzu modèle QP5050, utilisant une colonne DB5-MS (40 m × 0,18 mm, épaisseur de film 0,18 µm). La température du four a été programmée comme isothermale à 60°C pendant 5 min, puis augmente à 275°C à 5°C/min et reste à cette température pendant 5 min. L'Hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1 mL/min). 0,1 µL

d'huile essentielle a été introduite directement dans la source de la MS via une ligne de transfert (280°C), avec un split ratio de 1:50 et une vitesse linéaire de 30 cm/sec. L'ionisation était obtenue par impact d'électrons (70 eV, température de trappe d'ions 200°C, résolution 1000).

GC/FID : L'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012, a été analysée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse de type Shimadzu modèle GC17A, équipé d'un injecteur split/splitless (250°C) et d'un détecteur à ionisation de flamme (250°C). Les temps de rétention, pour comparaison avec des composés de référence, ont été mesurés en utilisant une colonne DB5 MS (40 m × 0,18 mm, épaisseur de film 0,18 µm). La température du four a été programmée comme isothermale à 60°C pendant 5 min, puis augmentée à 275°C à 5°C/min et reste à cette température pendant 5 min. L'Hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1 mL/min).

II.3.3. Identification des composants d'huiles essentielles

Les composants d'huiles essentielles ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention (IR), relatifs aux n-alcanes C₉-C₁₇, avec ceux des composés de référence dans la littérature, et confirmés par GC-MS en comparant leurs spectres de masse avec ceux des substances de référence (Swigar & Silverstein, 1981; Lafferty & Stauffer, 1991; Adams, 2007).

Le pourcentage relatif aux composés identifiés a été calculé à partir des chromatogrammes par intégrateur informatisé.

III. Méthodes préparatives

III.1. Partage liquide-liquide

Nous avons réalisé différents partages liquide-liquide en utilisant différents types d'ampoules à décanter (500, 1000 et 2000 mL).

III.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Alors que les autres méthodes chromatographiques (CCM préparative, CLHP préparative), sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative car elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Les colonnes ouvertes utilisées, permettent des séparations soit par adsorption, soit par phénomène d'exclusion stérique (filtration sur gel). La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile ainsi que la taille des fractions, ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à séparer.

Nous avons utilisé des colonnes de diamètre compris entre 1,5 et 5 cm, de 60 à 100 cm de hauteur.

Les phases stationnaires utilisées sont :

- gel de silice Kieselgel 60 (63-200 mesh, Merck) pour la séparation par adsorption
- gel de Séphadex LH-20 (Lipophilic Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich) pour les séparations par phénomène d'exclusion stérique.

Les phases mobiles utilisées sont :

- EP/CH₂Cl₂ (100:0 à 0:100) suivi de CH₂Cl₂/CH₃OH (99:1 à 0:100) puis terminé avec H₂O/CH₃OH (50:50 à 100:0) pour la séparation par adsorption (collectes de 150 mL)
- méthanol pur pour les séparations par phénomène d'exclusion stérique.

III.3. Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP, MPLC)

La CLMP est très similaire à la chromatographie liquide sur colonne ouverte. Elle diffère de cette dernière par la mise sous pression de la phase mobile.

En CLMP, l'élution des produits peut être suivie à l'aide d'un détecteur UV branché à la sortie de la colonne.

Les séparations par CLMP font appel à un appareillage Büchi comprenant :

- une pompe modèle 681 (pression max 40 bars)
- une colonne 460×26 mm.

Les phases stationnaires utilisées sont :

- LiChroprep[®] RP-18 (15 à 25 µm) (Merck)
- Gel de silice POLYGOPREP 60-20 (MACHERY-NAGEL).

Les phases mobiles utilisées sont :

- C₁₈ : CH₃OH/H₂O dans des proportions allant de 100:0 à 0:100
- SiO₂ : Hexane/CH₂Cl₂ dans des proportions allant de 100:0 à 0:100
Hexane/CH₂Cl₂/AE dans des proportions allant de 100:0:0 à 0:0:100
Hexane/CH₂Cl₂/AE/CH₃OH dans des proportions allant de 100:0:0:0 à 0:0:0:100.

Le débit utilisé est de 3,5 mL/min. La détection UV se fait à une longueur d'onde de :

- 254 nm avec les éluants Hexane/CH₂Cl₂ (sur phase stationnaire de SiO₂) et CH₃OH/H₂O (sur phase stationnaire de C₁₈)
- 285 nm avec les éluants Hexane/CH₂Cl₂/AE et Hexane/CH₂Cl₂/AE/CH₃OH (sur phase stationnaire de SiO₂).

La solubilisation des échantillons d'étude (extraits et fractions) se fait dans un minimum de volume de solvant avant d'être introduits en pré-colonne (14×2 cm).

IV. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Dans notre étude, l'activité antioxydante des échantillons d'étude est mesurée par une méthode spectroscopique la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), en utilisant la technique de « spin-labelling » avec le DPPH (1,1-Diphényl-2-Pyrcil-Hydrazyl) (Jost & Griffith, 1984).

Cette technique repose sur un principe simple. Elle consiste à mettre l'échantillon à étudier en présence d'un composé qui est un radical en lui même (spin-label). Ce composé radicalaire va présenter la particularité d'être stable au cours du temps et donner un spectre caractéristique en RPE.

La mesure de l'activité antioxydante d'un composé, est déterminée par la capacité du composé à piéger le radical, en le transformant en un composé non radicalaire, sans réponse en RPE. La réduction se caractérise, alors, par une diminution de l'amplitude du signal mesuré.

Le radical DPPH que nous avons utilisé, est stable et facilement détectable par RPE. Il présente, de plus, l'avantage de pouvoir être utilisé en présence de tous les solvants employés dans notre étude. Dans ce cas, le spin-label est utilisé comme simple marqueur d'activité antioxydante et permet d'obtenir une information quantitative sur l'activité du composé à étudier.

Le spectre RPE caractéristique du radical DPPH, est mesuré à l'aide du spectromètre ESP300E Bruker. Les paramètres de mesures sont les suivants :

- modulation de fréquence : 100 kHz
- fréquence micro-onde : 9,78 GHz
- puissance micro-onde : 4 mW
- modulation d'amplitude : 1,97 G
- temps de conversion : 5,12 msec
- constante de temps : 10,24 msec

Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le spectre obtenu est la somme de deux balayages successifs, ceci afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

IV.2. Spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker 400 MHz DPX Avance.

Les spectres proton (^1H) et carbone (^{13}C), sont mesurés dans le méthanol deutéré (CD_3OD), en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne.

L'interprétation structurale des différents produits, a été effectuée à partir de spectres monodimensionnels (^1H , ^{13}C découplé large bande, ^{13}C DEPT₁₃₅, ^{13}C J-mod) et bidimensionnels :

- COSY : $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COrrrelation SpectroscopY
- HSQC : $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HMQC : $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
- HMBC : $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- NOESY : $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

V. Détermination du taux des composés phénoliques des différents extraits et fractions (Folin Ciocalteu)

La quantité de polyphénols totaux, présents dans les extraits et fractions de plantes étudiées, est déterminée selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne (Kujala et al., 2000; Sanchez-Moreno et al., 2000). Le taux est exprimé en % de composés phénoliques totaux (g/100g), en prenant le Pyrogallol comme composé de référence.

V.1. Principe

Les polyphénols, mis en présence du carbonate de sodium, conduisent à une forme ionisée, l'ion phénolate. Par ajout du réactif de Folin-Ciocalteu ou réactif phosphomolybdotungstique (mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique), l'ion phénolate est oxydé, puis simultanément réduit en donnant une solution colorée bleue dont l'absorbance est déterminée à 760 nm.

V.2. Mode opératoire

Le protocole suivi est décrit dans la Pharmacopée Européenne 2001. Cette méthode de mesure, permet d'évaluer la quantité de polyphénols totaux, contenus dans les extraits et fractions étudiés. La teneur de ces composés est déterminée par rapport à une solution témoin de pyrogallol (1, 2, 3-Trihydroxybenzene).

V.2.1. Détermination de l'absorbance des polyphénols totaux

Pour déterminer le taux de polyphénols totaux il faut, dans un premier temps, réaliser une solution mère dite solution B. Cette dernière est composée de 3 à 4 mg d'extrait de plante ($m_{\text{pesée}}$: masse de la pesée), solubilisée d'abord dans 2 mL de méthanol, puis additionnée de 13 mL d'eau distillée (obtention d'un volume de 15 mL). 2 mL de cette solution B sont prélevés et introduits dans un pilulier. A cette solution sont ajoutés 1 mL de réactif phosphomolybdotungstique (Folin-Ciocalteu), qui vire vers le vert si la réaction est positive (présence de composés phénoliques), et 10 mL d'eau distillée. A la fin, sont ajoutés au mélange, 12 mL d'une solution de carbonate de sodium à 290 g/L réalisée dans l'eau distillée; la couleur vire vers le bleu s'il y'a présence de composés phénoliques. Après agitation, le mélange est laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Au bout de ce temps, l'absorbance (A_{TX}) de la solution est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre, en utilisant

l'eau distillée comme blanc. Nous calculons ensuite, à partir de la quantité de produit ou d'extrait utilisé, une masse appelée (m_1) qui correspond aux critères de la Pharmacopée Européenne.

V.2.2. Mesure de l'absorbance du témoin pyrogallol

La première étape consiste à réaliser une solution mère de pyrogallol à 25 mg de pyrogallol (m_2), dans 1L d'eau distillée (25 mg/L). Faire deux pesées de 3 à 4 mg de pyrogallol, chacune, pour en déterminer la moyenne de l'absorbance. Tenant compte de la solution mère de pyrogallol à (25 mg/L), le volume d'eau distillée à ajouter aux deux pesées sera, donc, énorme ce qui posera une contrainte. Pour lever cette dernière, multiplier par 10 la solution mère de pyrogallol à (25 mg/L) pour avoir une solution de (250 mg/L). Déterminer, par la suite, le volume d'eau distillée à ajouter aux deux pesées de pyrogallol, pour avoir une solution mère de (250 mg/L). Ensuite, faire une dilution au 1/10ème de cette dernière, pour revenir à la concentration initiale de (25 mg/L). Prélever 2 mL de la solution de pyrogallol (au 1/10ème) et les introduire dans un pilulier. Ajouter 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu, 10 mL d'eau distillée et 12 mL de solution de carbonate de sodium à 290 g/L. Le mélange est agité puis son absorbance (A_P) est mesurée à 760 nm, contre l'eau distillée, après 30 minutes de repos à l'abri de la lumière. L'absorbance moyenne de pyrogallol est, ainsi, déterminée.

V.3. Méthode de calcul

Le pourcentage des polyphénols totaux présents dans un extrait, exprimé en équivalent pyrogallol, est calculé par la formule suivante :

$$\text{Polyphénols totaux (\%)} = \frac{(62,5 \times A_{TX} \times m_2)}{(A_P \times m_1)}$$

m_1 : masse de la prise d'essai (mg)

m_2 : masse de pyrogallol (mg) = 50 mg (constante)

A_{TX} : absorbance de l'extrait de plante

A_P : moyenne de l'absorbance de pyrogallol

La formule prend en compte la masse des extraits de plante utilisée ainsi que la masse et les caractéristiques physico-chimiques du pyrogallol.

VI. Procédures de séparation et de purification des molécules d'intérêt de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* (colonne ouverte)

Le bioguidage nous ayant permis de mettre en évidence le potentiel antioxydant de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (comme il sera décrit dans la suite de ce travail), l'investigation phytochimique s'est orientée vers cette fraction, pour en purifier les composés majoritaires et déterminer leur implication dans cette activité.

Les composés majoritaires de cette fraction, ont été obtenus par chromatographie liquide sur colonne ouverte, par adsorption (gel de silice) et par phénomène d'exclusion stérique (gel de Séphadex LH 20). Le protocole sera brièvement détaillé dans la section suivante et repri en détail en annexe.

VI.1. Séparation chromatographique par adsorption

Pour cette première étape de séparation, nous avons déposé 10,8 g de fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn) contenant les composés d'intérêt, au sommet d'une colonne ouverte contenant 300g de gel de silice (30g/g extrait) (Kieselgel 60 (63-200 mesh) Merck). Les composés ont été élués à l'aide de solvants de polarité croissante.

La phase mobile a été constituée successivement de :

- EP (100)
- EP/CH₂Cl₂ (50:50)
- CH₂Cl₂/CH₃OH (99:1 à 0:100)
- CH₃OH /H₂O (50:50 à 0:100)

Au total, 411 collectes de 150 mL chacune ont été recueillies, puis regroupées en 72 sous-fractions (SF) suivants leur similitude sur plaque CCM analytique de gel de silice et révélation avec le réactif de Neu. Les sous-fractions sont ensuite séchées sous pression réduite. Les résultats de la progression des séparations des produits dans la colonne, sont rassemblés dans l'Annexe 1.

Les masses des sous-fractions obtenues suite à la séparation, sur colonne de gel de silice, de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus*, les différents systèmes d'éluion permettant leur visualisation sur plaque CCM analytique de gel de silice, ainsi que leur caractéristiques, sont présentés dans l'Annexe 2.

VI.2. Purification chromatographique par phénomène d'exclusion stérique

Notre intérêt s'est porté sur 3 sous-fractions qui ont été utilisées pour la suite des étapes de purification. Les sous-fractions retenues sont respectivement :

- **SF₂₀₋₂₁** (850,16 mg; éluant : CH₂Cl₂/CH₃OH 97:3 et 96:4) qui par test sur plaque CCM analytique de gel de silice, elle se présente comme un mélange séparable avec deux produits majoritaires dans le 1^{er} tiers de la plaque CCM analytique.
- **SF₃₇** (234,65 mg; éluant : CH₂Cl₂/CH₃OH 80:20) qui par test sur plaque CCM analytique de gel de silice, elle se présente comme un mélange séparable avec un produit majoritaire, en quantité importante, en deux tiers de la plaque CCM analytique.
- **SF₄₆** (56 mg; éluant : CH₂Cl₂/CH₃OH 70:30) qui par test sur plaque CCM analytique de gel de silice, elle se présente comme un mélange séparable avec un produit majoritaire en mi-plaque CCM analytique.

La purification a été poursuivie par l'utilisation d'une colonne d'exclusion sur gel (Séphadex LH 20) pour les 3 sous-fractions sélectionnées. Nous avons réussi à isoler six composés purs (notés A1 à A6) à partir de ces 3 sous-fractions. La **Figure 14** schématise la procédure simplifiée qui nous a permis d'obtenir ces composés. Les **Figures 15, 16** et **17** représentent les schémas des procédures détaillées ayant permis de purifier ces 6 produits dont nous avons déterminé la structure.

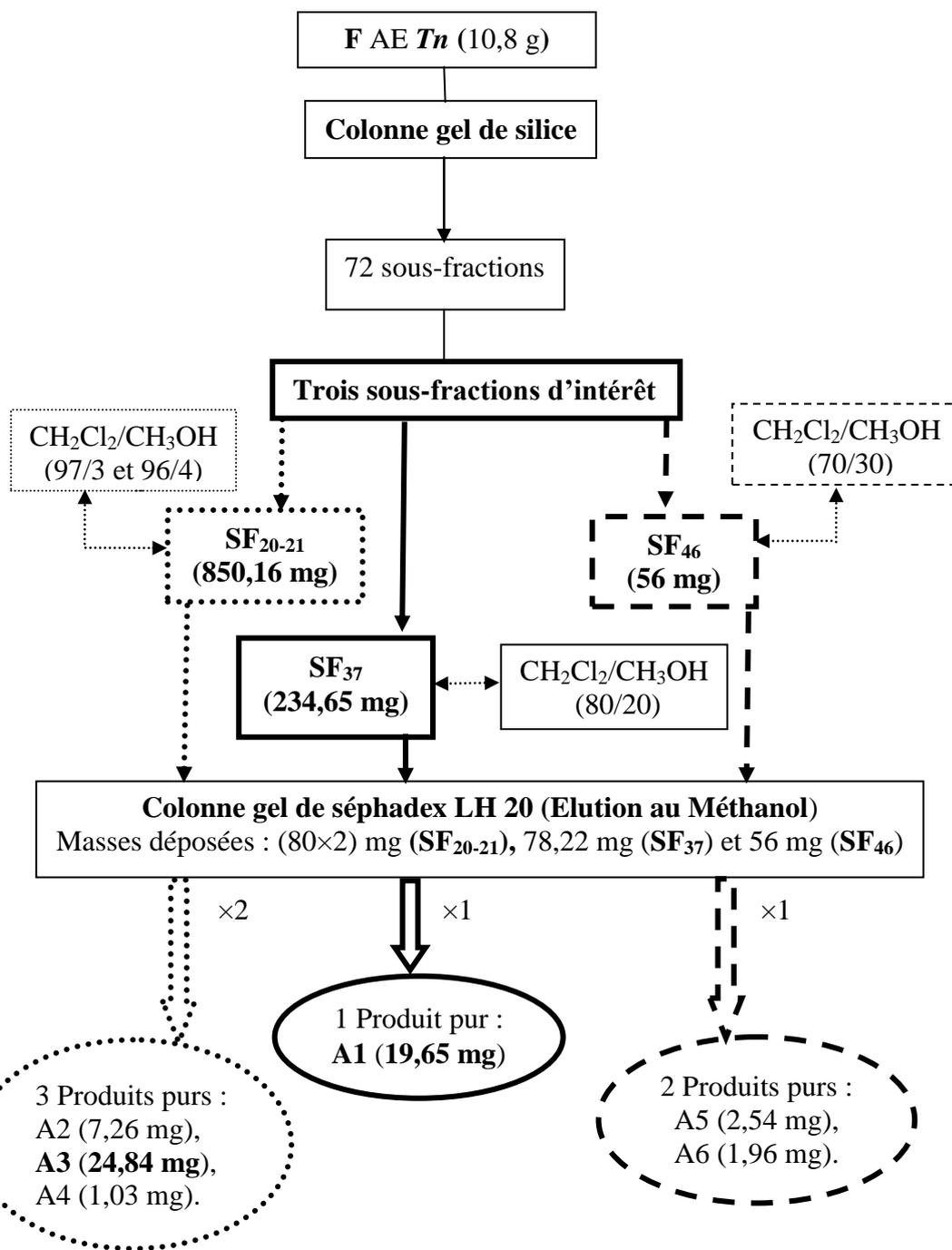


Figure 14 : Schéma de séparations et de purifications des produits A1, A2, A3, A4, A5 et A6 à partir des sous-fractions SF₂₀₋₂₁, SF₃₇ et SF₄₆ de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn).

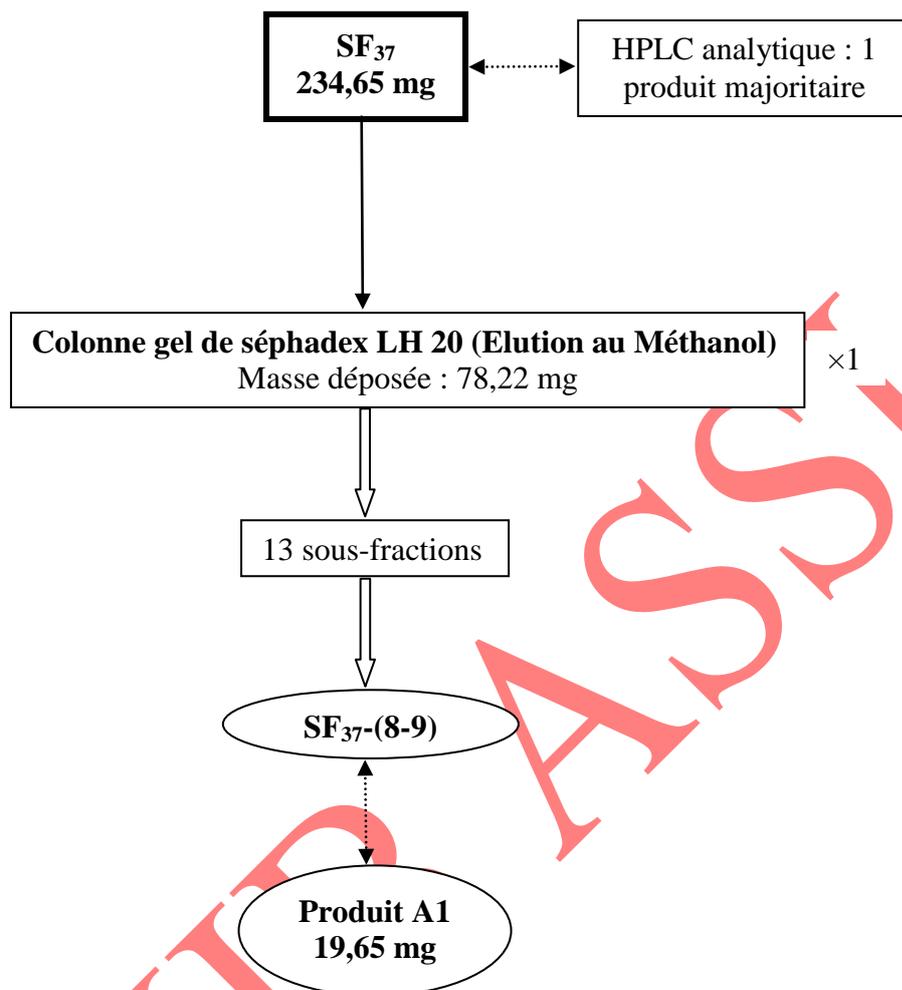


Figure 15 : Schéma de la purification du produit **A1** à partir de la sous-fraction **SF₃₇** de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn).

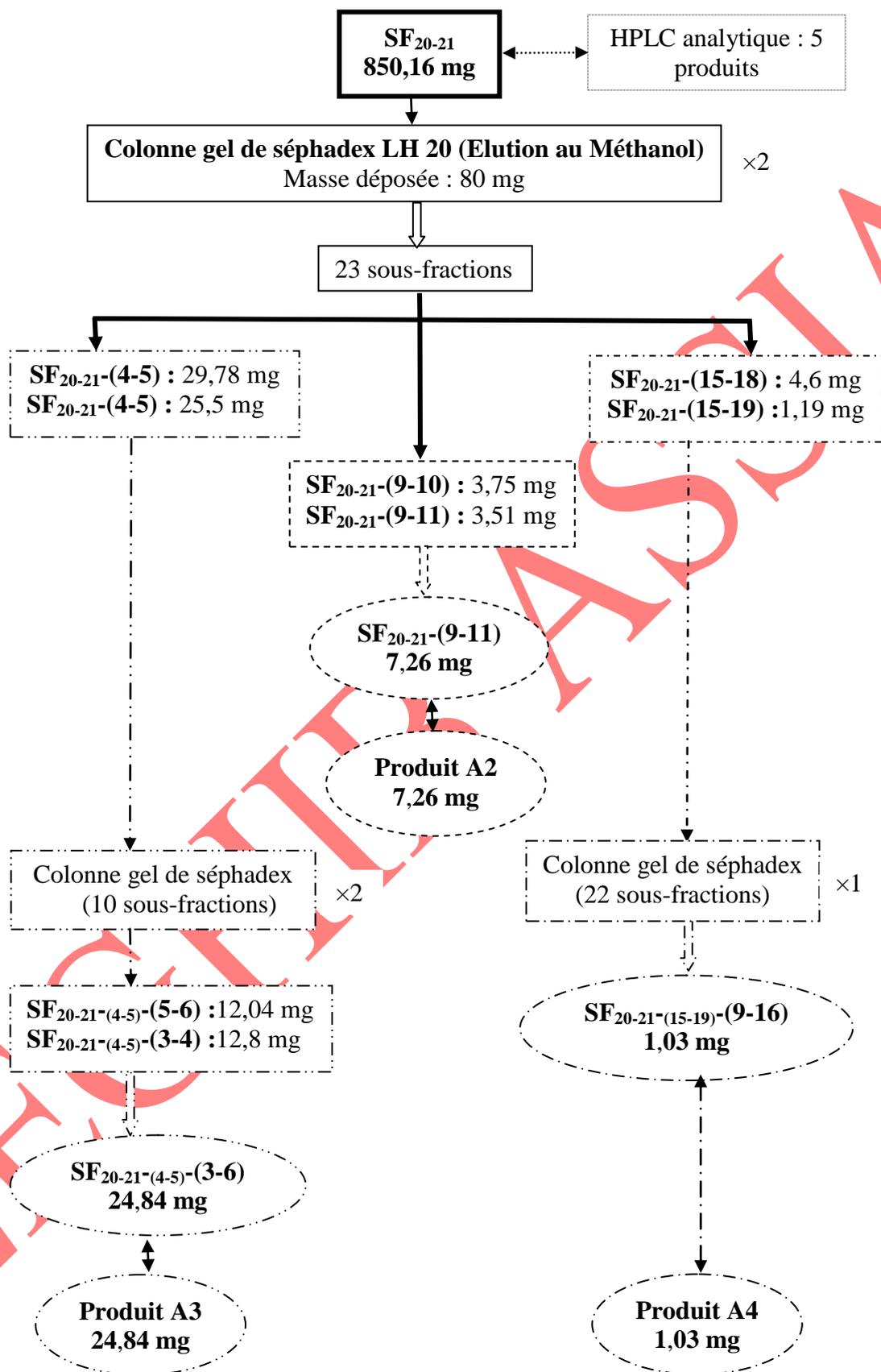


Figure 16 : Schéma de la purification des produits A2, A3 et A4 à partir de la sous-fraction SF₂₀₋₂₁ de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn).

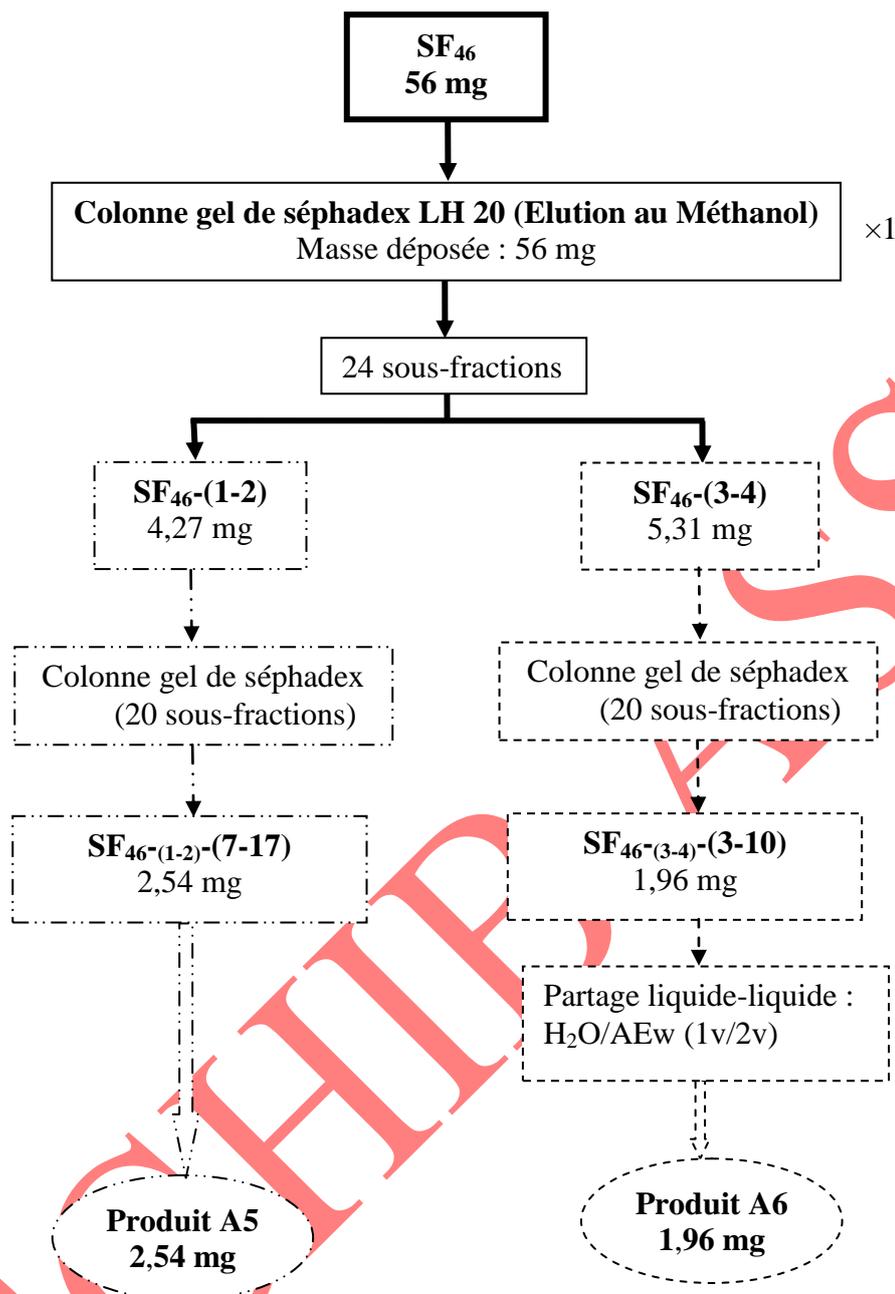


Figure 17 : Schéma de la purification des produits A5 et A6 à partir de la sous-fraction SF₄₆ de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn).

VII. Procédures utilisées pour la recherche de molécules antiprolifératives dans l'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* (E DM *Tn*)

Le bioguidage nous ayant permis de mettre en évidence le potentiel antiprolifératif des extraits apolaires de *T. numidicus* (comme il sera décrit dans la suite de ce travail), l'exploration phytochimique s'est orientée vers l'extrait dichlorométhane (E DM *Tn*), pour en purifier les composés responsables de cette activité.

Nous avons choisi d'étudier l'extrait dichlorométhane (E DM *Tn*), car il présente un rendement (2,96 %) plus important par rapport à celui de l'extrait acétate d'éthyle (E AE *Tn*) (1,36 %). Etant riche en chlorophylle qui ne présente pas d'activité antiproliférative, nous avons commencé par l'éliminer. Pour cela, nous avons traité au charbon actif 604,4 mg d'extrait solubilisé dans le dichlorométhane et le méthanol (50:50). Nous avons, ainsi, obtenu 472,2 mg d'extrait déchlorophylé qui a servi de base à la suite de ce travail.

Nous avons ensuite essayé, par différentes techniques, de purifier les molécules actives à partir de cet extrait : test de précipitation à froid de molécules de types terpéniques, chromatographie liquide à moyenne pression sur gel de silice (MPLC-SiO₂), chromatographie liquide sur colonne ouverte sur gel de séphadex LH 20, CCM sur plaque préparative.

Malheureusement, aucune d'entre elles n'a permis d'obtenir de molécules isolées. Seule la technique de précipitation à froid dans le méthanol, nous a permis de mettre en évidence la présence de 3 composés majoritaires dont la nature a pu être analysée. Ainsi, dans la **Figure 18** nous détaillons seulement les procédés qui nous ont conduit à obtenir des résultats intéressants : fractions intéressantes et/ou monotaches sur plaques CCM analytique de gel de silice.

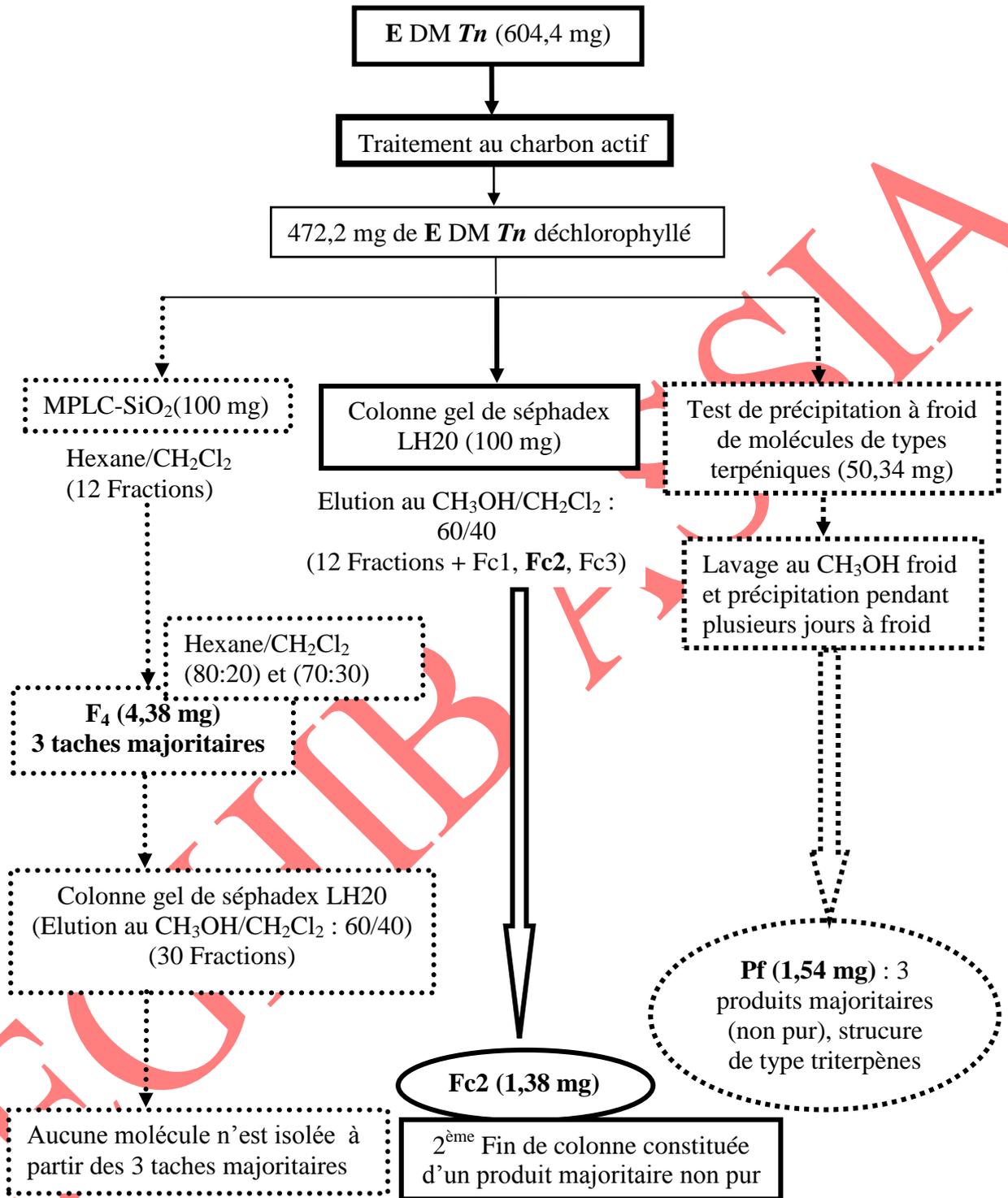


Figure 18 : Schéma des tentatives de purifications des produits antiprolifératifs à partir de l'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* (E DM *Tn*).

VIII. Tests d'activités biologiques

VIII.1. Détermination de l'activité antioxydante

VIII.1.1. Test d'activité anti DPPH

Il est connu que le test d'inhibition du radical DPPH, donne une information fiable concernant la capacité antioxydante des composés testés (Trouillas *et al.*, 2003). Nous avons choisi d'utiliser le test d'inhibition du radical DPPH par RPE. En effet, l'utilisation du DPPH présente plusieurs avantages :

- formation d'un spectre caractéristique en RPE qui est facilement détectable
- stabilité au cours du temps
- compatibilité avec tous les solvants utilisés lors de cette étude.

Ce test a été réalisé pour :

- les extraits de *T. numidicus* (collecte de Mai 2007 et de 2010), *T. guyonii* et *T. ciliatus* (collecte de Mai 2010);
- l'extrait hydro-éthanolique et les cinq fractions de *T. numidicus*;
- les huiles essentielles de *T. guyonii* et *T. hirtus* (collecte de Mai 2010).

VIII.1.1.1. Principe

Le test d'activité anti DPPH (1,1-Diphényl-2-Pyridyl-Hydrazyl) permet d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits/huiles essentielles de plantes. Le principe est de mesurer leur capacité à inhiber le radical stable DPPH (Figure 19).

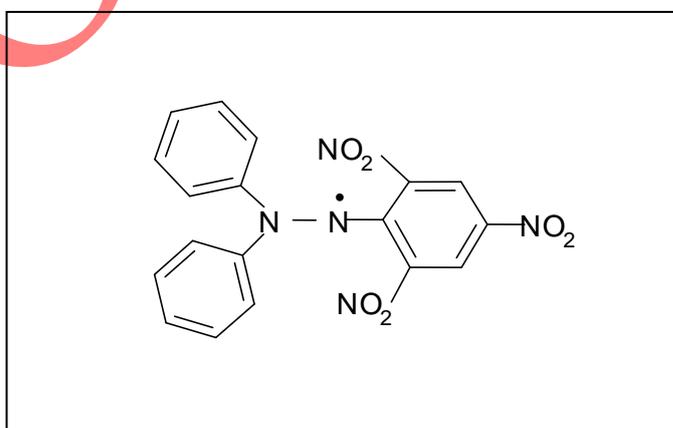


Figure 19 : Radical DPPH.

Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité antioxydante de nombreux composés, dont les composés phénoliques.

La première étape de la réaction, est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH, pour donner du diphénylpicrylhydrazine et un radical phénoxy (**Figure 20**). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats obtenus, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé.

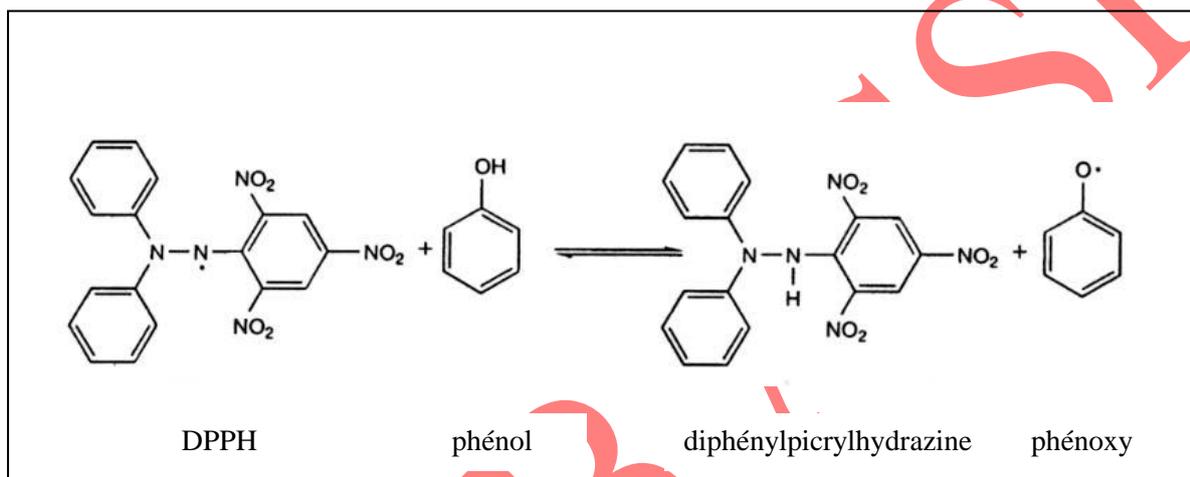


Figure 20 : Réaction du radical DPPH avec un phénol.

Le signal de référence est obtenu en mélangeant, à volume égal, une solution éthanolique du radical DPPH (5×10^{-4} M) avec le solvant des extraits étudiés. La double intégrale du signal obtenu, est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans la solution. Une nouvelle mesure, effectuée avec la solution du radical DPPH et l'extrait à tester (1:1), a pour effet de diminuer le nombre de radicaux libres et entraîne donc une baisse du signal (**Figure 21**). Une nouvelle mesure de la double intégrale du signal, permet la quantification de l'activité antioxydante (*Gao et al., 1999; Ogata et al., 2000*).

La réduction du radical DPPH induit un changement de couleur du violet au jaune, qui peut être suivi facilement soit par spectrophotométrie, en mesurant la décroissance de l'absorption à 517 nm (*Brand-Williams et al., 1995; Soares et al., 1997; Tseng et al., 1997*), soit par RPE. Nous avons choisi la mesure RPE car elle présente plusieurs avantages :

- travailler avec des quantités plus faibles de produits
- pas d'interférences dues à l'absorption UV éventuelle des composés testés
- précision plus élevée.

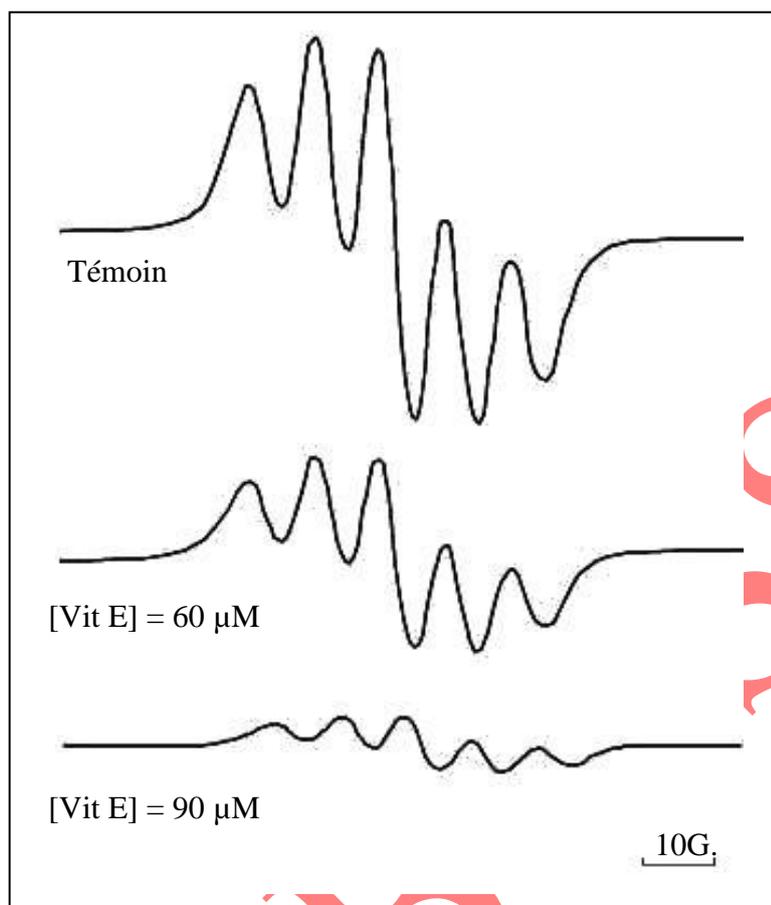


Figure 21 : Evolution du spectre RPE du radical du DPPH dans l'éthanol en fonction de différentes concentrations de vitamine E.

VIII.1.1.2. Mode opératoire

50 μL de solution éthanolique de DPPH (5×10^{-4} M), sont mélangés avec 50 μL d'extraits/huiles essentielles de plantes à concentration variable (solvant différent selon extrait/huile essentielle). Le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur pendant 5 secondes, introduit dans un microtube en quartz de 100 μL , puis placé dans la cavité de mesure de la RPE. La mesure est effectuée 3 minutes après que les réactifs aient été mis en présence.

Le spectre RPE caractéristique du radical DPPH est mesuré à l'aide du spectromètre ESP300E Bruker (Voir section IV.1).

VIII.1.1.3. Méthode de calcul

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence. Il est déterminé par la formule suivante :

$$\%inhibition = \frac{(ref - extrait)}{(ref - bdf)}$$

ref : la double intégrale du signal de référence composé du mélange DPPH et du solvant.

extrait : la double intégrale du signal correspondant à la mesure qui se compose de DPPH et de l'extrait de plante.

bdf : la mesure du bruit de fond occasionné par le solvant seul (sans DPPH).

Chaque mesure est effectuée à trois reprises.

Lorsque cette manipulation est effectuée à différentes concentrations d'extraits/huiles essentielles étudiés, le tracé d'une courbe % d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration, permet la détermination de la CI_{50} (concentration permettant l'inhibition de 50% du signal de référence).

VIII.1.2. Test de blanchissement du β -carotène

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *T. numidicus* (collecte de Mai 2012), a été évaluée par le Test de blanchissement du β -carotène (Miller, 1971).

VIII.1.2.1. Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β carotène entraînant, ainsi, la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et, donc, prévenir l'oxydation et le blanchissement du β carotène (Kartal et al., 2007).

VIII.1.2.2. Mode opératoire

Une solution stock d'un mélange de β -carotène/acide linoléique a été préparée comme suit : 0,5 mg de β -carotène est dissoute dans 1 mL de chloroforme et ajoutée à 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 (mixture émulsifiante). Le chloroforme a été complètement

évaporé sous vide. Ensuite, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été ajouté au mélange précédant, l'émulsion précédente est rigoureusement agitée. Quatre milles microlitres de cette mixture, ont été transférés dans différents tubes-test, contenant différentes concentrations de l'échantillon. Dès que l'émulsion est ajoutée dans chaque tube, l'absorbance au temps zéro était mesuré à 470 nm utilisant un spectrophotomètre. Le système d'émulsion a été incubé 2 h de temps à 50°C. La Vitamine E a été utilisée comme standard et un blanc, dépourvu de β -carotène, a été préparé. Le taux de blanchissement de β -carotène (**R**) était calculé selon l'équation suivante :

$$\mathbf{R = \ln(a/b)/t}$$

où **ln** est le log naturel, **a** est l'absorbance au temps 0, **b** est l'absorbance au temps t (120 min) (**Lafferty & Stauffer, 1991**). L'activité antioxydante (**AA**) a été calculée en terme de pourcentage d'inhibition relatif au contrôle, utilisant l'équation suivante :

$$\mathbf{AA = [(R_{\text{contrôle}} - R_{\text{échantillon}})/R_{\text{contrôle}}] \times 100}$$

VIII.2. Détermination de l'activité antiproliférative

Il a été bien rapporté que le thym est utilisé sous plusieurs formes en alimentation (épices et condiments pour les potages, les grillades de viandes et poissons, etc.) et en médecine traditionnelle (tisanes). L'absorption des composés qui en sont issus se fera donc au niveau des intestins. Pour cela, nous avons étudié l'activité antiproliférative des espèces endémiques de *Thymus* vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29.

VIII.2.1. Lignée cellulaire utilisée (HT-29)

Dans notre étude, nous avons utilisé la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29 pour tester l'activité antiproliférative des extraits/huiles essentielles de *Thymus*. Cette lignée cellulaire est fournie par l'American Type Culture Collection (LGC Standards, Middlesex, UK).

Les cellules HT-29 ont été isolées, en 1964, à partir d'un adénocarcinome colorectal primaire modérément différencié de grade II, prélevé sur le côlon d'une femme caucasienne âgée de 44 ans.

VIII.2.2. Conditions de culture

VIII.2.2.1. Matériel

Les cultures cellulaires sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (Flux France, France). Un microscope inversé à contraste de phase (Nikon, France), est utilisé pour un contrôle visuel et quotidien des boîtes de culture. Les cultures et les différentes expérimentations sont effectuées dans des boîtes de culture (Sarstedt) de 75 cm² de surface (T 75), et dans des plaques 96 puits (Nunc, Danemark); elles sont placées dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère humide saturée en eau, et avec 5% de CO₂.

VIII.2.2.2. Milieux de culture

Pour faciliter leur prolifération, les cellules HT-29 sont maintenues en culture à l'aide d'un milieu complet, spécifique pour cette lignée.

Le milieu de culture est constitué d'une solution Dulbecco's modified Eagle's medium, (DMEM with L-Glutamine, Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). A ce milieu de base est ajouté:

- 10% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco BRL) préalablement décomplémenté à 60°C pendant 30 minutes

- 1% de L-glutamine (200 mM, Gibco BRL)
- 1% de [pénicilline (100 U/mL) / streptomycine (100 µg/mL)] (Gibco BRL).

Une fois réalisé, le milieu complet est stocké à 4°C.

VIII.2.2.3. Ensemencement cellulaire

Les cellules HT-29 sont adhérentes et sont cultivées en monocouche dans des boîtes de culture T 75, contenant 10 mL de milieu complet. Un renouvellement, tous les deux jours, de ce milieu est nécessaire pour une meilleure prolifération et un bon développement cellulaire, par assimilation des nutriments essentiels.

Les cellules sont ensemencées avec une densité de $2,5 \times 10^4$ cellules/cm² par boîte de culture. En trois ou quatre jours, cette densité permet d'obtenir la confluence, c'est-à-dire un recouvrement total du support par les cellules en culture (ou tapis cellulaire). La confluence se caractérise par un arrêt de la prolifération dû à l'inhibition de contact entre les cellules. Une fois à confluence, les cellules sont décollées de leur support de la façon suivante :

- Le milieu de culture est enlevé, puis le tapis cellulaire est « lavé » par une solution tampon PBS (*) (2 à 3 mL) pour éliminer toute trace de l'ancien milieu de culture. Après agitation manuelle, le PBS est enlevé.
- Une solution de HBSS-EDTA (**) (2 mL) est ajoutée de façon à recouvrir le tapis cellulaire et laissé au contact des cellules, pendant 2 à 3 minutes. Cette solution "chélate" les ions Ca²⁺ et Mg²⁺ indispensables à l'adhésion intercellulaire et favorise, ainsi, le décollement des cellules.
- Puis, la solution HBSS-EDTA est retirée et remplacée par 2 mL de trypsine- EDTA 1X (***) pour une boîte de culture de T 75.

(*) Solution tampon PBS : Phosphate Buffer Salin (PBS, pH 7,4, Gibco BRL).

(**) Solution HBSS-EDTA : Hank's Balanced Salt solution – Ethylenediaminetetraacetic acid [50 mg EDTA (Sigma) dans 50 mL HBSS (Gibco BRL)].

(***) Solution Trypsine EDTA 1X : 0,5 g de trypsine porcine et 0,2 g d'EDTA dans 100 mL de HBSS sans calcium et ni magnésium, Gibco BRL.

Les boîtes de cultures sont alors placées dans l'incubateur à 37°C, les cellules se décollent après deux ou trois minutes de contact avec la trypsine. Elles sont alors comptées

sur un hémocytomètre de Malassez par la méthode d'exclusion du bleu trypan. Un nombre exact de cellules est à nouveauensemencé dans de nouvelles boîtes de culture avec du milieu complet, ou éventuellement congelées par cryogénéisation dans l'azote pour y être conservées.

Après ensemencement, une période de 24 heures est nécessaire aux cellules pour adhérer complètement sur le fond de la boîte de culture. Après cette période de 24 heures, le surnageant est retiré par aspiration et le milieu est renouvelé.

Pour l'ensemble des expérimentations, les cellules seront exposées à la drogue (extrait /huile essentielle de plante) après cette période de 24 heures d'adhérence.

VIII.2.3. Test d'activité antiproliférative (technique du MTT)

L'activité antiproliférative des extraits et huiles essentielles de *Thymus*, sur la lignée cellulaire HT-29, est évaluée par la technique du MTT, sur des plaques 96 puits. L'avantage de cette technique est de multiplier les mesures et de diminuer les quantités d'extraits/huiles essentielles nécessaires à la réalisation de ces tests.

VIII.2.3.1. Principe

La technique du MTT est basée sur la réduction des sels de tétrazolium (MTT : bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) de couleur jaune, en cristaux de formazan violets, principalement par les déshydrogénases mitochondriales actives : cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. Les cristaux formés sont solubilisés dans le sodium dodécyl sulfate (SDS). La quantité de formazan formée, déterminée par absorbance à 550 nm sur lecteur ELISA, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

VIII.2.3.2. Mode opératoire

Le MTT (5 mg/mL), préparé dans une solution de tampon phosphate PBS ou dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS), est stable à -20°C et à l'abri de la lumière. Il se conserve aussi à +4°C pendant un mois. La solution solubilisante à pH 7,4 (50 g de SDS dans 500 mL de PBS auquel est ajouté 445 µL de HCl à 0,01M) est stable à la température ambiante.

Lors des études de prolifération, les cellules sont ensemencées dans des plaques stériles 96 puits, avec une densité de 10^4 cellules et un volume final de 100 µL par puits. Tous les puits sont ensemencés sauf la première ligne qui servira de blanc lors de la lecture de la plaque (100 µL de milieu de culture).

VIII.2.3.2.1. Traitement des cellules avec les extraits/huiles essentielles à tester

Les différents extraits/huiles essentielles de *Thymus* sont préparés à 10 mg/mL dans le DMSO (diméthylsulfoxyde), excepté les extraits aqueux qui sont solubilisés à cette même concentration dans de l'eau distillée. La concentration finale en DMSO/Eau distillée est égale à 1% pour chaque concentration d'extrait/huile essentielle testé.

Après 24 heures d'adhérence des cellules, le surnageant est éliminé par retournement des plaques. 100 µL de solution d'extrait/huile essentielle de plantes, à différentes concentrations, diluées dans de milieu de culture, sont déposés sur les cellules. Les cellules sont laissées au contact de la drogue (extrait/huile essentielle de plante) ou du solvant seul (eau distillée ou 1% de DMSO) pendant 48 heures, toujours dans les mêmes conditions environnementales (atmosphère humide, 37°C et 5% de CO₂).

VIII.2.3.2.2. Mode de lecture et expression des résultats

La lecture des plaques est effectuée 48 heures après l'addition de l'échantillon à tester. Le milieu de culture est éliminé par retournement de la plaque. Un lavage des puits au PBS (100 µL par puits) est effectué afin d'éliminer toutes traces d'échantillon. Après agitation des plaques, le PBS est remplacé par 100 µL de milieu de culture, auquel est ajouté 10 µL de MTT par puits. Les plaques sont ensuite remises à l'incubateur pendant 4 heures. Au terme de cette période, 100 µL de SDS à 10% sont ajoutés dans chaque puits afin de lyser les cellules et de solubiliser les cristaux de formazan formés.

4 heures après l'addition du SDS sur les cellules, une agitation est nécessaire pour compléter la solubilisation avant la lecture des densités optiques (DO) au lecteur de plaques ELISA à 550 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire et calculés selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \% \text{ de viabilité}$$

Le pourcentage de viabilité cellulaire est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{(\text{DO } \textit{Extrait} \times 100)}{\text{DO } \textit{Témoin}}$$

DO Témoin : correspond à la valeur moyenne de l'absorbance mesurée dans les puits contenant les cellules non traitées.

DO *Extrait* : correspond à la valeur moyenne de l'absorbance mesurée dans les puits contenant les cellules et l'extrait de plante.

Chaque mesure est réalisée à trois reprises. Lorsque cette manipulation est effectuée à différentes concentrations d'extraits/huiles essentielles étudiés, le tracé d'une courbe % d'inhibition de la prolifération cellulaire en fonction de la concentration permet la détermination de la CI_{50} (concentration permettant l'inhibition de 50% de la prolifération cellulaire).

VIII.3. Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*) ainsi que les fractions de *T. numidicus*, a été évaluée *in vitro*, sur différentes souches bactériennes, par la méthode de diffusion en milieu solide (Sacchetti et al., 2005; Celiktas et al., 2007). Cette activité est déterminée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (halo ou auréole d'inhibition) de la croissance bactérienne qui apparaît autour du puits contenant une substance active.

VIII.3.1. Souches bactériennes testées

➤ **Pour les huiles essentielles de *T. guyonii* et *T. hirtus* (Collecte Mai 2010)**

Les huit souches bactériennes, choisies au cours de cette étude, ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC), et sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc.). Il s'agit de deux germes type **Cocci Gram positif** et six germes type **Bacilles Gram négatif**.

❖ **Cocci Gram positif :**

- ✓ **EF** : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- ✓ **SA** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

❖ **Bacilles Gram négatif :**

- ✓ **PA** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ✓ cinq pathovars d'*Escherichia coli* à savoir :
 - **EHEC** : *Escherichia coli* entérohémorragique ATCC EDL933 (O157:H7), gènes de virulence : stx (codant pour la toxine : shiga like toxin), ehxA (codant pour une entérohémolysine)
 - **ETEC** : *Escherichia coli* entérotoxinogène ATCC H10407, gène de virulence : elt (codant pour une toxine thermolabile)
 - **EIEC** : *Escherichia coli* entéroinvasive ATCC 11741, gène de virulence : ipaH (codant pour une invasine)
 - **EPEC** : *Escherichia coli* entérotoxinogène ATCC 2348/69 (O127:H6), gènes de virulence : eae (codant pour une intimine), bfpA (codant pour un antigène flagellaire)

- **EAEC** : *Escherichia coli* entéroaggrégative ATCC 17-2, gène de virulence : astA et aaf-I (codant pour le pouvoir aggrégatif caractéristique des ECEA).

➤ **Pour l'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte Mai 2012)**

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte Mai 2012), a été testée vis-à-vis d'une gamme de bactéries, principalement *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Morganella morganii*. Les souches de référence ont été obtenues de l'Institut Pasteur (Alger). Les autres souches sont des isolats, obtenues du laboratoire de Bactériologie, CHU Benbadis de Constantine, en utilisant des méthodes conventionnelles (isolation clinique) (NCCLS, 1993).

VIII.3.2. Préparation des inoculums

Les souches bactériennes sont conservées à +4°C dans la gélose nutritive (GN) inclinée. Une ansée de colonies (deux à trois colonies) est mise dans un tube à vis contenant 5mL de milieu d'enrichissement (bouillon nutritif). Ce dernier est placé dans l'étuve à 37°C et laissé incuber pendant 18 à 24h.

Une suspension de 24 h (37°C) est préparée avec de l'eau distillée, diluée et ajustée à une concentration de 0,5 Mc Farland. Cette dernière correspond, approximativement, à une suspension bactérienne homogène de $1,5 \times 10^8$ cellules par mL (Forbes et al., 1988).

VIII.3.3. Test d'activité antibactérienne par diffusion en milieu solide

Le test de sensibilité des bactéries aux différents échantillons d'étude, est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé en procédant comme suit.

- ✓ Selon la technique d'inondation, chaque souche bactérienne est ensemencée dans le milieu de gélose au sang (GS) ainsi que la gélose nutritive ordinaire (GN). Chaque boîte de Pétri est d'abord écouvillonnée (sous forme de stries serrées) par la souche bactérienne donnée. 1 mL de cette dernière est y ajouté afin que la solution bactérienne couvre toute la surface de la gélose. Après 15 min à température ambiante, temps durant lequel les bactéries se fixent à la surface du milieu de culture, l'excès de la souche bactérienne est jeté. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, trois puits (diamètre 5 mm) par boîte de Pétri y sont creusés.

- ✓ Une solution de 10 mg/mL a été préparée pour les fractions de *T. numidicus*. La solution de solubilisation est constituée de : l'Eau distillée stérile/Ethanol/Tween 20 (8/1/1). Les huiles essentielles des trois espèces de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*), ont été utilisées sans être diluées.
- ✓ 15 µL d'échantillon d'étude sont déposés par puits. Après 30 minutes de prédiffusion des échantillons d'étude à température ambiante, les boîtes de Pétri sont incubées, en position renversée, à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- ✓ Au terme du temps d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition (DZI) sont mesurés en mm à l'aide d'une règle. Selon **Ponce et al. (2003)** et **Moreira et al. (2005)**, le DZI renseigne sur la sensibilité d'une bactérie donnée :
 - non sensible (-) ou résistante : DZI < 8 mm
 - sensible (+) : DZI = 9-14 mm
 - très sensible (++) : DZI = 15-19 mm
 - extrêmement sensible (+++) : DZI > 20 mm.

NB. Le test d'activité antibactérienne par diffusion en milieu solide, peut se réaliser aussi en utilisant la méthode de disques. Cette dernière consiste à imprégner des disques stériles en papier (6 mm de diamètre) d'huile essentielle et la déposer dans la boîte de pétri pour incubation.

VIII.3.4. Evaluation du pouvoir antibactérien

Les échantillons d'étude dont le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8,5 mm, sont sélectionnés pour déterminer, en milieu liquide, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB), par la méthode de microdilution en cascade. Il s'agit ici de déterminer les plus petites concentrations, auxquelles les échantillons d'étude présentent encore une activité antibactérienne visible à l'oeil nu.

VIII.3.4.1. Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)

❖ Préparation de la suspension bactérienne

- ✓ La DO à 600 nm de la suspension bactérienne de chaque souche testée, préalablement incubée pendant 24h, doit être égale à 0,6 (indice de la phase exponentielle de la croissance bactérienne).
- ✓ 2 à 3 mL de cette suspension bactérienne sont mélangés avec 5 mL de bouillon TSA (Trypticase Soja Agar) stérile. La DO est mesurée jusqu'à atteindre la valeur de 0,5 à 0,7 correspondant à la phase de la croissance bactérienne.

❖ Préparation des échantillons d'étude

Une concentration de 10 mg/mL est préparée aussi bien pour les fractions de *T. numidicus* que pour les huiles essentielles des trois espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*). Ces dernières sont solubilisées dans 10% de DMSO, alors que les fractions de *T. numidicus* sont solubilisées dans l'Eau distillée stérile/Ethanol/Tween 20 (8/1/1). Cependant, il y'a une exception pour un échantillon d'étude. En effet, vu la faible masse de la fraction éther de pétrole de *T. numidicus*, une concentration de 2,5 mg/mL est préparée au lieu de 10 mg/mL.

❖ Test de CMI

Une plaque 96 puits (8 lignes, 12 colonnes) est utilisée pour étudier la CMI d'un échantillon d'étude donné (fraction ou huile essentielle), vis-à-vis des 8 souches bactériennes. Pour une souche bactérienne donnée, le protocole est comme suit.

- Déposer 100 µL de 10% de DMSO dans les puits numérotés 3 à 11.
- Déposer 190 µL de 10% de DMSO dans le puits numéro 12.
- Déposer 100 µL d'échantillon d'étude dans les puits numérotés 2 et 3, chacun.

- Prendre 100 μL du puits numéro 3 et les déposer dans le puits numéro 4. Puis prendre 100 μL de ce dernier et les déposer dans le puits numéro 5, et ainsi de suite jusqu'à déposer 100 μL dans le puits numéro 11; prendre 100 μL de ce dernier et les jeter (microdilution en cascade). Le puits numéro 12 ne contient donc pas d'échantillon d'étude.
- Déposer 190 μL de TSA dans le puits numéro 1.
- Déposer 90 μL de TSA dans le reste des puits sauf le puits numéro 12.
- Déposer 5 μL de la bactérie dans les puits numérotés 1 à 12.
- Chaque puits contient donc un volume final de 195 μL . Le puits numéro 1 sert de témoin positif correspondant à la croissance bactérienne (présence de turbidité). Le puits numéro 12 sert de témoin négatif correspondant à l'absence de la croissance bactérienne (absence de turbidité).
- Ainsi chaque ligne de la plaque 96 puits correspond à une bactérie donnée, procéder de la même manière pour le reste des souches bactériennes.
- Fermer la plaque 96 puits, l'agiter un peu et la placer dans un bac contenant du papier imbibé d'eau pour éviter le dessèchement. Incuber dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. Au terme de cette période, faire l'observation.
- Observer la présence ou l'absence de turbidité dans les puits correspondants à une bactérie donnée, testée à différentes concentrations d'échantillon d'étude. Le puits dans lequel la première turbidité est visible à l'œil nu, correspondrait probablement à la CMI. Pour en confirmer, il faut déterminer la CMB.
- Après incubation, la plaque 96 puits peut être observée en lumière avec ou sans addition de MTT (bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényltétrazolium). En cas d'utilisation de ce dernier, une concentration de 5 mg/mL est préparée dans de l'eau distillée stérile. Après dépôt de 5 μL de MTT dans tous les puits de la plaque 96 puits, cette dernière est agitée pendant 30 min à température ambiante puis elle est observée. La coloration des puits renseigne sur la présence ou l'absence de bactérie. Ainsi, une couleur mauve témoigne de la présence de la bactérie en question (présence de turbidité); ceci en se référant au témoin positif de couleur mauve très foncé. Le puits avec une couleur mauve très clair (très légère turbidité) correspondrait à la CMI. La couleur jaune témoigne, par contre, l'absence de bactérie (absence de turbidité), en se référant au témoin négatif.

Les différentes concentrations testées pour nos échantillons d'étude, correspondant aux CMI et CMB, sont consignées dans le **Tableau 8**. Une solution mère de 10 mg/mL est utilisée pour tous les échantillons d'étude sauf pour la fraction éther de pétrole, qui a été étudiée à partir d'une concentration de 2,5 mg/mL.

Tableau 8 : Les différentes concentrations d'échantillons d'étude (en mg/mL) testées pour la détermination de la CMI et la CMB.

P1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P12
TSA + Bc	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	10% D + Bc
TSA + Bc	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	10% D + Bc

P : Puits; **Bc** : Bactérie; **10% D**: 10 % de DMSO

VIII.3.4.2. Détermination de la CMB (concentration minimale bactéricide)

La CMB correspond à la plus petite concentration qui laisse survivre au plus 0,01% des germes de la suspension de départ en 24 heures (**Traoré et al., 2012**).

Ainsi, pour une bactérie donnée et une fois la CMI est estimée, la CMB sera par la suite déterminée pour les puits dans lesquels il y'a absence de turbidité. Le test est fait sur le milieu GS en boîte carrée en procédant comme suit.

- ✓ Afin de tester les 8 souches bactériennes, deux boîtes seront destinées à chaque échantillon d'étude s'il possède une sensibilité vis-à-vis de tous les germes testés. Chacune des boîtes est donc divisée en 4 cadrans, chacun correspondant à une souche bactérienne donnée.
- ✓ Les puits dans lesquels il y'a absence de turbidité seront donc testés. Ainsi, sur la boîte de gélose au sang, chaque puits sera présenté par un trait dans le cadran désigné pour une bactérie donnée.
- ✓ L'anse de platine (en plastique) est trempée dans le premier puits sans turbidité, et est passée une seule fois sur le trait correspondant; idem pour les autres puits sans turbidité, pour une bactérie donnée.
- ✓ Laisser incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures. Au terme de cette période, déterminer la plus faible concentration à laquelle il y a absence de croissance bactérienne.

Autrement dit, déterminer la plus faible concentration d'échantillon d'étude qui détruit 99,9 % de l'inoculum bactérien, ce qui correspond ainsi à la CMB.

VIII.3.5. Effet des antibiotiques (ATB)

La sensibilité des souches bactériennes d'étude a été testée vis-à-vis des antibiotiques (ATB) cités dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Sensibilité des bactéries d'étude aux antibiotiques-contrôles par détermination du diamètre de zone d'inhibition (DZI) en mm.

	EHEC	ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	SA	PA	EF
CAZ	22	23,5	31,5	21,5	32,5	27	22	18
MA	22	22,5	32,5	24	35,5	18,5	29,5	19,5
AMC	30	28	28	38,5	32	24	24,5	30
GEN	26,5	22,5	0	24,5	26	0	37	20,5

CAZ : Ceftazidime 30µg; **MA** : Cefamandole 30µg; **AMC** : Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg; **GM** : Gentamycine 500µg (10UI)

Rq : Les antibiotiques testés ont été choisis en fonction de leur utilisation et de leur disponibilité au laboratoire de microbiologie au CHU de Monastir, TUNISIE.

❖ Méthode utilisée

La méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques. Après la préparation des inoculums et l'ensemencement de la gélose par inondation, l'excès du liquide est jeté, et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à température ambiante.

A l'aide d'un distributeur de disques, les différents disques d'ATB choisis, sont placés sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri ont été laissées durant 20 minutes à température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles ont été ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Au terme de cette période, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) autour du disque.

❖ Caractéristiques des Antibiotiques-contrôles utilisés

Le tableau ci-après présente les familles à lesquelles appartiennent les antibiotiques-contrôles, utilisés dans notre expérimentation, ainsi que leurs spectres antibactériens.

Tableau 10 : Caractéristiques des Antibiotiques-contrôles utilisés.

Antibiotiques-contrôles	Famille d'antibiotique	Spécure antibactérien
CAZ : Ceftazidime 30µg	Antibiotique bactéricide de synthèse de la classe des Céphalosporines de troisième génération, appartenant à la famille des β-lactamines.	Possède un large spectre qui lui confère une activité sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il a une activité très remarquable sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
MA : Cefamandole 30µg	Antibiotique de la classe des Céphalosporines de deuxième génération, appartenant à la famille des β-lactamines.	Possède une activité bactéricide sur les staphylocoques, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et sur les entérobactéries dont <i>Escherichia coli</i> .
AMC : Amoxicilline+clavulanate 20/10µg	Antibiotique bactéricide du sous-groupe des Aminopénicillines, du groupe des Pénames, de la famille des β-lactamines (<i>Mohammedi</i>).	Agit sur les streptocoques β-hémolytiques, les <i>Streptococcus pneumoniae</i> (pneumocoque). De façon générale, cet antibiotique agit sur les espèces à Gram positif ainsi que sur certaines espèces à Gram négatif.
GM : Gentamycine 500 10UI	Antibiotique de la famille des Aminoglycosides.	Utilisée pour traiter divers types d'infections bactériennes, en particulier celles provoquées par des bactéries à Gram négatif.

VIII.4. Détermination des activités cytotoxique et antivirale

L'activité antivirale des huiles essentielles des deux espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus* de la collecte de Mai 2010) ainsi que les fractions de *T. numidicus*, a été évaluée vis-à-vis de la souche coxsackievirus B3 (CV-B3). L'activité cytotoxique déterminée sur les cellules non cancéreuses Vero, est réalisée préalablement aux tests antiviraux.

VIII.4.1. Détermination de l'activité cytotoxique

L'étude de l'activité cytotoxique, vis-à-vis des cellules Vero, des huiles essentielles des deux espèces endémiques Algériennes de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*) ainsi que les fractions de *T. numidicus*, est réalisée préalablement au test antiviral afin de déterminer les doses non cytotoxiques pour ce test.

VIII.4.1.1. Lignée cellulaire Vero

Dans notre étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire Vero fournie par l'American Type Culture Collection (ATCC No. CCL-81).

La lignée Vero fut isolée à partir de cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain (*Chlorocebus* esp.; précédemment nommée *Cercopithecus aethiops*, ce groupe de singes ayant été subdivisé en plusieurs espèces différentes). La lignée a été développée le 27 mars 1962, par Yasumura et Kawakita à l'Université de Chiba à Chiba, au Japon (*Yasumura & Kawakita, 1963*). La souche originale fut nommée « Vero » d'après l'abréviation de « Verda Reno », qui signifie « rein vert » en espéranto, tandis que « Vero » signifie « vérité » dans cette même langue (*Shimizu, 1993*).

La lignée cellulaire Vero est continue et aneuploïde. Une lignée cellulaire continue peut être répliquée de multiples fois sans devenir sénescence (*MTCC*). L'aneuploïdie est la propriété de posséder un nombre anormal de chromosomes.

Les cellules Vero sont déficientes en interféron; contrairement aux cellules mammaliennes normales, elles ne sécrètent pas d'interféron de type 1 une fois infectées par des virus (*Desmyter et al., 1968*). Cependant, elles ont toujours le récepteur interféron-alpha/beta et répondent donc normalement lorsque de l'interféron d'une autre source est ajouté à la culture.

VIII.4.1.2. Culture cellulaire de la lignée Vero

Des cellules Vero au 30^{ème} passage et à concentration initiale de 10⁷ cellules/mL, sont entretenues au Laboratoire des Maladies Transmissibles et des Substances Biologiquement Actives (Faculté de Pharmacie, université de Monastir, TUNISIE). Les cellules ont été décongelées, et cultivées dans un flasque IWAKI (75 cm²). Le milieu de culture employé est un milieu RPMI 1640 without L-Glutamine (BioWest, France) supplémenté par :

- 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (source de facteurs de croissance indispensable), décomplémenté à 56°C pendant 30 min au bain-marie (SVF, Gibco, Invitrogen, France);
- 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels (2 mM L-glutamine, Gibco, Invitrogen, France);
- 1% (v/v) de bicarbonates de sodium (Gibco, Invitrogen, France);
- 1% (Pénicilline (100 U/mL) / streptomycine (100 µg/mL)] (Gibco, Invitrogen, France).

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, elles ont été lavées avec 2 mL du tampon phosphate PBS (9,6 g/L, pH 7,2) et détachées par trypsinisation (1 à 3 mL de solution de trypsine diluée au 1/10^{ème} par HBSS), après une incubation de 1 à 3 min à 37°C et 5% de CO₂, dans un incubateur (Sanyo, MCO-20AIC).

L'action de la trypsine est stoppée par ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal (10%); les cellules se retrouvent alors en solution. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 2000 tr/min pendant 5 min, et sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, sous microscope optique en phase inverse (Zeiss, Allemagne). Ce comptage permet de déterminer le nombre de cellules afin d'effectuer le passage suivant. La suspension cellulaire sert à réensemencer d'autres flacons de culture, à raison de 10⁵ cellules/mL dans des flasques de 25 cm², afin de servir pour les diverses expérimentations ou, éventuellement, congelées par cryogénéisation dans l'azote pour y être conservées.

Le nombre de passages ou repiquages des cellules doit être comptabilisé, dans la mesure où il peut influencer le temps de multiplication des cellules et leurs capacités métaboliques : l'utilisation de cellules issues de nombreux repiquages successifs est évitée.

Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO₂. En vue d'assurer l'apport en nutriments aux cellules et

d'éliminer les endotoxines cellulaires susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire, un changement de milieu de culture est nécessaire toutes les 48 h. La croissance des cellules est mesurée quotidiennement à l'aide d'un microscope en phase inverse. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence où une concentration de $0,6 \times 10^5$ cellules/cm², au moins, est atteinte. La suspension cellulaire est diluée afin d'ensemencer une microplaque 96 puits à raison de 5×10^4 cellules/puits.

VIII.4.1.3. Conservation des cellules

VIII.4.1.3.1. Congélation

La congélation des cellules Vero dans l'azote liquide à -196°C, s'effectue sur une population cellulaire en phase exponentielle de croissance.

Toutes les étapes de la congélation, sont effectuées dans la glace pour limiter l'effet cytotoxique du DMSO (diméthyl-sulfoxyde, Fluka). La suspension de cellules Vero est centrifugée (5min à 1000 tours/min) et le culot est repris dans un volume de milieu de culture (RPMI 1640), afin de congeler 7×10^6 cellules par cryotube; sachant que chaque cryotube contient 0,9 mL de milieu de culture auquel est ajouté 0,1 mL de DMSO, agent cryoprotecteur ajouté goutte à goutte.

Une fois ces étapes réalisées, les cryotubes sont placés dans un congélateur -20°C pendant 2 à 4 heures. Par la suite, les cryotubes sont transférés dans un congélateur -80°C pendant 48 heures. Ces étapes sont réalisées pour congeler progressivement les cellules afin de limiter au maximum la mort cellulaire. Les cryotubes sont stockés par la suite dans une cuve d'azote liquide à -196°C.

VIII.4.1.3.2. Décongélation

Pour effectuer une culture cellulaire à partir d'un des cryotubes conservés dans l'azote liquide, on procède à sa décongélation rapide à 37°C dans un bain-marie, pour éviter aux cellules un contact prolongé avec le DMSO fortement cytotoxique. La suspension décongelée est reprise dans 9 mL du milieu préchauffé (RPMI 1640). Après centrifugation à 1000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant contenant le DMSO est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais. Après homogénéisation, les cellules sont remises en culture à 37°C. Le milieu de culture est périodiquement renouvelé jusqu'à la confluence des cellules.

VIII.4.1.4. Test de cytotoxicité par la technique du MTT

Le test de viabilité permet de déterminer le nombre de cellules vivantes en fin d'expérience. La quantité de cellules des puits "essais" soumis à l'échantillon d'étude, est comparée aux puits "témoins" (sans l'échantillon d'étude). Ainsi, il est possible de déterminer les effets de la viabilité (effet cytotoxique), et à quelle concentration l'échantillon d'étude est efficace et ce en déterminant la CI_{50} , qui correspond à la concentration à laquelle l'échantillon d'étude est capable d'inhiber 50% du nombre des cellules vivantes Vero. La réduction, principalement par les déshydrogénases mitochondriales actives, des sels de tétrazolium de couleur jaune en cristaux de formazan violets, pourra être évaluée spectrophotométriquement à 540 nm. Cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes.

En pratique, les cellules sont réparties sur une microplaque 96 puits (Nunc, Danemark) (8×12), à fond plat et à raison de 5×10^4 cellules dans 200 μ L de milieu de culture par puits. La microplaque est incubée à 37°C, dans une atmosphère enrichie de 5% de CO_2 , pendant 24h.

Au terme de cette période, un tapis cellulaire adhérent est obtenu et les différentes concentrations d'échantillons d'étude sont ajoutées, après avoir vidé la plaque 96 puits par retournement. La première colonne de la microplaque sert de référence (milieu sans cellules), la deuxième colonne sert de témoin (sans ajout d'échantillons d'étude testés, 200 μ L de milieu de culture par puits) et la troisième colonne sert aussi de témoin pour tester l'influence du solvant utilisé pour la solubilisation des échantillons d'étude (sans échantillons d'étude testés, 200 μ L par puits : 50 μ L de la solution de la solubilisation + 150 μ L de milieu de culture). Les autres colonnes sont utilisées pour mesurer l'effet des différentes concentrations d'échantillons d'étude testés (200 μ L par puits).

Après 48h d'incubation (37°C, 5% CO_2), les puits sont vidés, lavés au PBS (150 μ L par puits), puis 150 μ L de RPMI + 50 μ L de MTT (à 2g/L) sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 4h à 37°C et 5% de CO_2 . Au terme de cette période d'incubation, les puits sont vidés, lavés au PBS et les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans 200 μ L d'isopropanol. Agiter quelques instants la plaque 96 puits et lire la plaque dans 15 à 20 min au lecteur de plaques Multiscan (spectrophotomètre, Titertek, MCC/340), afin de mesurer l'absorbance de MTT dans chaque puits à 540 nm.

La mesure de l'activité mitochondriale des cellules après traitement par la dose choisie d'échantillons d'étude, par rapport à l'activité mitochondriale des cellules non traitées, permet d'évaluer indirectement la cytotoxicité de ces échantillons d'étude. Le pourcentage de viabilité est calculé d'après cette équation :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Abs}_{\text{Essai}}}{\text{Abs}_{\text{Témoin}}} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{Témoin}}$ = absorbance de l'essai témoin non traité par les échantillons d'étude

$\text{Abs}_{\text{Essai}}$ = absorbance de l'essai traité par les échantillons d'étude

Le pourcentage d'inhibition est par la suite déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - \% \text{ de viabilité}$$

Ce qui permet de calculer la CC_{50} correspondant à la concentration cytotoxique qui donne 50% d'inhibition des cellules Vero.

VIII.4.2. Détermination de l'activité antivirale

VIII.4.2.1. Multiplication de la souche virale

La souche de coxsackievirus B3 (CV-B3) utilisée est la souche de référence Nancy. Le CV-B3 est multiplié sur des cellules Vero dans un flasque de 25 cm². Celui-ci est débarrassé de son milieu de culture et remplacé par 1 mL de la suspension virale (après décongélation du CV-B3 qui était conservé à - 20°C). Le flasque est, par la suite, incubé entre 30 et 45 min à 37°C et 5% CO₂. Une fois le temps nécessaire est écoulé, 9 mL de milieu de survie sont ajoutés. Le milieu de survie avec BME diffère du milieu de culture avec RPMI par le taux de sérum de veau fœtal : 1 à 3%. Le flasque est de nouveau incubé à 37°C et 5% CO₂ tout en surveillant, pendant 5 jours, l'état des cellules jusqu'à l'apparition de l'Effet CytoPathogène (ECP) caractéristique du CV-B3. L'ECP se manifeste par l'arrondissement et la chute des cellules, avec refoulement des noyaux au niveau des membranes cellulaires.

Afin de libérer les particules virales, les cellules Vero sont éclatées par une série de congélation/décongélation. L'extrait cytoplasmique est centrifugé (à 1500 tour/min, pendant 10 min) et le surnageant, contenant le virus, est récupéré puis aliquoté et stocké à -20°C .

VIII.4.2.2. Titrage de la souche virale

Le titrage de la souche virale est réalisé sur une plaque 96 puits à fond plat, préparée de la même manière que pour le test de cytotoxicité, contenant des cellules en monocouche confluente. Des dilutions décimales sont préparées à partir de la suspension virale initiale. L'inoculation du virus se fait sur des cellules Vero dépourvues de leur milieu de culture.

Chaque dilution est répartie dans six puits d'une même colonne, à raison de 100 μL /puits. La première colonne est réservée pour les cellules témoins non infectées par le virus et ne contenant que le milieu de survie. La plaque est incubée à 37°C et 5% CO_2 et contrôlée toutes les 24 heures (observation pendant 5 jours au microscope optique, objectif 10 et 40), en notant à chaque fois le nombre de puits montrant un ECP.

Une fois l'ECP cesse de progresser (entre 5 à 7 jours), le titre infectieux du virus est évalué selon la méthode de **Reed & Muench (1938)**. Le titre du virus est exprimé par DICT_{50} (Dose Infectieuse sur Culture de Tissu); elle représente la dilution de la suspension virale pour laquelle 50% des cellules dégèrent.

La distance proportionnelle X entre les deux dilutions critiques à laquelle se situe la DICT_{50} , est obtenue par la formule suivante :

$$X = \frac{D > 50\% - 50}{D > 50\% - D < 50\%}$$

D > 50% : La dilution entraînant une dégénérescence immédiatement supérieure à 50%.

D < 50% : La dilution entraînant une dégénérescence immédiatement inférieure à 50%.

L'exposant de la dilution létale 50 (DL_{50}) ou DICT_{50} (en valeur absolue), correspond à la dilution donnant une dégénérescence immédiatement supérieure à 50% augmenté du produit de la distance proportionnelle X par le logarithme du facteur de dilution.

VIII.4.2.3. Le test antiviral

Pour inhiber la reproduction virale, l'échantillon d'étude (extrait ou huile essentielle de la plante étudiée) peut agir à un certain niveau de la reproduction elle-même, ou bien au niveau de l'adsorption, ou bien lors de la pénétration du virus au niveau de la cellule.

Pour déterminer le stade au niveau duquel l'échantillon d'étude pourrait intervenir, trois types de tests ont été réalisés :

- ✓ Contact entre le virus et l'échantillon d'étude avant inoculation aux cellules Vero. Ce test nous a permis de savoir si l'échantillon d'étude en question, est capable d'altérer l'intégrité du virus et l'empêcher, ainsi, de réaliser son processus infectieux.
- ✓ Contact entre les cellules Vero et l'échantillon d'étude avant l'addition du virus. Ainsi, l'échantillon d'étude a la possibilité d'agir sur les récepteurs cellulaires et peut, donc, empêcher l'adsorption et la pénétration du virus dans la cellule. Dans les deux cas, l'échantillon d'étude va empêcher l'adsorption et, donc, la pénétration du virus dans la cellule.
- ✓ Contact entre les cellules Vero et la suspension virale avant l'ajout de l'échantillon d'étude. Dans ce cas, le virus a suffisamment de temps pour pénétrer dans la cellule et commencer son processus répliatif. L'inhibition de la multiplication virale, après l'ajout de l'échantillon d'étude, pourrait être attribuée au blocage de la multiplication virale par cet échantillon d'étude.

Ces trois tests ont été appliqués sur le CV-B3 et les échantillons d'étude dont la cytotoxicité a été déjà étudiée précédemment. Nous n'avons retenu que les concentrations des échantillons d'étude (extraits ou huiles essentielles) tolérables par les cellules Vero (taux de viabilité cellulaire compris entre 90 et 100 %).

VIII.4.2.3.1. Incubation de l'échantillon d'étude avec la suspension virale

Les différentes concentrations de l'échantillon d'étude (**E**) ont été mises en contact avec la suspension virale (**V**) à 100 DICT₅₀/mL, à volume égal (50:50). Le mélange est incubé à 37°C et 5% CO₂ pendant 1h30 min, puis inoculé aux cellules Vero en culture (**C**), présentant une nappe confluente, à raison de 200 µL/puits. Les cellules sont réincubées (à 37°C et 5% CO₂) pendant 5 à 7 jours en les surveillant, constamment, jusqu'à l'apparition d'un ECP total au niveau du témoin viral (témoin positif). Ce test est codé comme suit : [(E+V)+C].

VIII.4.2.3.2. Incubation des cellules avec l'échantillon d'étude

Les cellules Vero (**C**) sont débarrassées de leurs milieu de culture, puis incubées en contact avec les différentes concentrations de l'échantillon d'étude (**E**) à tester (100 µL/puits), durant 1h30 min à 37°C et 5% CO₂. Par la suite, 100 µL de la suspension virale (**V**) sont ajoutés dans chaque puits, et les plaques sont réincubées (à 37°C et 5% CO₂) et contrôlées pendant 5 à 7 jours, jusqu'à l'apparition de l'ECP viral au niveau du témoin viral (témoin positif). Ce test est codé comme suit : [(C+E)+V].

VIII.4.2.3.3. Incubation des cellules avec la suspension virale

Les cellules Vero (**C**) sont infectées par la suspension virale (**V**) à raison de 100µL/puits et incubées, pendant 1h30min, à 37°C et 5% CO₂. Par la suite, les différentes concentrations de l'échantillon d'étude (**E**) sont ajoutées (100µL/puits). Laisser incubé à 37°C et 5% CO₂, durant 5 à 7 jours, jusqu'à l'apparition d'un ECP total au niveau du témoin viral (témoin positif). Ce test est codé comme suit : [(C+V)+E].

Ces trois protocoles ont été pratiqués en duplicate. A chaque test, nous avons pris comme témoin négatif, des cellules Vero ne contenant que du milieu de survie seul et comme témoin positif, des cellules Vero infectées par le virus à une même concentration que celle utilisée dans le test. L'absence de l'ECP à une certaine concentration de l'échantillon d'étude, au moment où le témoin viral manifeste un ECP, nous indique que l'échantillon d'étude en question possède une activité antivirale à cette concentration.

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 1

**Evaluation des activités biologiques de quatre
espèces endémiques de *Thymus* poussant en Algérie**

Les plantes médicinales sélectionnées pour cette étude sont des espèces endémiques du genre *Thymus* (**T**) (famille des Lamiaceae), largement utilisées en médecine traditionnelle Algérienne et faiblement étudiées, à savoir : *T. numidicus*, *T. guyonii*, *T. ciliatus* et *T. hirtus*.

Vu les vertus biologiques aussi bien des **huiles essentielles** que des **extraits** de thym, comme il a été rapporté en littérature, les buts de cette présente étude sont comme suit : **(1)** étudier les activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale des **huiles essentielles** d'espèces endémiques de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*); **(2)** déterminer l'activité antioxydante des **extraits** d'espèces endémiques de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. ciliatus*) qui ont été comparés à ceux de *Thymus vulgaris* (*T. vulgaris*, *Tv*), espèce de référence de ce genre; **(3)** évaluer la corrélation entre les propriétés antioxydantes et le contenu phénolique des **extraits**; **(4)** étudier l'effet des **extraits** de *Thymus* sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, via l'essai de MTT.

Chapitre 1.1

**Analyse GC-MS et évaluation des activités
biologiques des huiles essentielles de trois espèces
endémiques de *Thymus* poussant en Algérie**

La valorisation des ressources naturelles végétales, passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (HE). Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutées, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires (**Amarti et al., 2011**). Le genre *Thymus* englobe de nombreuses espèces et variétés, et la composition chimique des HE de certaines d'entre elles a été étudiée depuis longtemps (**Papageorgio, 1980; Baser et al., 1992; Vila et al., 1995; Baser et al., 1998; Guillen & Manzanos, 1998; Loziene et al., 1998; Saez, 1998; Tumen et al., 1998**). Les huiles essentielles de plusieurs espèces de thym sont investiguées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (**Amarti et al., 2008; De Martino, 2009; Cetin et al., 2011**) ainsi que leurs activités antioxydante (**Hazzit et al., 2006; Ložienė et al., 2007; Tepe et al., 2011**), antiproliférative (**Jaafari et al., 2007; Çetinus et al., 2013**) et antivirale (**Astani et al., 2010; Behravan et al., 2011**).

Afin de déterminer le potentiel, en terme d'activité, des **huiles essentielles** des trois espèces endémiques de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*), nous avons commencé, d'abord, par déterminer leurs compositions chimiques par GC-MS. Par la suite, nous avons étudié leurs activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale.

Les profils chimiques des huiles essentielles de *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus* ont été déjà rapportés (**Kabouche A et al., 2005; Kabouche Z et al., 2005; Hazzit et al., 2006; Ben Bnina et al., 2009**). Cependant, peu de travaux ont été consacrés à l'étude du profil biologique plus ou moins complet des huiles essentielles des plantes suscitées. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée auparavant sur l'activité antiproliférative de ces huiles.

Nous avons mesuré la capacité des huiles essentielles de *T. guyonii* et *T. hirtus* (collecte de Mai 2010) à inhiber le radical stable DPPH, alors que le potentiel antioxydant de l'huile essentielle de *T. numidicus* (collecte de Mai 2012), a été déterminé par le test de blanchissement du β -carotène. L'activité antiproliférative a été testée vis-à-vis de la lignée du cancer colorectal humain HT-29, par la technique du MTT.

L'effet antibactérien des huiles essentielles de *T. guyonii* et *T. hirtus* (collecte de Mai 2010), sur la croissance de huit souches bactériennes différentes, a été évalué *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu solide, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne, DZI, (cf. Matériels & Méthodes). Ce même type d'effet a été

investigué pour l'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012 et ce sur la croissance de neuf souches bactériennes différentes.

L'effet antiviral vis-à-vis du virus CV-B3 (la souche de coxsackievirus B3) a été également testé. Pour inhiber la reproduction virale, l'huile essentielle de la plante étudiée peut agir à un certain niveau de la reproduction elle-même, ou bien au niveau de l'adsorption, ou bien lors de la pénétration du virus au niveau de la cellule. Ces trois tests antiviraux ont été appliqués sur le CV-B3 et les huiles essentielles dont la cytotoxicité, vis-à-vis des cellules non cancéreuses Vero, a été déjà étudiée préalablement (cf. Matériels & Méthodes).

I. Analyse GC-MS

I.1. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte de Mai 2012)

Les composés obtenus de l'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte de Mai 2012), listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Composition chimique (%) de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. numidicus* (Collecte de Mai 2012).

N°	IR	Composé	%
1	930	α -thujène	1,70
2	937	α -pinène	1,46
3	979	1-octen-3-ol	2,47
4	989	β -myrcène	2,62
5	1002	α -phellandrene	0,29
6	1004	<i>cis</i> -4-carene	1,85
7	1026	<i>o</i>-cymène	11,41
8	1029	D-limonène	0,38
9	1031	δ -3-carene	0,10
10	1058	1-nonen-3-ol	0,23
11	1060	γ-terpinène	10,84
12	1068	1-octanol	0,21
13	1090	<i>trans</i> -sabinène hydrate	0,98
14	1097	Linalool	17,20
15	1126	Campholénal	0,11
16	1139	<i>trans</i> -pinocarvéol	0,24
17	1143	<i>trans</i> -verbenone	1,18
18	1146	Camphor	0,84
19	1169	Borneol	1,02
20	1177	Terpine-4-ol	1,20
21	1189	α -terpineol	0,64
22	1191	Myrtenol	0,23
23	1235	Thymol methyl ether	6,73
24	1290	Thymol	23,92
25	1294	Carvacrol	6,02

26	1409	Z-caryophyllene	0,88
27	1460	Alloaromadendrene	0,57
28	1480	g-muurolene	0,21
29	1514	g-cadinene	0,61
30	1569	Ledol	0,17
31	1583	Caryophyllene oxide	0,34
32	1640	t-cadinol	1,13
33	1648	Agarospinrol	0,19
34	1868	Diisobutylphtalate	0,20
Composés identifiés (%)			98,14

IR : Indice de rétention.

34 composants représentant 98,14 % de l'huile essentielle de *T. numidicus*, ont été détectés (**Tableau 11**) avec comme composants majeurs le **thymol (23,92 %)**, le **linalool (17,20 %)**, l'**o-cymène (11,41 %)**, le **γ -terpinène (10,84 %)**, le **thymol méthyl éther (6,73 %)** et le **carvacrol (6,02 %)** (Zeghib A et al., 2013).

Le **Tableau 12** permet de comparer, entre autres, les composés majoritaires trouvés dans *T. numidicus* (collecte de **Mai 2012**) avec d'autres populations de cette espèce endémique.

La présente composition est différente de celle rapportée antérieurement pour cette huile essentielle de *T. numidicus* collectée, 10 ans auparavant (en **Mai 2002** à une altitude de 800 m), au même endroit et étudiée dans notre laboratoire de recherche. Le **thymol** et le **carvacrol** étaient les composés majoritaires (**68,2** et **16,9 %**, respectivement) parmi 40 composés représentant 99,7 % de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. numidicus* (Kabouche Z et al., 2005).

Hazzit et al. (2006) rapportent 53 composés représentant 97,7 % pour l'huile essentielle de *T. numidicus* de la région de la Kabylie (forêt de Yakouren, Azzazga), récoltée en Juillet 2004 durant la phase de floraison. Cette huile est majoritairement composée de **p-cymène (6,7 %)**, **γ -terpinène (8,4 %)**, **α -terpinéol (34,4 %)**, **thymol (15 %)** et **carvacrol (6,8 %)**. Cette même équipe de recherche (**Hazzit & Baaliouamer, 2007**), rapporte que le **carvacrol (28,1 %)** et le **p-cymène (8,0 %)** sont prédominants dans l'huile essentielle de *T. numidicus* de la région de la Kabylie (Algérie).

Laouer et al. (2009) ont étudié les huiles essentielles de deux populations de *T. numidicus* **Poiret**, différenciées par la couleur des fleurs. 42 composants ont été identifiés par GC et GC-MS, représentant plus de 97 % de l'huile essentielle. Les composants majeurs des deux huiles essentielles sont le **thymol (59,0%; 68,0%)**, le **γ -terpinène (8,5%; 4,2%)**, le **p-cymène (5,8%; 4,5%)**, le **carvacrol (3,7%; 4,2%)** et l' **α -pinène (5,3%; 3,5%)** (Variétés blanc violacé et violet, respectivement).

Les composés **thymol/carvacrol** présents dans la population *T. numidicus* de Djebel El Ouahch (collecte de **Mai 2012**), sont trouvés avec des pourcentages respectifs de **23,92** et **6,02 % (Zeghib A et al., 2013)**. 10 ans auparavant (**Mai 2002**), **thymol/carvacrol** étaient les composés majoritaires avec des pourcentages 3 fois supérieurs (**68,2** et **16,9 %**, respectivement) (**Kabouche Z et al., 2005**) à ceux de l'huile essentielle de cette espèce endémique collectée en **Mai 2012**.

Les deux composés suscités (**thymol/carvacrol**) sont trouvés conjointement dans cinq sur six (5/6) populations de *T. numidicus* (**Tableau 12**), alors que le **carvacrol** seul, présente le composant prédominant de la population de la région de la Kabylie (**Hazzit & Baaliouamer, 2007**).

Le composant **o-cymène**, qui était absent dix ans auparavant (**Mai 2002**) dans *T. numidicus* (**Kabouche Z et al., 2005**), a commencé à être synthétisé en quantité appréciable (**11,41 %**) par cette espèce endémique de la collecte de **Mai 2012**. Cette dernière possède exclusivement ce composant par comparaison aux autres populations de cette espèce endémique.

Nos résultats montrent la présence exclusive de **linalool (17,20 %)** dans *T. numidicus* de Djebel El Ouahch (collecte de **Mai 2012**), par comparaison aux autres populations de cette espèce endémique.

Le composant **γ -terpinène (10,84 %)** trouvé dans l'huile essentielle de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch (collecte de **Mai 2012**), se rencontre aussi dans celles de la population de la région de la Kabylie (forêt de Yakouren, Azzazga) avec **8,4 % (Hazzit et al., 2006)** et des deux populations étudiées par **Laouer et al. (2009)**, différenciées par la couleur des fleurs, avec des pourcentages de **8,5** et **4,2 %**, variétés blanc violacé et violet, respectivement.

Le composant **thymol méthyl éther (6,73 %)** trouvé dans l'huile essentielle de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch (collecte de **Mai 2012**), se rencontre aussi dans celle de la population de la région de la Kabylie (forêt de Yakouren, Azzazga) avec un taux presque 3 fois moins (**2,6 %**) (**Hazzit et al., 2006**).

ZEGHIB ASSIA

Tableau 12 : Recherche de similarités de composés majoritaires trouvés dans *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus* avec d'autres espèces du genre *Thymus*.

Espèces et Origines	Composés majoritaires trouvés dans <i>T. numidicus</i> , <i>T. guyonii</i> et <i>T. hirtus</i> (%)										
	α -Pinène	Camphène	α -Cymène	Eucalyptol	δ -Terpinène	2-Bornanone	Thymol	Carvacrol	Linalool	γ -Terpinène	Thymol méthyl éther
<i>T. numidicus</i> (Mai 2012) (Zeghib A et al., 2013)	-	-	11,41	-	-	-	23,92	6,02	17,20	10,84	6,73
<i>T. guyonii</i> (Mai 2010)	0,69	-	9,69	-	5,73	-	21,18	55,60	-	-	-
<i>T. hirtus</i> (Mai 2010)	9,46	5,38	1,24	34,62	-	18,55	-	-	-	-	-
<i>T. numidicus</i> (Poiret) (Constantine, Algérie) (Kabouche A et al., 2005)							68,2	16,9			
<i>T. numidicus</i> (Poiret) Forêt de Yakouren, Azzazga, région de la Kabylie, Algérie (Hazzit et al., 2006)	2,5						15	6,8		8,4	2,6
<i>T. numidicus</i> Poiret (Kabylie, Algérie) (Hazzit & Baalouamer, 2007)								28,1			
<i>T. numidicus</i> Poiret (variété blanc violacé) (Laouer et al., 2009)	5,3						59,0	3,7		8,5	
<i>T. numidicus</i> Poiret (variété violette) (Laouer et al., 2009)	3,5						68,0	4,2		4,2	
<i>T. hirtus</i> Willd. (Fleurs) (Monastir, Tunisie) (Ben Bnina et al., 2009)	25,7	4,5		10,9					1,5	0,4	
<i>T. hirtus</i> Willd. (Parties aériennes) (Monastir, Tunisie) (Ben Bnina et al., 2009)	10,4	2,6		9,6					1,5	0,4	
<i>T. guyonii</i> de Noé (Zelfana, Ghardaia, Algérie) (Lehbili et al., 2013)							19,51	55,55			
<i>T. guyonii</i> de Noé (Djelfa, Algérie) (Hazzit et al., 2006)							10,9	4,2	6,1	13	10,7
<i>T. vulgaris</i> L. (Espagne) (Arraiza et al., 2009)							36,3 - 47,5			5,3-16,2	
<i>T. vulgaris</i> (Pavela, 2009)							60,3				
<i>T. vulgaris</i> L. (Albanie) (Asllani & Toska, 2003)							21,38 - 60,15	1,15 - 3,04		4,20- 27,62	
<i>T. vulgaris</i> L. (Allemagne) (Stoilova et al., 2008)							49,6	4,0	4,6	8,0	
<i>T. vulgaris</i> L. (Cuba) (Martinez-Perez et al., 2007)							37,4				
<i>T. vulgaris</i> L. (Hollande) (Raal et al., 2005)							65,5				
<i>T. vulgaris</i> L. (Estonia) (Raal et al., 2005)							75,7				
<i>T. vulgaris</i> L. (Grèce) (Raal et al., 2005)								83,5			
<i>T. vulgaris</i> L. (Arménie) (Raal et al., 2005)				4,0			17,0				
<i>T. albicans</i> Hoffm. et Link (Portugal) (Miguel et al., 2004)	1,7 - 4,3			42,1 - 67,9					30,3- 36,9		
<i>T. algeriensis</i> (Maroc) (El Ajjouri et al., 2010)	20,5										
<i>T. baicalensis</i> Serg. (Buryat Republic, Russia)								11,0-28,3		9,3-14,3	

<i>T. serpyllum</i> L. ssp. <i>serpyllum</i> var. <i>serpyllum</i> (Lithuanie) (Mockute & Bernotiene, 2004)		4,2-8,2		8,9 - 13,9						
<i>T. schimperi</i> Ronninger (Ethiopie) (Asfaw et al., 2000)						6 - 38	5 - 63		8-17	
<i>T. serrulatus</i> Hochst. ex Benth. (Ethiopie) (Asfaw et al., 2000)							49		13	
<i>T. spathulifolius</i> (Hauskn. and Velen.) (Sokmen et al., 2004)						36,5	29,8		6,3	
<i>T. transcaspicus</i> Klokov (Iran) (Miri et al., 2002)						56,4	7,6		7,7	
<i>T. trautvetteri</i> Klokov & Desj. – Shost (Ardabil province, Persian) (Shahnazi et al., 2007)	5,29					24,43	5,07		7,78	
<i>T. villosus</i> subsp. <i>Lusitanicus</i> (Espagne) (Salas et al., 2011)									49,6	
<i>T. X-porlock</i> (Rasooli & Owlia, 2005)				1,7		31,7				
<i>T. zygis</i> (Maroc) (Amarti et al., 2011)			32,02			33,02	2,69	3,99		
<i>T. zygis</i> subsp. <i>Sylvestris</i> (Iberian) (Goncalves et al., 2010)						23,8	25,0	30,0		
<i>T. zygoides</i> var. <i>lycaonicus</i> (Grèce) (Tzakou & Couladis, 2008)						19,5			17,2	
<i>Thymbra capitata</i> (Portugal) (Bentes et al., 2009)							75			
<i>Thymbra capitata</i> (Miguel et al., 2005)							72			

I.2. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de *T. hirtus*

Les composés identifiés dans l'huile essentielle des parties aériennes fraîches de *T. hirtus* (Collecte de Mai 2010) sont listés, selon leur ordre d'élution dans la colonne, dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Composants des huiles essentielles (%) des parties aériennes de deux espèces de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*).

N°	Composé	TR (min)	%	
			<i>T. guyonii</i>	<i>T. hirtus</i>
1	Triethyl borate	4,142	0,46	0,55
2	Tricyclene	7,868	-	0,26
3	trans-Thujene	7,965	0,15	-
4	α-Pinene	8,162	0,69	9,46
5	Camphene	8,575	-	5,38
6	β -Phellandrene	9,108	0,06	0,56
7	β -Pinene	9,225	-	1,49
8	1-Octen-3-ol	9,265	0,16	-
9	3-Octanone	9,392	0,14	-
10	β -Myrcene	9,478	0,77	-
11	α -Terpinene	10,082	0,69	-
12	α-Cymene	10,265	9,69	1,24
13	D-Limonene	10,342	0,17	0,83
14	Eucalyptol	10,458	-	34,62
15	δ-Terpinene	10,938	5,73	-
16	trans-4-thujanol	11,155	0,07	0,59
17	1-Nonen-3-ol	11,322	0,10	-
18	Verbenol	11,465	-	0,71
19	Benzofuran, octahydro-6-methyl-3-methylene-	11,522	-	0,15
20	Linalool	11,672	1,15	1,47
21	α -Pinene oxyde	11,752	-	1,03
22	Oxide de limonène	11,918	-	0,33
23	1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	12,118	-	0,21
24	α -Campholenal	12,215	-	0,44
25	Nopinone	12,425	-	0,18
26	trans-Pinocarveol	12,488	-	0,96
27	Cis-verbenol	12,542	-	3,28
28	2- Bornanone	12,635	-	18,55
29	2,6-Heptadienal, 2,4-dimethyl-	12,755	-	0,24
30	Pinocarvone	12,852	-	0,39
31	Isoborneol	13,025	-	1,55
32	D-Pinocamphone	13,075	-	0,16
33	p-Cymen-8-ol	13,095	-	0,75

34	Terpinen-4-ol	13,148	0,51	0,91
35	α -Terpineol	13,418	-	0,99
36	Acetic acid, octyl ester	13,518	-	0,11
37	2-Pinen-4-one	13,605	-	2,79
38	neo-iso-Verbenol acetate	13,732	-	0,12
39	Isothymol methyl ether; Anisole	14,022	0,10	-
40	(-)-Carvone	14,148	-	0,35
41	Isopropyl linoleate	14,245	-	0,18
42	4-Nonanone, 7-ethyl-	14,342	-	0,28
43	Acétate de bornyle	14,778	-	1,68
44	Thymol	14,845	21,18	-
45	cis-p-Ment-2-en-1-ol	14,982	-	0,72
46	Acetic acid, nonyl ester	15,028	-	0,14
47	Carvacrol	15,042	55,60	-
48	Verbenol	15,172	-	0,72
49	α -Gurjunene	16,568	0,19	-
50	Alloaromadendrene	16,988	0,32	0,30
51	δ -Muuroolene	17,428	0,26	-
52	-Ledene	17,662	0,24	-
53	δ -Cadinene	17,968	0,24	-
54	(-)-2-Hydroxyisopinocampheol	18,058	-	0,17
55	Illudol	18,702	-	0,17
56	Spatulenol	18,768	0,38	-
57	Oxide de caryophyllene	18,855	-	1,11
58	Epiglobulol	19,008	-	0,66
59	Ledol	19,122	-	0,48
60	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	19,528	0,57	-
61	Tau-Muurolol	19,552	-	0,30
62	α -Cadinol	19,665	0,23	0,43
63	7-epi- β -Eudesmol	19,712	-	0,09
64	4,8,13-Duvatriene-1,3-diol	20,175	-	1,08
65	9,10-Dimethyltricyclo[4.2.1.1(2,5	20,592	-	0,27
66	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydr	22,505	0,14	-
Composés identifiés			99,89	100,00

TR : Temps de rétention.

49 composés, représentant 100 % de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine), ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de camphène (5,38 %), α -pinène (9,46 %), eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %) et de bornanone (18,55 %).

Le **Tableau 12** permet de comparer, entre autres, les composés majoritaires trouvés dans *T. hirtus* avec d'autres populations de cette espèce endémique.

Ben Bnina et al. (2009) rapportent 46 composés dans les huiles essentielles aussi bien des fleurs que des parties aériennes de *T. hirtus*, collecté dans la région de Monastir (Tunisie). Ces deux huiles sont majoritairement composées de **α -pinène (25,7%; 10,4%)**, **camphre (17,4%; 22,2%)** et **1,8-cinéole (10,9%; 9,6%)** (fleurs et parties aériennes, respectivement).

Le taux d' **α -pinène** trouvé dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine) et de Monastir (Tunisie), sont presque similaires (**9,46 %** et **10,4 %**, respectivement). Néanmoins, l'huile essentielle des fleurs de *T. hirtus* de Monastir (Tunisie), en présente un taux 3 fois plus élevé (**25,7%**) que celui des huiles essentielles des parties aériennes de cette même plante de Bekira (Constantine) et de Monastir (Tunisie).

Le **camphène** trouvé dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine) et celle des fleurs de cette même plante de Monastir (Tunisie), sont presque similaires (**5,38 %** et **4,5 %**, respectivement). Il est 2 fois plus élevé que celui trouvé dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Monastir (Tunisie) (**2,6 %**).

L'**eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %)** trouvé dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine), est 3 à 4 fois plus élevé que celui des huiles essentielles des fleurs et des parties aériennes de cette même plante de Monastir (Tunisie) (**10,9 %** et **9,6 %**, respectivement).

Le **2-bornanone (18,55 %)** est trouvé exclusivement dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine), par comparaison à celle des fleurs et des parties aériennes de cette même plante de Monastir (Tunisie).

L'**o-cymène (1,24 %)** trouvé en faible quantité dans l'huile essentielle des parties aériennes de *T. hirtus* de Bekira (Constantine), est totalement absent dans celle de Monastir (Tunisie).

I.3. Analyse GC-MS de l'huile essentielle de *T. guyonii*

Les composés identifiés dans l'huile essentielle des parties aériennes sèches de *T. guyonii* (Collecte de Mai 2010) sont listés, selon leur ordre d'élution dans la colonne, dans le **Tableau 13**.

27 composés, représentant 99,89 % de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. guyonii* de Msila, ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de **o-cymène (9,69 %)**, **δ-terpinène (5,73 %)**, **thymol (21,18 %)** et **carvacrol (55,60 %)**.

Le **Tableau 12** permet de comparer, entre autres, les composés majoritaires trouvés dans *T. guyonii* avec d'autres populations de cette espèce endémique.

Dans notre laboratoire de recherche, **Lehbili et al. (2013)** rapportent 19 composants représentant 94,63 % de l'huile essentielle de *T. guyonii* de Zelfana, Ghardaia, Algérie (Collecte de Mai 2012), avec comme composants majeurs le **carvacrol (55,55 %)**, le **thymol (19,51 %)** et le **p-cymène (6,25 %)**.

Hazzit et al. (2006) rapportent 57 composés représentant 95,3 % de l'huile essentielle de *T. guyonii* de Djelfa (Montagne de Haoues), récolté en Juillet 2004 (période de floraison). Cette huile est majoritairement composée de **p-cymène (18,6 %)**, **γ-terpinène (13 %)**, **linalool (6,1 %)**, **bornéol (6,1 %)**, **thymol méthyl éther (10,7 %)**, **thymol (10,9 %)** et **carvacrol (4,2 %)**.

Le taux de **carvacrol** et de **thymol** des deux populations de *T. guyonii* de Msila et de Ghardaia, étudiées dans notre équipe de recherche, sont presque similaires et sont plus élevés que ceux de Djelfa (**Hazzit et al., 2006**) (**Tableau 12**).

Les composants majeurs trouvés dans l'huile essentielle de *T. guyonii* de Msila, **α-pinène (0,69 %)**, **o-cymène (9,69 %)** et **δ-terpinène (5,73 %)**, sont absents dans celles des deux autres populations de cette espèce trouvées à Ghardaia (**Lehbili et al., 2013**) et à Djelfa (**Hazzit et al., 2006**).

I.4. Analyse GC-MS comparative des trois huiles essentielles de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*)

Les composants majoritaires des trois huiles essentielles de *Thymus*, sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Composants majoritaires des huiles essentielles (%) de trois espèces de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*).

Composé	% des composés majoritaires		
	<i>T. guyonii</i>	<i>T. hirtus</i>	<i>T. numidicus</i>
α-Pinène	0,69	9,46	-
Camphène	-	5,38	-
O-cymène	9,69	1,24	11,41
Eucalyptol	-	34,62	-
δ-Terpinène	5,73	-	-
2-Bornanone	-	18,55	-
Thymol	21,18	-	23,92
Carvacrol	55,60	-	6,02
Linalool	-	-	17,20
γ-Terpinène	-	-	10,84
Thymol méthyl éther	-	-	6,73

L'analyse GC-MS des trois huiles essentielles de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*), a permis d'identifier 11 composés majoritaires : l' **α -pinène**, le **camphène**, l'**o-cymène**, l'**eucalyptol (1,8-Cinéole)**, le **δ -terpinène**, le **2-bornanone**, le **thymol**, le **carvacrol**, le **linalool**, le **γ -terpinène** et le **thymol méthyl éther**. Nos résultats montrent que sur ces 11 composés majoritaires, 6 d'entre eux (6/11) sont présents dans *T. numidicus* alors que *T. guyonii* et *T. hirtus* en possèdent 5 (5/11).

Les composants majoritaires avec les pourcentages les plus élevés sont le thymol (23,92 %) pour *T. numidicus*, le carvacrol (55,60%) pour *T. guyonii* et l'eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %) pour *T. hirtus*.

Les résultats de l'analyse GC-MS, montrent la présence exclusive de certains composants majoritaires dans les huiles essentielles des trois espèces de *Thymus* étudiées. Il s'agit :

- de **camphène** (5,38 %), **eucalyptol** (34,62 %) et **2-bornanone** (18,55%), trouvés uniquement dans *T. hirtus*
- de **δ -terpinène** (5,73 %) trouvé uniquement dans *T. guyonii*
- de **linalool** (17,20 %), **γ -terpinène** (10,84 %) et **thymol méthyl éther** (6,73 %), trouvés uniquement dans *T. numidicus*.

Le composant majoritaire **o-cymène** est présent dans les huiles essentielles des trois espèces de *Thymus* étudiées. Le taux de ce composé est trouvé presque similaire dans *T. numidicus* (11,41 %) et *T. guyonii* (9,69 %), alors qu'il est très faible dans *T. hirtus* (1,24%).

Le composant majoritaire **α -pinène**, absent dans *T. numidicus*, est présent en quantité appréciable dans l'huile essentielle de *T. hirtus* (9,46%), par rapport à celle de *T. guyonii* (0,69%).

Le composant majoritaire **thymol**, absent dans *T. hirtus*, est présent en quantité presque similaire dans l'huile essentielle de *T. numidicus* (23,92%) et de *T. guyonii* (21,18%).

Le composant majoritaire **carvacrol**, absent dans *T. hirtus*, est présent en quantité très faible dans l'huile essentielle de *T. numidicus* (6,02%), par rapport à celle de *T. guyonii* (55,60%; composant majoritaire prédominant).

I.5. Recherche, dans d'autres espèces du genre *Thymus*, des composés majoritaires déterminés dans *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*

Une fois les composants majoritaires sont déterminés pour les huiles essentielles des trois espèces de *Thymus* que nous avons étudié (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*), nous avons fait une recherche bibliographique pour chercher ces composants dans d'autres espèces du genre *Thymus*. Les résultats de cette synthèse bibliographique sont présentés dans le **Tableau 12**.

Le composant majoritaire **α -pinène**, absent dans *T. numidicus*, est trouvé dans les 2 autres espèces de *Thymus* étudiées, *T. guyonii* (0,69 %) et *T. hirtus* (9,46 %). Ce composant est rencontré également dans d'autres espèces de *Thymus* avec des taux variés, de **0,1 %** (*T. herba-barona* de l'Italie; **Zuzarte et al., 2013**) à **25,7 %** (fleurs de *T. hirtus* Willd. de Tunisie; **Ben Bnina et al., 2009**).

Parmi les 3 espèces de *Thymus* étudiées, le **camphène** est trouvé exclusivement dans *T. hirtus* (5,38 %). Ce composant est rencontré également dans d'autres espèces de *Thymus* avec des taux variés, de **0,2 %** (*T. herba-barona* de l'Italie; **Zuzarte et al., 2013**) à **8,2 %** (*T. serpyllum* L. ssp. *serpyllum* var. *serpyllum* de Lituanie; **Mockute & Bernotiene, 2004**).

Le composant **o-cymène** est trouvé dans les 3 espèces de *Thymus* étudiées, *T. numidicus* (11,41 %), *T. guyonii* (9,69 %) et *T. hirtus* (1,24 %). Le taux de ce composé est trouvé presque similaire dans *T. guyonii* (9,69 %) et *T. numidicus* (11,41 %; **Zeghib A et al., 2013**). La concentration d'**o-cymène** de cette dernière espèce endémique (*T. numidicus*), s'approche de celle de *T. praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* de la Turquie (13,66 %; **Ozen et al., 2010**). Néanmoins, le taux le plus élevé de ce composé est rencontré dans *T. zygis* du Maroc (32,02 %; **Amarti et al., 2011**).

L'**eucalyptol (1,8-cinéole)** est le composant prédominant (34,62 %) et exclusif de *T. hirtus*, par comparaison aux deux autres espèces de *Thymus* que nous avons étudié. Ce

composant est rencontré dans plusieurs espèces de *Thymus* avec des taux variés, de **1,7 %** (*T. X-porlock*; Rasooli & Owlia, 2005) à **67,9 %** (*T. albicans* Hoffm. et Link du Portugal; Miguel et al., 2004).

Le **δ -terpinène** est trouvé seulement dans l'espèce *T. guyonii* de Msila que nous avons étudié, avec un taux de **5,73 %**. Ce composant est absent dans les deux autres espèces étudiées (*T. numidicus* et *T. hirtus*) ainsi que dans l'ensemble d'autres espèces de ce genre.

Le **2-bornanone** (**18,55 %**) se rencontre exclusivement dans *T. hirtus* que nous avons étudié. Ce composé est absent dans *T. numidicus* et *T. guyonii* étudiés, ainsi que dans l'ensemble d'autres espèces de ce genre.

Ce composant est trouvé en très faible quantité (**3,42 %**) dans *Rosmarinus officinalis* L. du Mexique (Martínez et al., 2009).

Parmi les 3 espèces de *Thymus* que nous avons étudié, le **thymol** et le **carvacrol** sont trouvés dans *T. numidicus* et *T. guyonii* (**thymol : 23,92 et 6,02 %**; **carvacrol : 21,18 et 55,60 %**, respectivement). Ces deux composés sont rencontrés dans la majorité des espèces du genre *Thymus*, conjointement ou séparément. Le taux de **thymol** varie de **0,1%** (*T. bracteosus* Vis. ex Benth.; Brantner et al., 2005) à **89,06 %** (*T. capitatus* Hoff. et Link. de la Tunisie; Mkaddem et al., 2010); alors que celui de **carvacrol** varie de **1,15 %** (*T. vulgaris* L. de l'Albanie; Asllani & Toska, 2003) à **87,8 %** (*T. capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link de l'île d'Italie; Marongiu et al., 2010).

Le composant **linalool** (**17,20 %**) trouvé exclusivement dans *T. numidicus*, par comparaison aux deux autres espèces de *Thymus* que nous avons étudié, est rencontré également dans d'autres espèces de ce genre avec des taux variés, de **1,5 %** (fleurs et parties aériennes de *T. hirtus* Willd. de Tunisie; Ben Bnina et al., 2009) à **49,6 %** (*T. villosus* subsp. *Lusitanicus* de l'Espagne; Salas et al., 2011).

Le γ -terpinène (10,84 %), composant exclusif de *T. numidicus* par comparaison à *T. guyonii* et *T. hirtus* que nous avons étudié, est rencontré également dans d'autres espèces de *Thymus* avec des taux variés, de 0,4 % (fleurs et parties aériennes de *T. hirtus* Willd. de Tunisie; Ben Bnina et al., 2009) à 27,80 % (*T. longicaulis subsp. longicaulis var. longicaulis*; Sarikurkcu et al., 2010).

Le thymol méthyl éther (6,73 %) trouvé exclusivement dans *T. numidicus*, par comparaison aux deux autres espèces de *Thymus* que nous avons étudié, est rencontré également dans d'autres espèces de ce genre avec des taux variés, de 0,6 % (*T. herba-barona* de l'Italie; Zuzarte et al., 2013) à 11,4 % (*T. fontanesii* Boiss. et Reut. de l'Algérie; Dob et al., 2006).

II. Détermination de l'activité antioxydante

➤ Huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* de la colle

Le pourcentage d'inhibition du DPPH a été déterminé pour les huiles essentielles (HE) des deux espèces endémiques de *Thymus* (Collecte de Mai 2010) : *T. guyonii* et *T. hirtus*. Deux concentrations ont été testées : 0,5 et 5 mg/mL final. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des huiles essentielles de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*) à 0,5 et 5 mg/mL.

% d'inhibition du DPPH	HE <i>T. guyonii</i>	HE <i>T. hirtus</i>
0,5 mg/mL final	15,5 ± 1,2	-4,5 ± 1,2
5 mg/mL final	44,3 ± 1,9	-0,5 ± 1,7

Nos résultats démontrent que les huiles essentielles de ces deux espèces de *Thymus*, ne présentent pas un potentiel intéressant en terme d'activité antioxydante. Le pourcentage d'inhibition de DPPH le plus élevé est observé pour l'huile essentielle de *T. guyonii*, et ce pour les deux concentrations testées, 0,5 et 5 mg/mL final (15,5 ± 1,2 % et 44,3 ± 1,95 %, respectivement).

➤ Huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012, a été réalisée par le test de blanchissement du β -carotène. L'activité augmente de manière dose dépendante. L'huile essentielle a manifesté une activité modérée du fait que la meilleure inhibition (52 %) a été mesurée à 4 mg/mL.

III. Détermination de l'activité antiproliférative

Nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations des deux **huiles essentielles de *Thymus*** de la collecte de **Mai 2010** (*T. guyonii* et *T. hirtus*), sur la prolifération de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29. Les pourcentages d'inhibition de la prolifération de ces cellules cancéreuses, en présence de 50 µg/mL final d'**huiles essentielles de *Thymus***, sont présentés dans la **Figure 22**.

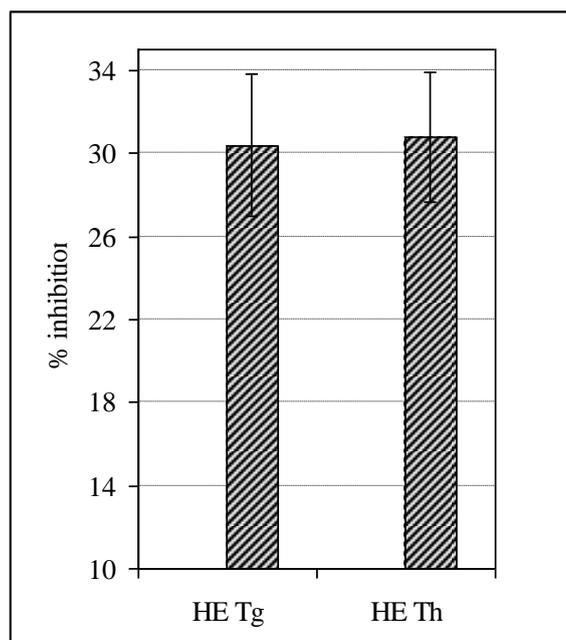


Figure 22 : Inhibition de la prolifération des cellules HT-29, à une concentration de 50 µg/mL final, par **deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus***.

Notre étude montre qu'à la concentration-test de 50 µg/mL, *T. guyonii* et *T. hirtus*, présentent presque les mêmes pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29 ($30,4 \pm 3,4$ % et $30,8 \pm 3,1$ %, respectivement).

Comme pour l'activité antioxydante, nous constatons que les deux **huiles essentielles de *Thymus*** testées, ne présentent pas d'activité antiproliférative intéressante vis-à-vis des cellules cancéreuses HT-29 (< 50 % d'inhibition).

IV. Détermination de l'activité antibactérienne

Il est connu depuis l'Antiquité que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable. Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants, présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens, dans plusieurs domaines industriels et médicaux (Baser *et al.*, 2000; Dorman & Deans, 2000).

Le genre *Thymus* possède une grande importance pharmacologique, puisque son huile essentielle est dotée d'activités antibactérienne, antifongique et expectorante (Kulevanova *et al.*, 1996).

Nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux espèces endémiques de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*) de la collecte de Mai 2010, ainsi que l'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012.

IV.1. Les huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* (Collecte de Mai 2010)

IV.1.1. Effet des deux huiles essentielles de *Thymus* sur la croissance bactérienne

La mesure des diamètres de zones d'inhibitions (DZI) de la croissance bactérienne par les deux huiles essentielles de *Thymus*, a été faite après 24h d'incubation à 37°C et en sont comparés à ceux des antibiotiques-contrôles (Ceftazidime 30µg, Cefamandole 30µg, Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg, Gentamycine 500µg (10UI)). Les résultats sont consignés dans le **Tableau 16**. Ce protocole a été pratiqué en duplicate.

Selon Ponce *et al.* (2003) et Moreira *et al.* (2005), le DZI renseigne sur la sensibilité d'une bactérie donnée :

- non sensible (-) ou résistante : DZI < 8 mm;
- sensible (+) : DZI = 9-14 mm;
- très sensible (++) : DZI = 15-19 mm;
- extrêmement sensible (+++) : DZI > 20 mm.

Selon cette codification de la sensibilité bactérienne, nous reprenons, dans le **Tableau 17**, les différents diamètres de zones d'inhibition (DZI) de la croissance bactérienne par les deux huiles essentielles de *Thymus*.

Tableau 16 : DZI de la croissance bactérienne (en mm) des **deux huiles essentielles** de *Thymus* et des **antibiotiques-contrôles** (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
HE-Th	0	13	13	14	0	11	0	8
HE-Tg	28,5	29,5	23,5	22	18,5	29	18	21,5
CAZ	27	22	32,5	31,5	22	21,5	23,5	18
MA	18,5	29,5	35,5	32,5	22	24	22,5	19,5
AMC	24	24,5	32	28	30	38,5	28	30
GM	0	37	26	0	26,5	24,5	22,5	20,5

(+) : bactérie Gram positif; (-) : bactérie Gram négatif.

CAZ : Ceftazidime 30µg; **MA** : Cefamandole 30µg; **AMC** : Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg; **GM** : Gentamycine 500µg (10UI).

Tableau 17 : Codification de la sensibilité bactérienne, en terme de DZI de la croissance bactérienne (en mm), vis-à-vis des **deux huiles essentielles d'espèces endémiques** de *Thymus* et des **antibiotiques-contrôles** (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
HE-Th	R	+	+	+	R	+	R	-
HE-Tg	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
CAZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
MA	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
AMC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GM	R	+++	+++	R	+++	+++	+++	+++

(R) : Bactérie résistante; **(-)** : Bactérie non sensible; **(+)** : Bactérie sensible; **(++)** : Bactérie très sensible; **(+++)** : Bactérie extrêmement sensible.

Les résultats de l'aromatogramme montrent que les huiles essentielles des deux espèces endémiques de *Thymus* (Collecte 2010), sont plus actives sur les bactéries Gram négatif. L'huile essentielle de *T. guyonii* est la plus active sur les huit souches bactériennes étudiées qui sont, en majorité, extrêmement sensibles à cette huile.

L'huile essentielle de *T. hirtus* est active sur quatre souches bactériennes (**PA, EAEC, EIEC, EPEC**), d'activité négligeable sur la souche bactérienne **EF** (DZI = 8 mm) et inactive (DZI = 0 mm) sur trois bactéries (**SA, EHEC, ETEC**).

La sensibilité des huit souches bactériennes d'étude a été également testée vis-à-vis des antibiotiques-contrôles (Ceftazidime 30µg, Cefamandole 30µg, Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg, Gentamycine 500µg (10UI)). Les souches bactériennes **SA** et **EIEC** sont résistantes à la Gentamycine 500µg (10UI).

L'activité antibactérienne de *T. guyonii*, en terme de DZI, vis-à-vis des souches bactériennes, est au moins équivalente à celle des antibiotiques-contrôles, excepté les bactéries **EHEC** et **ETEC**. L'activité antibactérienne de cette huile essentielle est meilleure que celle de certains antibiotiques-contrôles, à savoir le Cefamandole 30µg (MA) et la Gentamycine 500µg (10UI) (GM) vis-à-vis de la souche bactérienne **SA**; la Gentamycine 500µg (10UI) (GM) vis-à-vis de la souche bactérienne **EIEC**; la Ceftazidime 30µg (CAZ) et Cefamandole 30µg (MA) vis-à-vis de la souche bactérienne **EF**.

Ainsi, en terme d'aromatogramme, la meilleure activité antibactérienne est trouvée pour l'huile essentielle de *T. guyonii*. Cette activité est beaucoup plus meilleure que certains antibiotiques-contrôles vis-à-vis des souches bactériennes **SA, EIEC** et **EF**.

IV.1.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des deux huiles essentielles de *Thymus*

Les tests de détermination des CMI et CMB (en mg/mL) des deux **huiles essentielles de *Thymus***, ont été faits pour celles donnant des DZI > 8,5 mm, lors de l'évaluation de la sensibilité des huit souches bactériennes en milieu gélosé (l'aromatogramme). Les résultats sont consignés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : CMI et CMB des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus* (mg/mL).

Souches bactériennes	HE- <i>Th</i>		HE- <i>Tg</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
SA (+)	R	R	0,3125	0,625
PA (-)	10	> 10	0,3125	0,625
EAEC (-)	10	> 10	0,625	1,25
EIEC (-)	10	> 10	5	10
EHEC (-)	R	R	1,25	2,5
EPEC (-)	10	> 10	2,5	5
ETEC (-)	R	R	2,5	5
EF (+)	-	-	1,25	2,5

(R) : Bactérie résistante; (-) : Bactérie non sensible.

A l'issue des résultats des tests de concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) vis-à-vis des huit souches bactériennes d'étude, l'huile essentielle de *Thymus* qui possède la meilleure activité antibactérienne est bien celle de l'espèce *T. guyonii* : HE-*Tg* > HE-*Th*.

Ainsi, le degré de vulnérabilité des huit souches bactériennes testées, par ordre décroissant, vis-à-vis de l'huile essentielle de *T. guyonii*, est comme suit : SA = PA > EAEC > EHEC = EF > EPEC = ETEC > EIEC.

IV.1.3. Pouvoir antibactérien des deux huiles essentielles de *Thymus*

Une fois que les CMI et CMB sont déterminées pour les deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus*, le rapport CMB/CMI a été calculé.

Dans notre étude, ce rapport est indéterminé pour l'huile essentielle avec des CMB supérieures à la concentration initiale de la solution mère qui est de 10 mg/mL. Les résultats sont consignés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Détermination du rapport CMB/CMI des **deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus***.

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
HE- <i>Th</i>	R	ND	ND	ND	R	ND	R	-
HE- <i>Tg</i>	2	2	2	2	2	2	2	2

(R) : Bactérie résistante; (-) : Bactérie non sensible; (ND) : Non Déterminé (CMB >10 mg/mL).

Selon Berche *et al.* (1991), lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance est inférieur ou égal à 4, cette substance est jugée bactéricide tandis qu'elle est dite bactériostatique, si ce rapport est supérieur à 4.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux espèces de *Thymus* (Collecte de Mai 2010), montrent que l'huile essentielle de *T. guyonii* possède le meilleur effet bactéricide, du fait qu'elle possède un rapport CMB/CMI = 2 pour les huit souches bactériennes étudiées (EF : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; SA : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; PA : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique ATCC EDL933 (O157:H7); ETEC : *Escherichia coli* entérotoxigène ATCC H10407; EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasive ATCC 11741; EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogène ATCC 2348/69 (O127:H6); EAEC : *Escherichia coli* entéroaggrégative ATCC 17-2).

L'effet bactéricide n'a pas été mis en évidence pour l'huile essentielle de *T. hirtus*, du fait que la valeur de CMB dépasse la concentration initiale de la solution mère (10 mg/mL). *T. hirtus* possède des CMI de 10 mg/mL pour les souches bactériennes PA (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), EAEC (*Escherichia coli* entéroaggrégative ATCC 17-2), EIEC (*Escherichia coli* entéroinvasive ATCC 11741) et EPEC (*Escherichia coli* entéro-pathogène ATCC 2348/69 (O127:H6), qui sont toutes à **Gram négatif**.

IV.2. L'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte de Mai 2012)

L'huile essentielle de *T. numidicus* de la collecte de Mai 2012, exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées, avec des DZI de $16,0 \pm 1,4$ à $23,8 \pm 2,0$ mm (Tableau 20). Ainsi, selon l'échelle de sensibilité bactérienne posée par Ponce et al. (2003) et Moreira et al. (2005), cette huile essentielle est très active (DZI = 15-19 mm) sur les souches bactériennes testées. Elle inhibe plus efficacement la croissance de *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Staphylococcus aureus* (SH), *Escherichia coli* (ATCC) et *Klebsiella pneumoniae* (SH), avec $23,8 \pm 2,0$; $22,9 \pm 0,9$; $20,4 \pm 0,5$ et $19,6 \pm 0,3$ mm (diamètres de zones d'inhibition, respectivement). Ces résultats sont confirmés par les valeurs basses de CMI (Zeghib A et al., 2013).

Tableau 20 : Activité antibactérienne (DZI et CMI) de l'huile essentielle de *T. numidicus* (Collecte de Mai 2012).

Souches bactériennes	DZI (mm)	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	$20,4 \pm 0,5$	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	$16,4 \pm 0,5$	25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	$23,8 \pm 2,0$	3
<i>Escherichia coli</i> (SH)	$18,5 \pm 0,7$	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SH)	$16,0 \pm 1,4$	25
<i>Staphylococcus aureus</i> (SH)	$22,9 \pm 0,9$	3
<i>Enterobacter aerogenes</i> (SH)	$16,6 \pm 0,7$	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (SH)	$19,6 \pm 0,3$	12
<i>Morganella morganii</i> (SH)	$16,4 \pm 0,8$	12

SH : Souche Hospitalière (Isolat).

V. Détermination des activités cytotoxique et antivirale

Nous avons étudié l'activité antivirale des **huiles essentielles** des deux espèces endémiques de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*), vis-à-vis du coxsackievirus B3 (CV-B3). Les trois tests antiviraux, dont les principes ont été expliqués dans la partie Matériels & Méthodes, ont été réalisés sur les cellules non-cancéreuses Vero prises comme substrat, et consistent en :

- ✓ incubation de l'huile essentielle [E] avec la suspension virale CV-B3 [V] avant inoculation aux cellules Vero [C], test codé [(E+V)+C];
- ✓ incubation des cellules Vero [C] avec l'huile essentielle [E] avant l'addition de la suspension virale CV-B3 [V], test codé [(C+E)+V];
- ✓ incubation des cellules Vero [C] avec la suspension virale CV-B3 [V] avant l'ajout de l'huile essentielle [E], test codé [(C+V)+E].

Avant de réaliser ces trois tests antiviraux, il faut tenir compte de deux points. Premièrement, pour chaque huile essentielle de *Thymus* il faut, d'abord, faire le test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero, prises comme substrat pour le test antiviral, et en déterminer la concentration cytotoxique 50% (CC₅₀). La CC₅₀ correspond à la concentration d'huile essentielle donnant 50% de lyse des cellules non-cancéreuses Vero. Une fois déterminée, cette CC₅₀ sera donc évitée lorsque nous testons cette huile essentielle vis-à-vis du CV-B3, lors des trois tests antiviraux utilisant comme substrat les cellules non-cancéreuses Vero. Deuxièmement, la concentration d'huile essentielle de *Thymus* qui sera testée pour l'activité antivirale, est celle donnant un pourcentage de viabilité cellulaire entre 90 et 100 %, lors du test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.

❖ **Activité cytotoxique**

Nous avons étudié l'activité cytotoxique des **huiles essentielles** des deux espèces endémiques de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*), vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero. Les valeurs de CC_{50} correspondantes (concentration d'huile essentielle donnant 50% de lyse des cellules non-cancéreuses Vero) sont présentées dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 : Détermination de la concentration cytotoxique 50 (CC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) des **deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus*** vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.

Huile essentielle	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HE-Tg	30,3
HE-Th	97,65

Nos résultats montrent que les huiles essentielles de *T. guyonii* et *T. hirtus*, présentent des concentrations cytotoxiques 50% (CC_{50}) de 30,3 et 97,65 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.

Selon l'American National Cancer Institute, le seuil de signification pour les extraits bruts est la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) $< 30 \mu\text{g/mL}$ (Hennebelle et al., 2008). Ainsi, l'huile essentielle de *T. hirtus* est non cytotoxique sur les cellules non-cancéreuses Vero ($CC_{50} = 97,65 \mu\text{g/mL}$). La concentration cytotoxique 50% de l'huile essentielle de *T. guyonii* vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero, se trouve à la limite du seuil posé ($CC_{50} = 30,3 \mu\text{g/mL}$) et elle pourrait être, donc, considérée comme non cytotoxique.

Ainsi, afin de réaliser les trois tests antiviraux sur les cellules Vero, prises comme substrat, il faut éviter ces concentrations cytotoxiques des deux huiles essentielles de *Thymus* donnant 50 % de leur lyse (CC_{50}). Les concentrations des deux huiles essentielles de *Thymus* qui seront testées pour l'activité antivirale, sont celles donnant un pourcentage de viabilité cellulaire entre 90 et 100 %.

❖ **Activité antivirale**

Les trois tests antiviraux réalisés contre le coxsackievirus B3, montrent que les **huiles essentielles** des deux espèces endémiques de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*), sont dépourvues d'activité antivirale vis-à-vis de ce virus (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Résultats des trois tests antiviraux, réalisés contre le coxsackievirus B3, des deux huiles essentielles d'espèces endémiques de *Thymus*.

HE des espèces de <i>Thymus</i>	[(E+V)+C] ($\mu\text{g/mL}$)	[(C+E)+V] ($\mu\text{g/mL}$)	[(C+V)+E] ($\mu\text{g/mL}$)
HE-<i>Th</i>	Négatif	Négatif	Négatif
HE-<i>Tg</i>	Négatif	Négatif	Négatif

Négatif : pas d'Effet CytoPathogène (pas d'ECP); [(E+V)+C]: effet de l'échantillon d'étude sur le virus; [(C+E)+V] : effet de l'échantillon d'étude sur les cellules Vero; [(C+V)+E] : effet de l'échantillon d'étude sur le cycle viral après adsorption.

VI. Bilan des résultats et discussion

❖ Bilan GC-MS

L'analyse GC-MS des huiles essentielles des deux espèces endémiques de *Thymus* (*T. guyonii* et *T. hirtus*) de la collecte de 2010 ainsi que celle de *T. numidicus* de la collecte de 2012, a permis d'identifier 11 composés majoritaires : l' α -pinène, le camphène, l'o-cymène, l'eucalyptol (1,8-Cinéole), le δ -terpinène, le 2-bornanone, le thymol, le carvacrol, le linalool, le γ -terpinène et le thymol méthyl éther.

Les composants majoritaires avec les pourcentages les plus élevés sont le thymol (23,92 %) pour *T. numidicus*, le carvacrol (55,60%) pour *T. guyonii* et l'eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %) pour *T. hirtus*.

L'huile essentielle des parties aériennes sèches de *T. guyonii* de Msila, est majoritairement composée de o-cymène (9,69 %), δ -terpinène (5,73 %), thymol (21,18 %) et carvacrol (55,60 %), parmi 27 composés identifiés qui représentent 99,89 % de cette essence.

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches de *T. hirtus* de Bekira (Constantine), est majoritairement composée de α -pinène (9,46 %), camphène (5,38 %), eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %) et 2-bornanone (18,55 %), parmi 49 composés identifiés qui représentent 100 % cette essence.

34 composés représentant 98,14 % des parties aériennes fraîches de l'huile essentielle de *T. numidicus* (collecte de Mai 2012), ont été détectés avec comme composants majeurs le thymol (23,92%), le linalool (17,20%), l'o-cymène (11,41%), le γ -terpinène (10,84%), le thymol méthyl éther (6,73%) et le carvacrol (6,02%) (Zeghib A et al., 2013).

❖ Bilan activités biologiques

L'étude des activités biologiques (antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale) des **huiles essentielles** des deux espèces endémiques de *Thymus* (Collecte de Mai 2010), montre le potentiel bactéricide (CMB/CMI = 2) manifesté pour *T. guyonii*, vis-à-vis des huit souches bactériennes d'étude.

La meilleure activité bactéricide de l'huile essentielle de *T. guyonii*, pourrait être due à l'effet synergique de ses composés majeurs : **o-cymène (9,69 %)**, **δ-terpinène (5,73 %)**, **thymol (21,18 %)** et **carvacrol (55,60 %)**.

Selon **Zani et al. (1991)**, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire, comme le thymol et le carvacrol, peuvent, grâce à leurs groupes fonctionnels, adhérer aux bactéries Gram négatif par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires et rendre, ainsi, la membrane intérieure plus vulnérable.

(**Juven et al., 1994; Helander et al., 1998; Ultee et al., 1999**) rapportent que le thymol et le carvacrol, qui sont les composés majoritaires prédominants de l'huile essentielle de *T. guyonii*, entraînent des perturbations de la membrane bactérienne, conduisant à la fuite de l'ATP intracellulaire et les ions potassium entraînant, en fin de compte, la mort cellulaire. Ce qui explique bien l'effet antimicrobien de ces deux composés phénoliques rapporté par plusieurs auteurs (**Baydar et al., 2004; Nejad Ebrahimi et al., 2008**).

A l'issue du test de cytotoxicité réalisé préalablement aux trois tests antiviraux, nos résultats montrent que l'huile essentielle de *T. guyonii* n'est pas cytotoxique sur les cellules non-cancéreuses Vero (selon les normes posées par l'American National Cancer Institute). Et par conséquent, elle pourrait être utilisée sans danger pour la santé.

Chapitre 1.2

**Evaluation des activités biologiques des extraits de
trois espèces endémiques de *Thymus* poussant en
Algérie**

Afin de déterminer le potentiel, en terme d'activité, des trois espèces endémiques de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. ciliatus*), nous nous sommes intéressés aux propriétés bioactives (**antioxydante** et **antiproliférative**) des **extraits** de ces **trois plantes**. L'espèce *T. vulgaris* est prise comme référence de ce genre.

Chacune de ces espèces a subi une extraction, sur 25 g de matière végétale, par des solvants de polarité croissante afin d'extraire les diverses molécules y contenues. Au total cinq extraits (**E**) sont obtenus par plante.

Le premier test d'activité biologique consiste à mesurer la capacité des **extraits de Thymus** à inhiber le radical stable DPPH. Il permet de mesurer le pouvoir réducteur des **extraits**.

Nous avons, ensuite, déterminé la teneur en composés phénoliques totaux des **extraits de Thymus**. Cette mesure a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les valeurs mesurées sont exprimées en g/100g d'extraits et sont déterminées par rapport à un composé de référence, le pyrogallol. Nous avons évalué la corrélation entre les propriétés antioxydantes et le contenu phénolique des **extraits**.

Par la suite, nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations d'**extraits de Thymus** sur la prolifération des cellules HT-29 (lignée du cancer colorectal humain).

I. Obtention des extraits

L'extraction par des solvants de polarité croissante de 25 g de matière végétale de *T. numidicus* (*Tn*), *T. guyonii* (*Tg*), *T. ciliatus* (*Tc*) et *T. vulgaris* (*Tv*), a conduit à l'obtention de 20 extraits (**E**). Leurs masses différentes et les rendements d'extraction correspondants sont présentés dans le **Tableau 23**.

Nous notons que, pour toutes les espèces de *Thymus* étudiées, les **extraits les plus polaires** ont les rendements les plus élevés, de 7,9 à 20,2 % (**E ME Tn** et **E Aq Tv**, respectivement), excepté l'extrait méthanol de *T. ciliatus* qui a un rendement très faible (2,7 %). Ainsi, les rendements les plus élevés sont observés, par ordre décroissant, pour les extraits aqueux (**E Aq Tv** > **E Aq Tg** > **E Aq Tn** > **E Aq Tc**) et méthanol (**E ME Tv** = **E ME Tg** > **E ME Tn** > **E ME Tc**). L'espèce de référence *T. vulgaris* présente donc les rendements les plus élevés (**E Aq Tv** = 20,2 %, **E ME Tv** = 11,2 %). Parmi les espèces endémiques de *Thymus* étudiées, *T. guyonii* a les rendements les plus élevés pour les extraits aqueux (**E Aq Tg** = 15,3 %) et méthanol (**E ME Tg** = 11,1 %).

Tableau 23 : Masses (g) et rendements (%) des différents extraits de *Thymus*.

	E Tn		E Tg		E Tc		E Tv	
	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)	Masse (g)	Rend. (%)
EP	0,3	1,1	0,3	1,3	0,2	0,7	0,4	1,5
DM	0,8	3,2	0,4	1,6	0,9	3,8	0,9	3,4
AE	0,3	1,3	0,2	0,6	0,1	0,4	0,3	1,4
ME	2,0	7,9	2,8	11,1	0,7	2,7	2,8	11,2
Aq	2,6	10,4	3,8	15,3	2,1	8,2	5,1	20,2

Rend. : Rendement

Nos résultats montrent que les extraits les moins polaires, extraits éther de pétrole (**EP**), dichlorométhane (**DM**) et acétate d'éthyle (**AE**), présentent les plus faibles rendements, du 0,4 % (**E AE Tc**) à 3,8 % (**E DM Tc**).

Comme nous le verrons par la suite, le bioguidage nous a permis de montrer l'efficacité importante du *T. numidicus*. Nous avons, donc, réalisé une seconde extraction à partir de 500 g de plante broyée (**Tableau 24**), afin d'obtenir des quantités d'extraction plus grandes, permettant la réalisation de l'exploration phytochimique. Les rendements de cette extraction à plus grande échelle (sur 500 g) sont conformes à ceux de l'extraction réalisée sur 25 g de matière végétale. Les extraits seront donc comparables entre eux.

Tableau 24 : Rendements (%) des **extraits** de *T. numidicus* issus des extractions de 25g et de 500g de matière végétale.

Rendements (%) des extraits de <i>T. numidicus</i>		
	Extraction 25g	Extraction 500g
E EP <i>Tn</i>	1,1	1,58
E DM <i>Tn</i>	3,2	2,96
E AE <i>Tn</i>	1,3	1,36
E ME <i>Tn</i>	7,9	9,64
E Aq <i>Tn</i>	10,4	10,52

II. Test d'activité antioxydante

Comme il a été rapporté en littérature, les espèces de *Thymus* présentent potentiellement une activité antioxydante. Le test d'inhibition du radical DPPH donne une information fiable concernant la capacité antioxydante des composés testés (**Trouillas et al., 2003**). Nous avons choisi d'utiliser le test d'inhibition du radical DPPH par RPE (cf. Matériels & Méthodes). Le radical DPPH est un bon indicateur du potentiel redox des composés testés.

II.1. Détermination de pourcentages d'inhibition du radical DPPH

Pour mettre en évidence les **extraits de *Thymus*** les plus actifs, nous avons comparé l'activité anti-DPPH à une même concentration de 0,125 mg/mL (**Figure 23**).

Nos résultats montrent une très grande disparité quant au pourcentage d'inhibition du radical DPPH, à une concentration de 0,125 mg/mL final d'extrait de *Thymus*.

L'activité anti-DPPH s'observe principalement dans les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux) de *Thymus*. Leur activité est systématiquement >50% à la concentration-test de 0,125 mg/mL.

Nous notons deux exceptions pour les extraits les moins polaires de *Thymus*. En effet, les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. guyonii* présentent $\approx 70\%$ d'inhibition du radical DPPH. Dans une moindre mesure, l'extrait acétate d'éthyle de *T. vulgaris* est au $\approx 30\%$ d'inhibition du radical DPPH.

Si nous comparons les trois espèces endémiques de *Thymus* étudiées au *T. vulgaris*, l'activité des extraits les plus actifs est au moins équivalente à celle de notre espèce de référence.

Les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux) de *T. numidicus* sont les plus actifs de tous, avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH >90%.

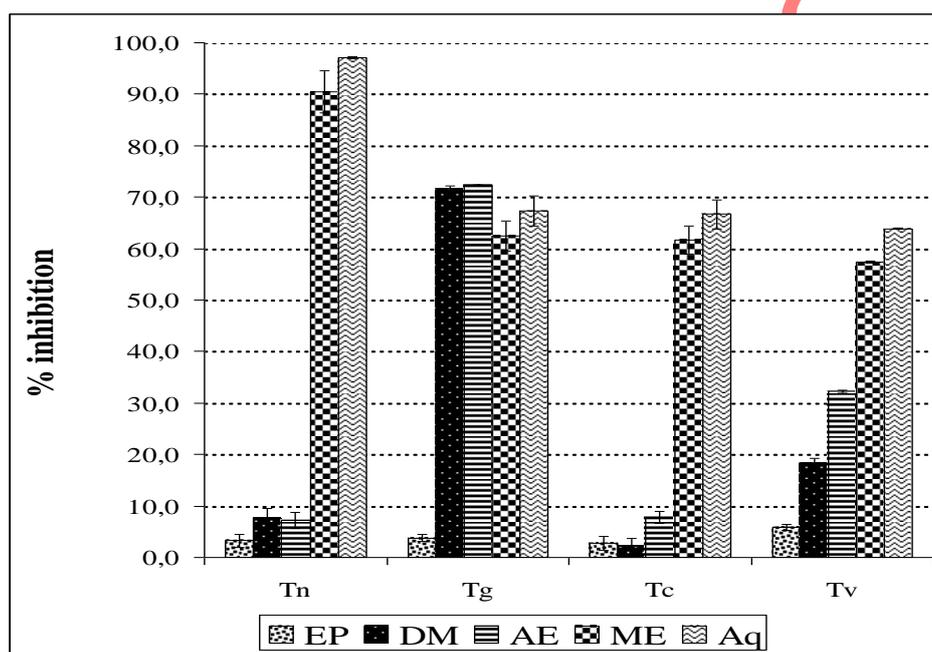


Figure 23 : Activité anti-DPPH des extraits de *Thymus* à 0,125 mg/mL. Les barres sur les histogrammes représentent la déviation standard (SD) des mesures (n=3). *Tn* : *T. numidicus*; *Tg* : *T. guyonii*; *Tc* : *T. ciliatus* et *Tv* : *T. vulgaris*.

Pour affiner ces résultats, nous avons déterminé les CI_{50} des extraits de *Thymus* les plus actifs.

II.2. Détermination de la CI₅₀ des extraits

La CI₅₀, concentration permettant l'inhibition de 50% du signal de référence, a été déterminée pour les extraits de *Thymus* les plus actifs, dans le test d'inhibition du radical DPPH. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 25**.

Tableau 25 : CI₅₀ (µg/mL) des extraits de *Thymus*.

	<i>Tn</i>	<i>Tg</i>	<i>Tc</i>	<i>Tv</i>
EP	>1000	738,4 ± 8,63	>1000	>1000
DM	>1000	79,0 ± 0,5	>1000	336,6 ± 1,4
AE	>1000	75,0 ± 1,0	>1000	182,2 ± 1,6
ME	47,9 ± 1,0	92,5 ± 1,7	98,0 ± 4,1	95,2 ± 3,2
Aq	47,0 ± 2,2	87,3 ± 4,3	84,6 ± 2,1	88,3 ± 1,0

Nos résultats confirment que la meilleure activité anti-DPPH est trouvée dans les extraits de *Thymus* les plus polaires (méthanol et aqueux). Les extraits méthanol et aqueux des trois espèces *T. guyonii*, *T. ciliatus* et *T. vulgaris*, possèdent des activités antioxydantes comparables (CI₅₀ sont ≈ 90 à 100 µg/mL). Cette activité antioxydante est presque deux fois plus meilleure pour les mêmes types d'extraits de *T. numidicus*.

La particularité de l'espèce *T. guyonii* est confirmée car les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle sont les plus actifs pour cette plante. Malgré tout, nous relativiserons ce résultat au vu du faible rendement d'extraction de ces deux extraits (0,5 à 1,5%, **Tableau 23**).

II.3. Comparaison entre l'activité antioxydante des extraits de *Thymus* et les antioxydants de référence

Nous avons comparé l'activité antioxydante de ces extraits de *Thymus*, à des composés (extraits et molécules) de références pour ce type d'activité (**Tableau 26**). Le picnogénol et le marc de raisin sont maintenant reconnus comme étant de très bons extraits antioxydants standards. La vitamine E et la quercétine sont des antioxydants naturels de référence.

Dans le test d'inhibition du radical DPPH, le picnogénol et le marc de raisin présentent des CI₅₀ de 25 et 17,4 µg/mL, respectivement. Le meilleur potentiel antioxydant des extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus* (avec CI₅₀ de 47,9±1,0 µg/mL et 47,0±2,2 µg/mL, respectivement) est bien confirmé et qui n'est que 2 et 2,7 fois moins actif que ces deux extraits de référence.

La vitamine E et la quercétine ont des CI₅₀ de 25 et 12 µg/mL, respectivement, dans le test d'inhibition du radical DPPH. L'activité antiradicalaire manifestée par les extraits

méthanol et aqueux de *T. numidicus*, est 2 et 4 fois moins active que la vitamine E et la quercétine, respectivement.

Tableau 26 : CI₅₀ (µg/mL) des antioxydants de référence.

Antioxydants de référence		CI ₅₀ (µg/mL)
Extraits	Picnogérol	25 ± 1
	Marc de raisin	17,4 ± 0,5
Molécules	Vitamine E	25 ± 0,5
	Quercétine	12 ± 0,5

L'activité antioxydante est généralement corrélée à la présence de composés phénoliques, ce que nous verrons ci-après.

III. Activité antioxydante et composition phénolique

Nous avons spéculé que l'activité antiradicalaire des extraits de *Thymus*, était essentiellement due à la présence de composés phénoliques. Nous avons, tout d'abord, déterminé ce taux par la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant comme standard le pyrogallol (g/100g équiv. Pyrogallol). Par la suite, nous avons étudié la corrélation entre l'activité antiradicalaire et la teneur en phénols totaux.

III.1. Détermination du taux des composés phénoliques des extraits

La teneur en composés phénoliques totaux des 20 extraits de *Thymus*, a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (cf. Matériels & Méthodes). Les résultats obtenus (exprimés en g/100g équivalent Pyrogallol) sont présentés dans le **Tableau 27**.

Ce tableau nous montre les variations de la quantité de composés phénoliques totaux des **extraits de *Thymus***. Ce taux varie de 1,3 à 19,1 g/100g équiv. Pyrogallol (**E EP Tn** et **E AE Tg**, respectivement).

Tous les **extraits polaires** (méthanol et aqueux) des espèces de *Thymus*, sont les plus riches en phénols totaux (≥ 10 g/100g équiv. Pyrogallol). Les extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus* sont, d'une part, les plus riches en phénols totaux par comparaison à ceux de *T. guyonii*, *T. ciliatus* et *T. vulgaris* et, d'autre part, les valeurs correspondantes s'approchent de celles de l'extrait acétate d'éthyle de *T. guyonii*.

Deux exceptions sont trouvées dans notre étude. En effet, contrairement aux restes des extraits les moins polaires, un taux de composés phénoliques totaux ≥ 9 g/100g équiv. Pyrogallol a été observé dans les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. guyonii*, ainsi que l'extrait acétate d'éthyle de *T. vulgaris* (8,8; **19,1** et 9,7 g/100g équiv. Pyrogallol, respectivement). Ce qui est en accord avec la bonne activité antioxydante de ces trois extraits comparés aux extraits équivalents des autres plantes de *Thymus*.

Nous notons le comportement spécifique de l'espèce *T. guyonii*. En effet, les composés phénoliques totaux sont répartis dans tous les extraits de cette espèce, dont l'extrait acétate d'éthyle (**E AE Tg**) représente le taux le plus élevé de tous les extraits de *Thymus* étudiés (**19,1** g/100g équiv. Pyrogallol). Néanmoins, l'extrait acétate d'éthyle ainsi que les extraits éther de pétrole et dichlorométhane de cette plante, présentent de faibles rendements (0,6; 1,3 et 1,6, respectivement). Les phénols totaux des extraits méthanol et aqueux de *T. guyonii*, sont presque similaires à ceux de *T. vulgaris* (12,6 versus 13,5 g/100g, respectivement pour les extraits méthanol et 11,3 versus 10,6 g/100g, respectivement pour les extraits aqueux).

Tableau 27 : Taux en composés phénoliques totaux (g/100g équiv. Pyrogallol) des extraits de *Thymus* (n = 3).

	E Tn	E Tg	E Tc	E Tv
EP	1,3 ± 0,01	7,5 ± 0,11	1,3 ± 0,12	3,7 ± 0,09
DM	3,5 ± 0,38	8,8 ± 0,13	2,4 ± 0,07	4,3 ± 0,17
AE	2,8 ± 0,23	19,1 ± 0,04	4,2 ± 0,15	9,7 ± 0,31
ME	16,7 ± 0,52	12,6 ± 0,35	10,0 ± 0,24	13,5 ± 0,02
Aq	16,7 ± 0,07	11,3 ± 0,37	10,9 ± 0,04	10,6 ± 0,05

Si nous comparons les résultats des extraits de *Thymus* aux références, que sont le picnogénol et le marc de raisin (**Tableau 28**), nous observons que leurs contenus en composés phénoliques totaux (30,7 et 39,6 g/100g équiv. Pyrogallol, respectivement), sont deux fois supérieurs aux extraits les plus riches que sont les extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus* ainsi que l'extrait acétate d'éthyle de *T. guyonii*. Ceci est également en accord avec les activités antioxydantes mesurées, puisque les extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus* étaient 2 à 2,5 fois moins actifs que les extraits de références.

Tableau 28 : Taux en composés phénoliques totaux (g/100g équiv. Pyrogallol) des antioxydants de référence (n = 3).

Antioxydants de référence		Phénols totaux
Extraits	Picnogénol	30,7
	Marc de raisin	39,6

III.2. Comparaison entre l'activité anti-DPPH et le taux des composés phénoliques

Pour renforcer ces observations, nous avons voulu confirmer ces résultats en essayant de corréler les CI_{50} observées et le taux des composés phénoliques totaux des extraits de *Thymus*. Parmi tous les extraits de *Thymus* analysés, un taux significatif de phénols totaux (≥ 10 g/100g équiv. Pyrogallol) et une bonne activité antioxydante, ont été trouvés dans tous les extraits polaires avec, en plus, l'extrait acétate d'éthyle de *T. guyonii* qui a le taux le plus élevé ($19,1 \pm 0,04$ g/100g équiv. Pyrogallol).

En général, plus l'activité antiradicalaire est plus élevée, plus le contenu phénolique est, aussi, plus élevé (Figure 23; Tableaux 25 et 27). Selon Trouillas et al. (2003) et Calliste et al. (2005), la corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antiradicalaire, ne peut pas être directement démontrée. Les calculs d'une telle corrélation ont été faits en utilisant $1/CI_{50}$, qui était représentatif de l'activité antioxydante. En fait, quand l'activité augmente, $1/CI_{50}$ diminue, et $1/CI_{50}$ est exactement proportionnelle à l'activité.

Nous avons tracé un graphique qui représente l'inverse de la CI_{50} ($1/CI_{50}$) en fonction du taux de composés phénoliques des extraits de *Thymus*. $1/CI_{50}$ est représentatif de l'activité antioxydante parce que plus $1/CI_{50}$ augmente, plus l'extrait est efficace (Figure 24).

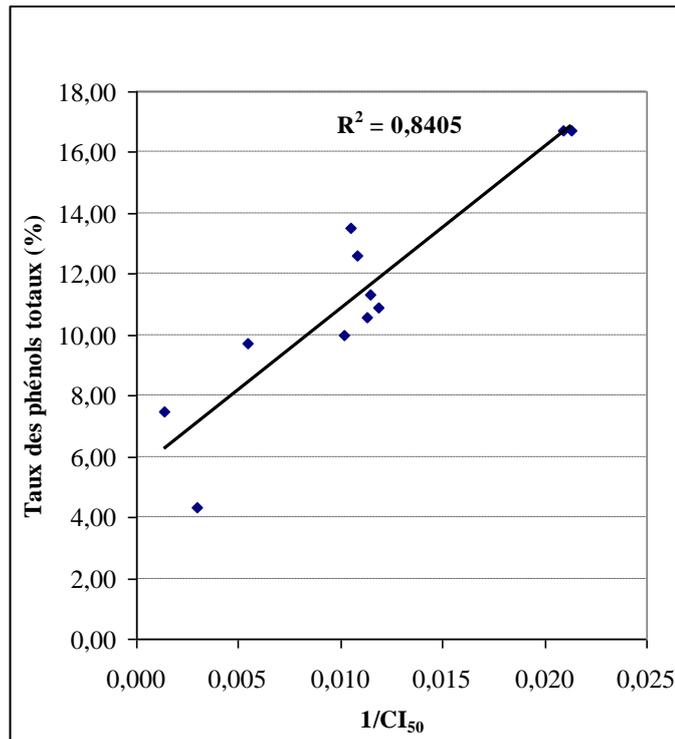


Figure 24 : Corrélation entre l'activité antioxydante (représentée par $1/CI_{50}$) et le taux de phénols totaux des extraits de *Thymus*.

Nos résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation, dans le test d'inhibition du radical DPPH, entre $1/CI_{50}$ et les composés phénoliques totaux des extraits de *Thymus* ($R^2 = 0,8405$, avec élimination des 4^{ème} et 5^{ème} valeurs correspondant aux extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. guyonii*, respectivement).

Nous avons établi une corrélation linéaire entre $1/CI_{50}$ et la quantité de molécules antioxydantes. Selon Trouillas et al. (2003), cela signifie que 1 molécule inhibe 1 radical, 2 molécules inhibent 2 radicaux..., n molécules inhibent n radicaux. En effet, ce test implique seulement le piégeage direct du radical, qui se produit par des réactions redox "simples".

Ainsi, cette corrélation confirme les propriétés réductrices des composés phénoliques, puisque seuls les mécanismes réducteurs sont pris en compte dans le test d'inhibition du radical DPPH.

IV. Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HT-29

Comme le thym est utilisé sous plusieurs formes en alimentation (épices et condiments pour les potages, les grillades de viandes et poissons, etc.) et en médecine traditionnelle (tisanes), l'absorption des composés qui en sont issus se fera donc au niveau intestinal. Pour cela, nous avons étudié l'activité antiproliférative des espèces endémiques de *Thymus* vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29.

IV.1. Détermination de pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire

Nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations d'extraits de *Thymus*, sur la prolifération de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, après un contact de 48h. Le taux de survie de ces cellules, mises en contact avec différentes concentrations d'extrait, est mesuré par la technique du MTT. La **Figure 25** présente les pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules HT-29 en présence de 50 µg/mL final d'extraits de *Thymus*.

Nos résultats montrent une très grande disparité quant au pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, à une concentration de 50 µg/mL final d'extrait, de 2,7±8,1 à 96,0±2,0 % (extraits éther de pétrole de *T. vulgaris* et acétate d'éthyle de *T. numidicus*, respectivement).

Les pourcentages d'inhibition les plus élevés s'observent dans les extraits dichlorométhane de *T. numidicus*, *T. ciliatus* et *T. vulgaris* (94,1±1,4; 74,7±7,6 et 94,2±2,3 %, respectivement) et dans les extraits acétate d'éthyle de *T. numidicus* et *T. vulgaris* (96,0±2,0 et 84,4±2,7 %, respectivement). Ce sont donc des extraits qui présentent une bonne activité antiproliférative vis-à-vis des cellules HT-29. Nous notons la très faible activité de *T. guyonii* vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, par rapport aux autres plantes de *Thymus*.

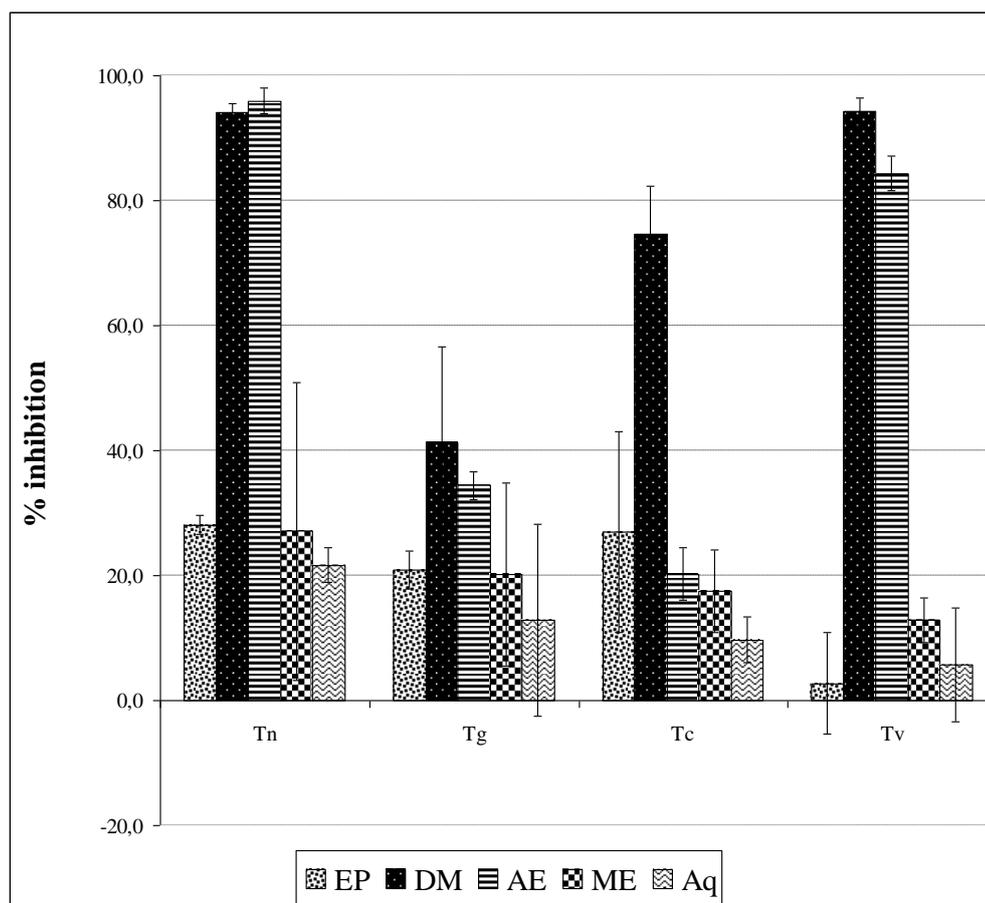


Figure 25 : Inhibition de la prolifération cellulaire des cellules HT-29 par les **extraits** de *Thymus* après 48h, à une concentration de 50 µg/mL final (n = 3).

IV.2. Détermination de la CI_{50} des extraits actifs

Afin de préciser ces résultats, nous avons déterminé la CI_{50} (concentration permettant l'inhibition de 50% de la prolifération cellulaire) des cinq extraits les plus actifs (inhibition >50%). Les résultats obtenus sont comparés à l'acide ursolique, qui est une molécule d'origine naturelle reconnue pour ses propriétés antiprolifératives. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 29**.

L'espèce endémique de *Thymus* présentant la meilleure activité antiproliférative vis-à-vis des cellules HT-29 est *T. numidicus*. Cette activité est présente dans les extraits dichlorométhane ($CI_{50} = 26,9 \pm 4,9$ µg/mL) et acétate d'éthyle ($CI_{50} = 25,8 \pm 0,8$ µg/mL). L'activité antiproliférative de *T. numidicus* s'approche de celle de l'espèce de référence, *T. vulgaris*, pour les mêmes types d'extraits : dichlorométhane ($CI_{50} = 22,3 \pm 0,9$ µg/mL) et

acétate d'éthyle ($CI_{50} = 28,7 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$). L'extrait dichlorométhane de *T. ciliatus* présente aussi une activité antiproliférative vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29 ($CI_{50} = 42,9 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 29 : CI_{50} des cinq extraits de *Thymus* les plus actifs vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29 (temps de contact : 48h, n = 3).

Extraits actifs		CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Tn</i>	DM	$26,9 \pm 4,9$
	AE	$25,8 \pm 0,8$
<i>Tc</i>	DM	$42,9 \pm 4,7$
<i>Tv</i>	DM	$22,3 \pm 0,9$
	AE	$28,7 \pm 0,9$
Acide ursolique		6,85

Selon l'American National Cancer Institute (ANCI), le seuil de signification pour les extraits bruts est la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) < 30 $\mu\text{g/mL}$ (Hennebelle et al., 2008). Ainsi, l'activité antiproliférative de quatre des cinq extraits de *Thymus*, se révèle très intéressante ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$). Ce sont les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. numidicus* et *T. vulgaris*. L'espèce de référence *T. vulgaris* est déjà étudiée et connue pour contenir des molécules antiprolifératives d'intérêt (Duke).

Ces résultats mettent en évidence le potentiel en terme d'activité antiproliférative, des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de l'espèce endémique *T. numidicus*, qui peuvent servir de source potentielle de composés anti-cancéreux. Par comparaison à l'acide ursolique, molécule naturelle de référence pour ce type d'activité ($CI_{50} = 6,85 \mu\text{g/mL}$), les extraits de *T. numidicus* ne sont que quatre fois moins actifs. Toutes les molécules contenues dans cet extrait ne sont, certainement pas, toutes actives. Nous pouvons donc espérer être capable de purifier cet extrait ou des molécules dans cet extrait présentant une très forte activité.

V. Bilan des résultats & discussion

Dans le but de faire une évaluation des activités antioxydante et antiproliférative, des extraits issus des trois espèces endémiques de *Thymus* (*T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. ciliatus*), en prenant en considération leur teneur en composés phénoliques totaux et leurs rendements correspondants, un bilan des résultats a été fait pour chaque espèce. Ces activités sont comparées, d'une part, à celles de l'espèce de référence du genre, *T. vulgaris* et, d'autre part, aux antioxydants (picnogénol, marc de raisin, vitamine E et quercétine) et antiprolifératif (l'acide ursolique) de référence. Le **Tableau 30** présente les codes utilisés pour l'évaluation de ces activités pour les 20 extraits, ainsi que leurs teneurs en composés phénoliques totaux et leurs rendements.

Tableau 30 : Signification de codes utilisés pour l'évaluation des extraits de *Thymus*.

% inhibition du DPPH : X	CI ₅₀ DPPH (µg/mL)
X < 50 : Ø 50 ≤ X < 60 : + 60 ≤ X < 70 : ++ 70 ≤ X < 80 : +++ 80 ≤ X < 90 : ++++ 90 ≤ X ≤ 100 : +++++	CI ₅₀ < 50 : +++++ 50 ≤ CI ₅₀ < 70 : ++++ 70 ≤ CI ₅₀ < 90 : +++ 90 ≤ CI ₅₀ < 110 : ++ 110 ≤ CI ₅₀ < 130 : + CI ₅₀ ≥ 130 : Ø (Pas de CI ₅₀ , % inhibition < 50%)
% inhibition de la prolifération cellulaire : X	CI ₅₀ de l'Activité Antiproliférative (µg/mL) Seuil de l'ANCI : (CI ₅₀) < 30 µg/mL
X < 50 : Ø 50 ≤ X < 60 : + 60 ≤ X < 70 : ++ 70 ≤ X < 80 : +++ 80 ≤ X < 90 : ++++ 90 ≤ X ≤ 100 : +++++	CI ₅₀ < 30 : +++++ (ANCI) 30 ≤ CI ₅₀ < 40 : ++++ 40 ≤ CI ₅₀ < 50 : +++ 50 ≤ CI ₅₀ < 60 : ++ 60 ≤ CI ₅₀ < 70 : + Pas de CI ₅₀ : Ø (% inhibition < 50%)

Dans le **Tableau 31**, sont résumés les résultats des tests d'activité antioxydante et antiproliférative, réalisés sur les extraits éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol et aqueux, des espèces étudiées de *Thymus*. L'espèce *T. vulgaris* est prise comme référence du genre pour comparaison. Les rendements des extraits, ainsi que, leur teneur en composés phénoliques totaux sont aussi présentés.

Tableau 31 : Récapitulatif des activités antioxydante et antiproliférative ainsi que des rendements et de la teneur en phénols totaux déterminés pour les 4 espèces de *Thymus*.

		Extraits	<i>T. numidicus</i>	<i>T. guyonii</i>	<i>T. ciliatus</i>	<i>T. vulgaris</i>
Rendement (g) de l'extraction 25g	EP		+	+	+	+
	DM		++	+	++	++
	AE		+	+	+	+
	ME		+++	++++	+	++++
	Aq		++++	++++	+++	++++
Test d'activité antioxydante	% inhibition du DPPH	EP	Ø	Ø	Ø	Ø
		DM	Ø	+++	Ø	Ø
		AE	Ø	+++	Ø	Ø
		ME	++++	++	++	+
		Aq	++++	++	++	++
	CI ₅₀ (µg/mL)	EP	Ø	Ø	Ø	Ø
		DM	Ø	+++	Ø	Ø
		AE	Ø	+++	Ø	Ø
		ME	++++	++	++	++
		Aq	++++	+++	+++	+++
Taux des phénols totaux (g/100g équiv. Pyrogallol)	EP		+	+++	+	++
	DM		++	+++	+	++
	AE		+	++++	++	+++
	ME		++++	++++	++++	++++
	Aq		++++	++++	++++	++++
Test d'activité antiproliférative	% inhibition des cellules HT-29	EP	Ø	Ø	Ø	Ø
		DM	++++	Ø	+++	++++
		AE	++++	Ø	Ø	++++
		ME	Ø	Ø	Ø	Ø
		Aq	Ø	Ø	Ø	Ø
	CI ₅₀ (µg/mL)	EP	Ø	Ø	Ø	Ø
		DM	++++	Ø	+++	++++
		AE	++++	Ø	Ø	++++
		ME	Ø	Ø	Ø	Ø
		Aq	Ø	Ø	Ø	Ø

Les résultats observés lors du test d'inhibition du radical DPPH, ont confirmé l'hypothèse que les plantes de *Thymus* étudiées, pouvaient être une source potentielle d'antioxydants naturels. Ainsi, nous avons montré que les propriétés antioxydantes des plantes de *Thymus*, se trouvaient essentiellement dans les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux), possédant les rendements les plus élevés, à l'exception de l'extrait méthanol de *T. ciliatus*.

Excepté l'espèce *T. numidicus*, les extraits aqueux sont légèrement plus actifs que les extraits méthanol, pour les autres espèces étudiées de *Thymus*. De plus, les rendements de tous les extraits aqueux sont légèrement plus élevés que ceux des extraits méthanol. Pérez-Tortosa et al. (2012) montraient, dans leur étude sur *Thymus membranaceus*, que l'eau peut être, relativement, considérée comme un bon extractant comme il a été rapporté, auparavant, pour les herbes Lamiaceae (Dorman et al., 2003; Chun et al., 2005) et d'autres espèces médicinales (Katalinic et al., 2006).

Nous notons que l'activité antiradicalaire des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. guyonii* est meilleure que celle des extraits méthanol et aqueux de *T. guyonii*, *T. ciliatus* et *T. vulgaris*. Ce résultat est relativisé au vu du faible rendement d'extraction de ces deux extraits (0,6 et 1,6%, dichlorométhane et acétate d'éthyle, respectivement, Tableau 23).

Le meilleur potentiel antioxydant, a été observé pour l'espèce endémique *T. numidicus*, via les extraits méthanol et aqueux. Ces derniers ne sont que 2 et 2,7 fois moins actifs que le picnogénol et le marc de raisin, respectivement (extraits de référence) et 2 et 4 fois moins actifs que la vitamine E et la quercétine, respectivement (molécules de référence). Cette activité antioxydante de *T. numidicus* est presque deux fois supérieure pour les mêmes types d'extraits des trois autres espèces de *Thymus*.

Cette activité est confirmée par le taux élevé des composés phénoliques totaux (16,7 g/100g équiv.Pyrogallol) de ces deux extraits les plus polaires de *T. numidicus*. De plus, une bonne corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de *Thymus* ($R^2 = 0,8405$) est bien démontrée dans notre étude.

Nos résultats sont en accord avec la littérature. Plusieurs auteurs (**Dorman et al., 2003; Wong et al., 2006; Dudonné et al., 2009**) ont décrits de bonnes corrélations entre le DPPH et le test de capacité réductrice, dans différentes herbes et épices appartenant à la famille des Lamiaceae. De plus, des corrélations positives entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques totaux, ont été largement rapportés parmi les différents breuvages, graines, fruits et légumes (**Proteggente et al., 2002; Rivero- Perez et al., 2007; Szydłowska-Czerniak et al., 2010**).

Ce résultat est très intéressant, pour l'utilisation des extraits polaires de la plante *T. numidicus*, comme protecteurs contre le stress oxydatif, tel que l'irradiation UV. En effet, les composés antioxydants, peuvent être utilisés pour prévenir la dégradation induite par l'irradiation UV. Selon **Satoh et al. (1997)**, α -Tocophérol et Trolox (un analogue synthétique de l' α -tocophérol) réduisent significativement la cytotoxicité induite par l'irradiation.

Excepté l'espèce *T. guyonii* et l'extrait acétate d'éthyle de *T. ciliatus*, les extraits apolaires de *Thymus* présentent une activité antiproliférative, vis-à-vis de la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29. L'espèce endémique avec meilleur effet antiprolifératif, est *T. numidicus* via les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle. Cet effet est presque identique à celui de l'espèce de référence *T. vulgaris* pour les mêmes types d'extraits.

L'activité antiproliférative des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. numidicus* ($CI_{50} = 26,9$ et $25,8 \mu\text{g/mL}$, respectivement), se révèle très intéressante selon les normes posés par l'American National Cancer Institute (ANCI), qui prend la concentration inhibitrice 50 ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ comme seuil de signification pour les extraits bruts (**Hennebelle et al., 2008**).

Ainsi, les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de l'espèce endémique *T. numidicus*, peuvent servir de source potentielle de composés anti-cancéreux. Par ailleurs, ces deux extraits ne sont que quatre fois moins actifs que l'acide ursolique, molécule naturelle de référence pour ce type d'activité ($CI_{50} = 6,85 \mu\text{g/mL}$).

Cette activité antiproliférative des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. numidicus*, pourrait être due, au moins en partie, au caractère hydrophobe élevé des composés contenus dans ces extraits qui, probablement, peuvent s'incorporer fortement dans les

membranes, et peuvent agir comme agent antiprolifératif à ce niveau. **Najid et al. (1992)** et **Simon et al. (1992)** identifiaient dans les fractions apolaires de *Cal. Vulgaris*, l'acide ursolique qui est un acide triterpène pentacyclique, connu à être un très puissant inhibiteur de la croissance cellulaire. **Lauthier et al. (2000)** démontraient l'action de l'acide ursolique sur la membrane des cellules Daudi (Burkitt's human B cells). Par conséquent, ce n'est pas déraisonnable de spéculer que l'activité antiproliférative observée particulièrement pour *T. numidicus*, ainsi que pour les extraits apolaires de plantes que nous avons testé (à l'exception de *T. guyonii* et l'extrait acétate d'éthyle de *T. ciliatus*), pourrait être due au même types de composés, qui agissent par modification de l'activité membranaire de la cellule.

D'autres mécanismes permettant l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, sont proposés en littérature pour les extraits de plantes de thym. **Malik et al. (2003)** rapportent que les composés phénoliques peuvent bloquer les phases G1/G0 et G2/M du cycle cellulaire. Selon **Lazze et al. (2004)**, une réduction de cellules en phase G1 et l'apparition d'une fraction de cellules avec un contenu en ADN hypodiploïde, ont été rapporté à être associés avec le traitement des cellules d'adénocarcinome du colon humain, par des composés phénoliques.

Suganuma et al. (1998) et **Manach et al. (2004)** rapportent que des niveaux très élevés de composés phénoliques, ont été détecté dans les intestins d'animaux que dans d'autres tissus, après supplémentation orale. Les composés phénoliques pourraient inhiber le développement du cancer de colon dans les intestins humains, avant qu'ils soient absorbés et détectés dans le plasma (**Yi & Wetzstein, 2011**).

La synthèse des résultats des activités antioxydante et antiproliférative, montre que le *T. numidicus* est l'espèce de *Thymus* qui présente le potentiel biologique le plus intéressant : les extraits les plus polaires sont les plus antioxydants, et les extraits les moins polaires sont les plus antiprolifératifs. Ainsi, ce bioguidage oriente vers l'étude phytochimique de cette espèce endémique, afin d'en purifier les molécules actives (deuxième et troisième partie de ce travail).

Chapitre 2

**Etude biologique et phytochimique des fractions
issues de l'extrait hydro-alcoolique de *Thymus
numidicus***

La première partie de notre étude sur les **extraits de *Thymus***, a permis de démontrer le potentiel du *T. numidicus*, tant en terme d'activité antioxydante que d'activité antiproliférative.

Nous avons montré que l'activité antioxydante, était principalement retrouvée dans les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux). Nous avons donc décidé de réaliser, directement à partir de la plante broyée, un extrait hydro-alcoolique concentrant la majorité des molécules responsables de l'activité antioxydante. Nous pourrions, dans un premier temps, déterminer le potentiel antioxydant de ce type d'extrait, généralement trouvé sur le marché des compléments alimentaires. Puis, suite à une nouvelle série d'extraction, nous tenterons d'isoler les principaux composants responsables de l'activité antioxydante.

Nous avons, également, déterminé le potentiel de l'extrait hydro-alcoolique et ses différentes fractions, en terme d'activités antibactérienne et antivirale qui, selon **Sunar et al. (2009)**, sont bien confirmées pour le genre *Thymus*. Des travaux antérieurs ont montré le potentiel antibactérien des extraits éthanolique et aqueux du genre *Thymus* (**Kandil et al., 1994; Ghasemi-Pirbalouti et al., 2011**). Quant à l'activité antivirale, d'une part, elle est investiguée pour les huiles essentielles du genre *Thymus* (**Astani et al., 2010; Behravan et al., 2011**) et, d'autre part, plusieurs auteurs (**Chattopadhyay & Naik, 2007; Chattopadhyay & Bhattacharya, 2008; Naithani et al., 2008**) rapportent que les polyphénols possèdent une application thérapeutique contre divers virus. Les résultats de la première partie de notre étude sur les **extraits de *Thymus***, montrent que les composés phénoliques sont trouvés concentrés dans les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux) des différentes espèces de *Thymus*, surtout celle de *T. numidicus*. Ainsi, l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et ses différentes fractions sont testés pour cette activité.

I. Obtention de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

L'extraction de 2 Kg de la plante *T. numidicus* (*Tn*) par un mélange de solvants Ethanol/Eau distillée : 80/20 (v/v) (cf. Matériels & Méthodes), a conduit à l'obtention de 373 g d'extrait hydro-éthanolique (**E Et *Tn***) (rendement : 18,65 %). L'extraction par des solvants de polarité croissante a conduit à l'obtention de cinq fractions (**F**) dont les masses, ainsi que les rendements déterminés à partir du poids initial de la plante broyée, sont présentés dans le **Tableau 32**.

Tableau 32 : Masses (g) et rendements (%) des différentes fractions de l'espèce *T. numidicus* issues de l'extrait hydro-alcoolique.

	Masse (g)	%
F EP <i>Tn</i>	2	0,10
F DM <i>Tn</i>	7	0,35
F AE <i>Tn</i>	13	0,65
F Bu <i>Tn</i>	38	1,90
F Aq <i>Tn</i>	263	13,15

Comme attendu, les fractions les plus polaires (butanol et eau) sont celles ayant permis d'obtenir les meilleurs rendements : respectivement 2 et 13 %. Nous allons, par la suite, déterminer l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques de l'extrait hydro-éthanolique et ses différentes fractions.

II. Détermination de l'activité antioxydante (DPPH) et du taux de composés phénoliques de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

Nous avons déterminé la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) et le taux de composés phénoliques totaux (g/100g équivalent Pyrogallol), de l'extrait hydro-éthanolique et des cinq fractions de *T. numidicus* (dont le protocole d'obtention est présenté dans Matériel & Méthodes). Les techniques utilisées sont identiques à celles décrites dans la première partie de ce travail. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 33**.

Afin de connaître le potentiel réel des composés testés, nous les avons comparés à ceux obtenus pour le picnogénol (extrait d'écorce de pin maritime) et l'extrait marc de raisin (deux extraits de plantes unanimement reconnus pour ce type d'activité). Nous avons,

également, comparé les résultats obtenus à ceux de la vitamine E (antioxydant biologique de référence) et de la quercétine (molécule antioxydante de référence d'origine naturelle).

Tableau 33 : Inhibition du radical DPPH (CI₅₀) et taux de composés phénoliques totaux de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions.

<i>T. numidicus</i>	Phénols totaux (g/100g équiv.Pyrogallol)	CI ₅₀ (µg/mL)
E Et <i>Tn</i>	11,4 ± 0,5	75,0 ± 1,0
F EP <i>Tn</i>	24,1 ± 0,2	367,0 ± 8,0
F DM <i>Tn</i>	12,1 ± 0,8	112,0 ± 3,0
F AE <i>Tn</i>	35,0 ± 1,4	19,7 ± 0,5
F Bu <i>Tn</i>	13,9 ± 0,1	76,4 ± 2,0
F Aq <i>Tn</i>	7,3 ± 0,4	140,0 ± 8,0
Standards antioxydants de référence		
Picnogénol®	30,7	25,0 ± 1,0
Marc de Raisin	39,6	17,4 ± 0,5
Vitamine E	-	25,0 ± 0,5
Quercétine	-	12,0 ± 0,5

II.1. Comparaison de l'extrait hydro-alcoolique par rapport aux extraits polaires (méthanol et aqueux) de *T. numidicus* en terme d'activité antioxydante

En termes de CI₅₀ ainsi que du taux de composés phénoliques totaux (CPT) et du rendement, nous comparons, dans le **Tableau 34**, l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* aux extraits méthanol et aqueux de cette plante (étudiés dans la première partie de ce travail et dont le protocole d'obtention est présenté dans Matériel & Méthodes, Section **I.2.1**).

Tableau 34 : Comparaison de l'extrait hydro-alcoolique par rapport aux extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus*.

	Extrait hydro-alcoolique de <i>T. numidicus</i>	Extraits les plus polaires de <i>T. numidicus</i>	
		Méthanol (E Me Tn)	Aqueux (E Aq Tn)
CI ₅₀ (µg/mL)	75,0 ± 1,00	47,9 ± 1,00	47,0 ± 2,20
Rendement (%)	18,65	8,77	10,46
Taux de composés phénoliques totaux (g/100g équiv.Pyrogallol)	11,4 ± 0,50	16,7 ± 0,52	16,7 ± 0,07

Nous notons une légère diminution de l'activité antioxydante de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* (CI₅₀ = 75,0 ± 1,0 µg/mL) par rapport à celle des extraits méthanol et aqueux de cette même plante (CI₅₀ = 47,9 ± 1,0 et 47,0 ± 2,2 µg/mL, respectivement) (cf. Résultats & Discussion, **Chapitre 1.2, Section II.2**). Cela est confirmé par le taux des composés phénoliques totaux qui passe de 16,7, pour les extraits méthanol et aqueux, à 11,4 g/100g équiv.Pyrogallol pour l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus*.

Cette légère perte d'activité antioxydante pourrait être due au mode d'extraction séquentielle, car le rendement est le même pour l'extrait hydro-alcoolique et les deux extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus* (≈19%).

II.2. Comparaison entre l'activité antioxydante de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et les antioxydants de référence

En terme d'activité antioxydante, l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* est 3 à 4 fois moins actif que le picnogénol et le marc de raisin, respectivement. Cette activité est, malgré tout, intéressante d'autant plus que cette procédure d'extraction, contrairement à la première, est utilisable dans l'industrie pour réaliser un extrait commercialisable (gestion des déchets après extraction). Par comparaison aux molécules standard, l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* est 3 à 6 fois moins actif que la vitamine E et la quercétine, respectivement.

II.3. Comparaison des différentes fractions issues de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus*

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, met en lumière deux fractions d'intérêt. Il s'agit des fractions acétate d'éthyle et butanol, qui possèdent une activité au moins égale à l'extrait de départ. Nous avons visiblement concentré, dans ces deux fractions, les composés antioxydants les plus actifs, plus particulièrement dans la fraction acétate d'éthyle.

Si la fraction butanolique, à CI_{50} presque identique à celle de l'extrait de départ (**E Et Tn**), est 3 à 4 fois moins active que le picnogénol et le marc de raisin (extraits antioxydants de référence), respectivement, la fraction acétate d'éthyle se situe à un niveau compris entre ces deux extraits de référence (> au picnogénol et < au marc de raisin). Elle est également plus active que la vitamine E et 2 fois moins active que la quercétine, qui est l'un des meilleurs antioxydants d'origine naturelle connus.

Comme précédemment, les résultats sont en accord avec le taux des composés phénoliques totaux des fractions. La fraction acétate d'éthyle présente un taux de composés phénoliques totaux de 35 %, compris entre celui du picnogénol (30,7 %) et du marc de raisin (39,6 %).

Il est à noter que nous avons observé un résultat surprenant, concernant le taux de composés phénoliques totaux de la fraction éther de pétrole (CPT = 24,1 %, CI_{50} = 367,0 $\mu\text{g/mL}$). Ce résultat est certainement due à une interaction entre un composé contenu dans la fraction (autre qu'un polyphénol) et le réactif de Folin-Ciocalteu, entraînant un faux positif.

II.4. Bilan

L'objectif de l'extrait hydro-alcoolique n'est pas totalement atteint, car nous observons une légère diminution de l'activité antioxydante par rapport aux extraits de départ. Malgré tout, la procédure d'extraction utilisée est plus en accord avec les procédures utilisées par l'industrie des compléments alimentaires. Malgré cette baisse, le niveau d'activité reste très intéressant et permet de considérer le *T. numidicus*, comme une plante de choix pour la réalisation d'un futur complément alimentaire à visée antioxydante.

Il sera également possible d'optimiser la procédure d'extraction, afin d'augmenter l'activité antioxydante tout en maintenant un rendement d'extraction correct.

Lors du fractionnement, nous sommes parvenus à concentrer les principaux composés responsables de l'activité antioxydante dans la fraction acétate d'éthyle. Celle-ci va pouvoir nous servir de base à la purification et à l'identification des molécules responsables de cette activité. Ceci va faire l'objet de la suite de ce travail (Section **III**).

III. Détermination de la structure des composés isolés

Les procédures de séparation et de purification de molécules d'intérêt à partir de la fraction acétate d'éthyle, sont détaillées dans Matériel & Méthodes, Section **VI**.

III.1. Détermination structurale du composé 1

Le spectre de RMN ^1H (**Figure 26**) révèle clairement la présence :

- Des signaux résonant entre 6,61 et 7,03 ppm caractéristiques des protons aromatiques et indiquent la présence de deux noyaux aromatiques.
- Deux signaux résonant à 6,26 et 7,52 ppm sous la forme d'un doublet (d , $J = 15,9$ Hz) et intégrant chacun pour un proton, correspondant à deux protons oléfiniques. La grande constante de couplage ($J = 15,9$ Hz) indique une géométrie *trans* de la double liaison. Le déblindage du déplacement chimique de l'un de ces protons ($\delta_{\text{H}} 7,52$), suggère que ce proton est lié à un noyau aromatique.
- Un signal sous forme d'un doublet de doublet résonant à $\delta_{\text{H}} 5,13$ (dd , $J = 9,1$ et $3,6$ Hz) et intégrant pour un proton correspondant à un groupement oxyméthine OCH. Le déblindage de ce proton, suggère qu'il est lié à une fonction qui présente un pouvoir attracteur puissant.
- Deux signaux, apparaissant sous forme d'un doublet dont l'un résonne à $\delta_{\text{H}} 2,96$ (dd , $J = 14,2$ et $9,3$ Hz) et à $\delta_{\text{H}} 3,11$ (dd , $J = 14,2$ et $3,6$ Hz), correspondent à deux protons oléfiniques formant un système AB.

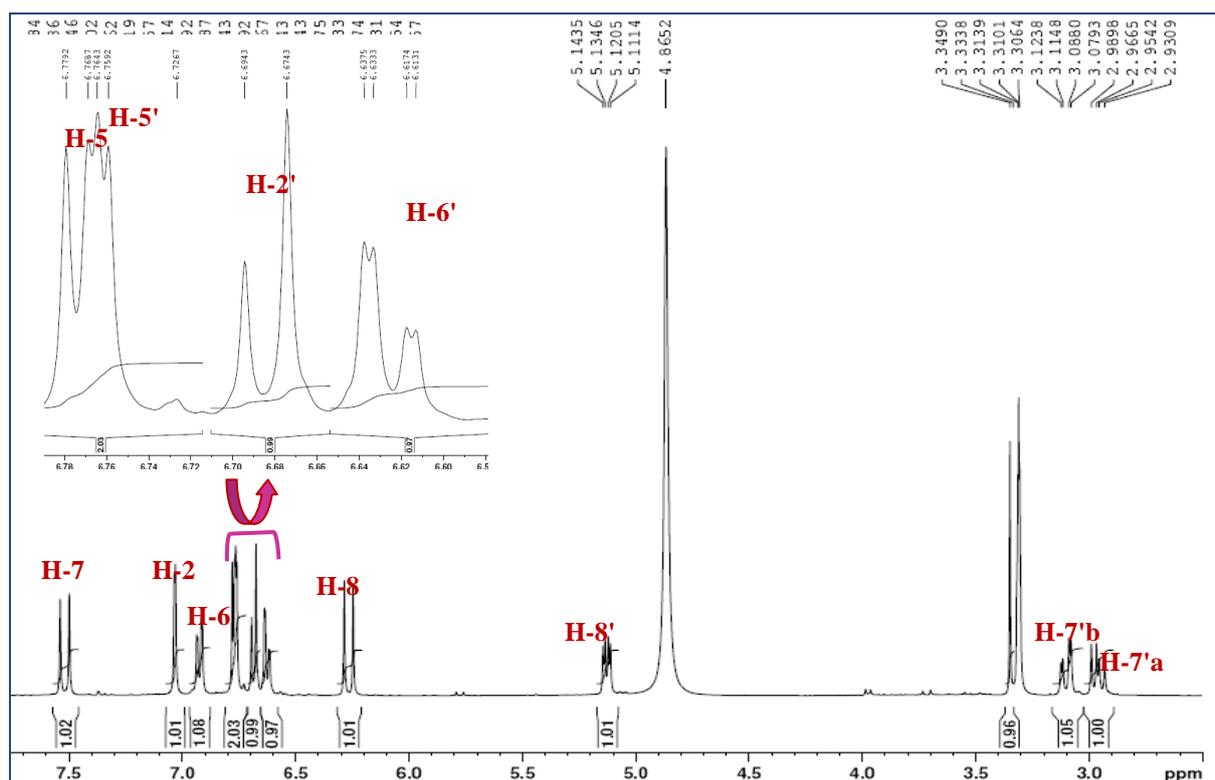
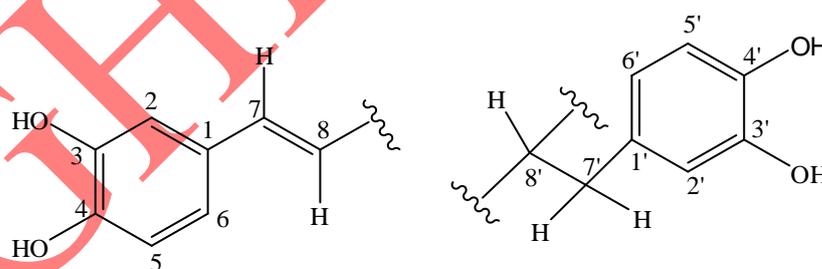


Figure 26 : Spectre de RMN ^1H du composé **1**.

Ce premier constat permet de suggérer les fragmentations suivantes qui, apparemment, proviennent d'un composé phénolique :



Le spectre de RMN ^{13}C (**Figure 27**) indique la présence de 18 carbones. On distingue quelques carbones caractéristiques :

- Douze carbones aromatiques dont (6 CH), (4 C oxygénés) et deux carbones quaternaires, confirmant ainsi la présence de deux noyaux aromatiques trisubstitués.
- Un carbonyle ester à 169,0 ppm.
- Un carbonyle vers 176,4 ppm.
- Deux carbones oléfiniques à 115,4 et 147,1 ppm.

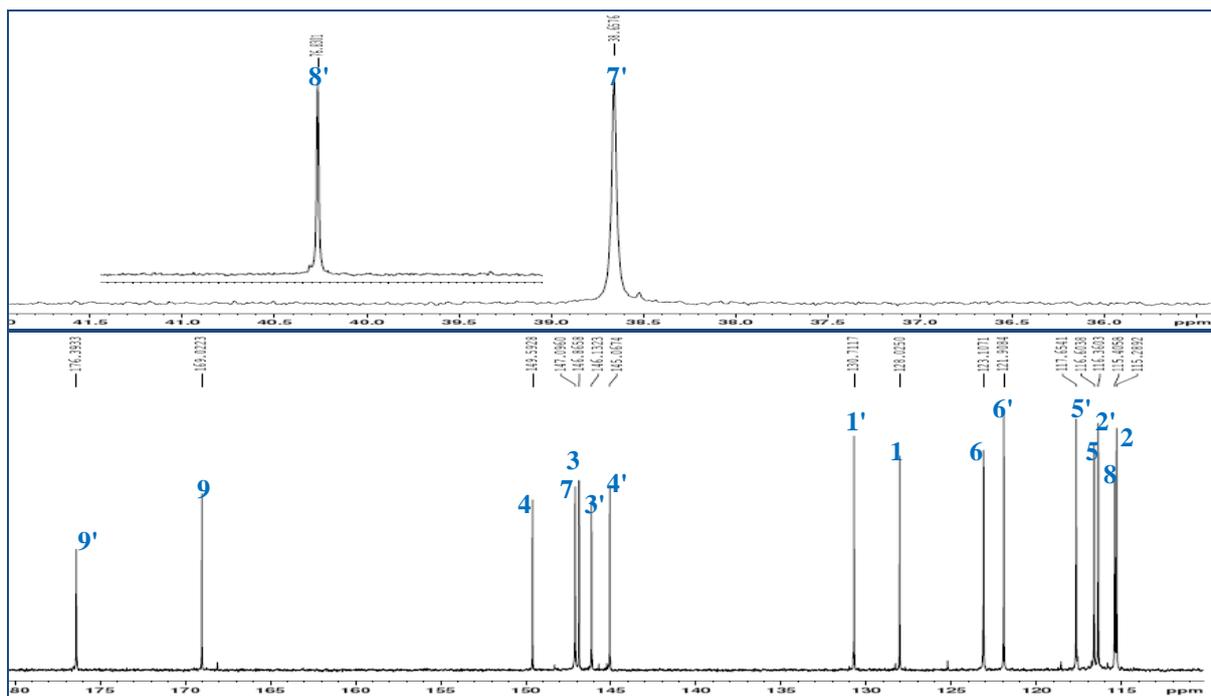


Figure 27 : Spectre de RMN ^{13}C du composé 1.

L'expérience de corrélation homonucléaire ou COSY H-H (**Figures 28 et 29**), montre des corrélations entre :

- Le proton H-7'a et le proton H-7'b résonant respectivement à δ_{H} 2,96 et δ_{H} 3,11.
- Les deux protons H-7' et le proton vicinal H-8' résonant à δ_{H} 5,13.

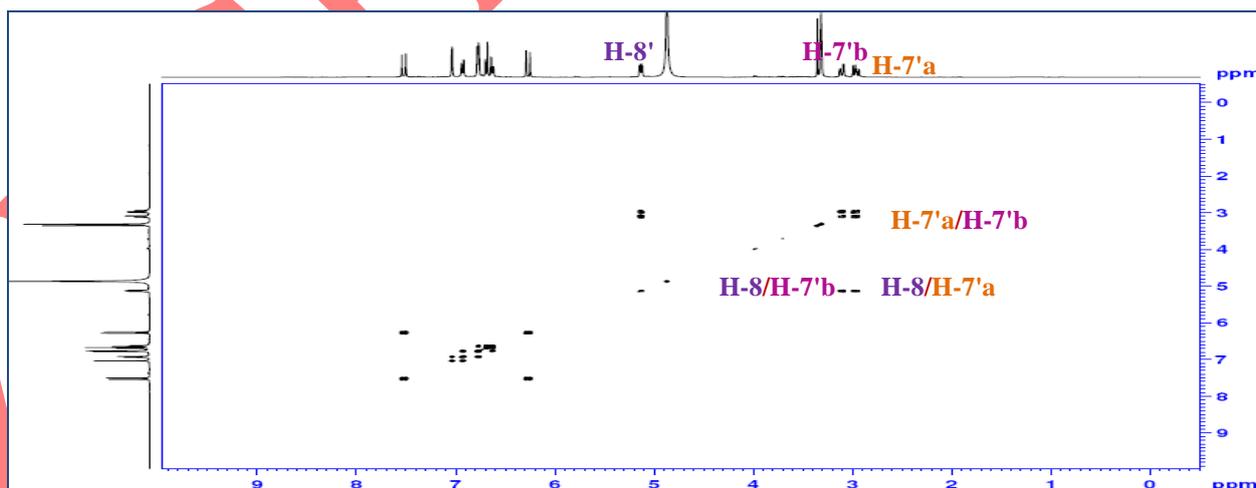


Figure 28 : Spectre COSY du composé 1.

- Le proton, H-7 résonant à δ_H 7,52 et le proton vicinal H-8 résonant à δ_H 6,26 ppm.
- Le proton aromatique H-5 résonant à δ_H 6,77 et le proton vicinal H-6 résonant à δ_H 6,92.
- Le proton aromatique H-5' résonant à δ_H 6,76 et le proton vicinal H-6' résonant à δ_H 6,63.

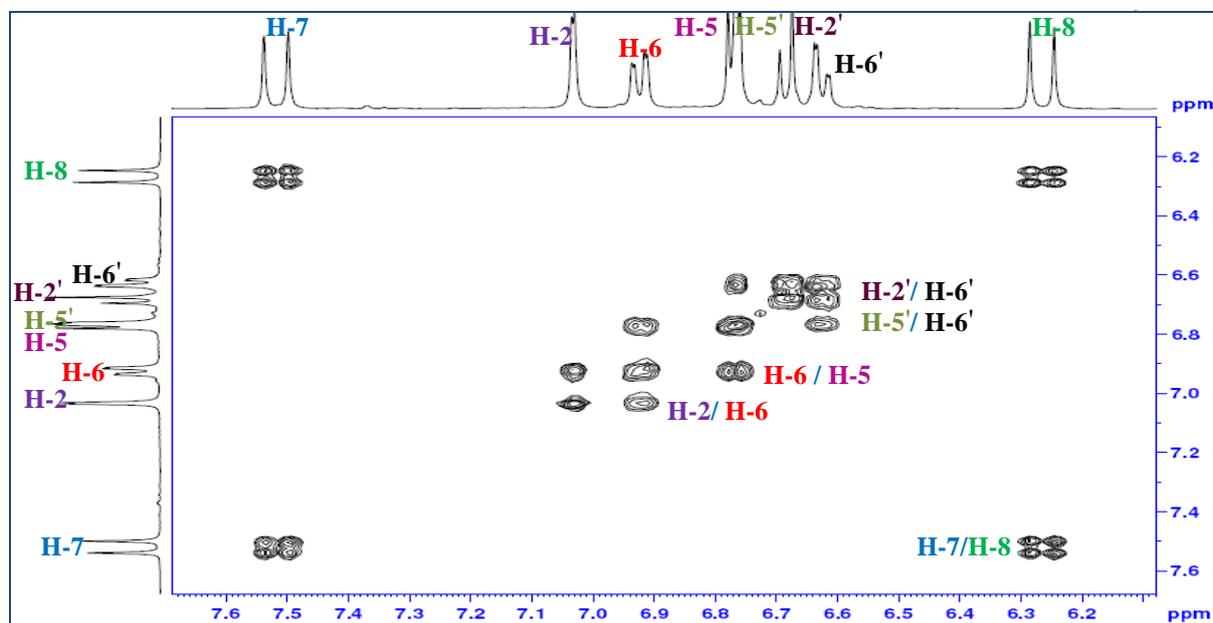


Figure 29 : Spectre COSY étalé du composé **1**.

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ visualisés sur le spectre HMQC (**Figure 30**), permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (**Tableau 35**) correspondants (C-5, C-6, C-7, C-8, C-5', C-6', C-7', C-8').

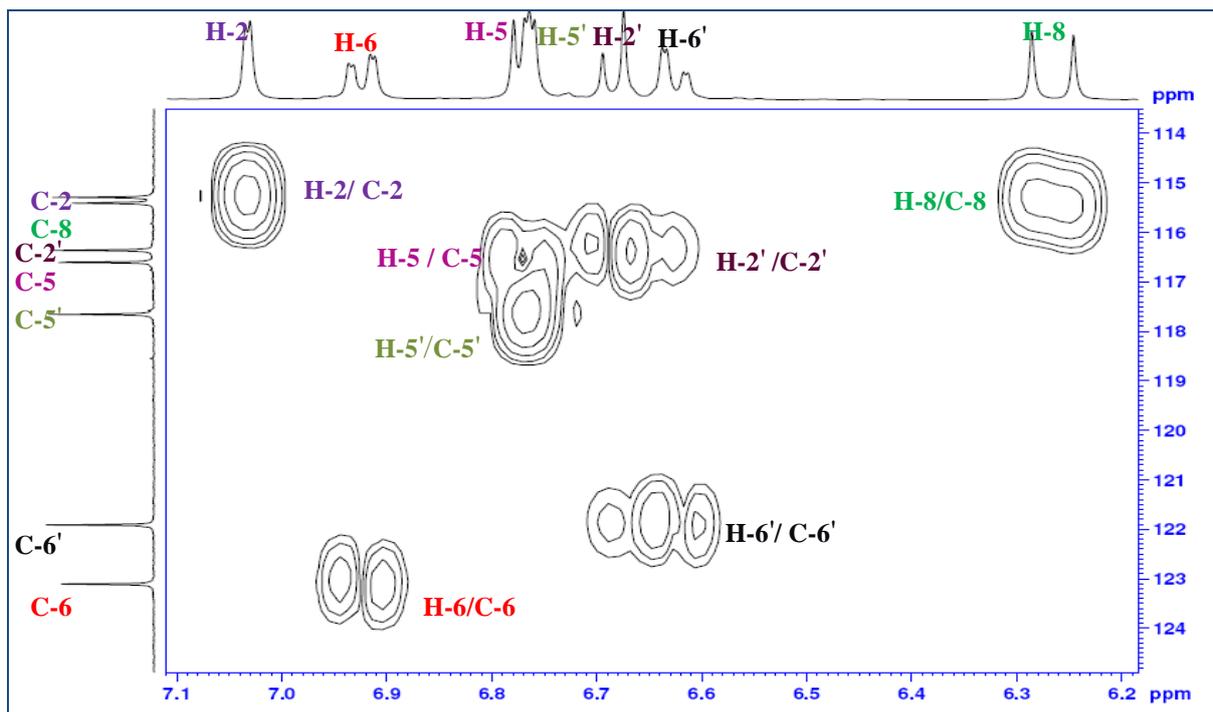


Figure 30 : Spectre HMQC du composé 1.

L'analyse de l'expérience HMBC, qui visualise les couplages entre protons et carbones distants de deux ou trois liaisons ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$), permet d'observer les couplages entre :

- Les protons (H-7'a) et (H-7'b) et les carbones C-8' et C-9' en 2J et 3J , respectivement. Ces protons couplent également avec le carbone quaternaire C-1' (130,7 ppm), le carbone C-2' (116,4 ppm) et le carbone C-6' (121,9 ppm). L'expérience HMBC montre les corrélations du proton H-2' avec deux carbones résonant à δ_c 146,1 et 145,1 attribués aux carbones aromatiques quaternaires H-3' et H-4' (**Figure 31**).

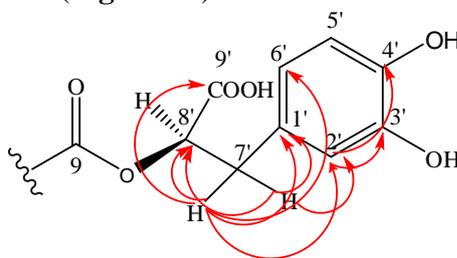


Figure 31 : Corrélations HMBC des protons 7'a et 7'b.

- Le proton H-8' et les carbones C-7', C-9' et C-1', respectivement. Ce proton corrèle avec un carbone résonant à δ_C 169,0 en 3J , qui devrait être un carbonyle d'une fonction ester C-9.
- Le proton oléfinique H-7 et les carbones C-9, C-2 et C-6 résonant à δ_C 169,0, 115,3 et 123,1, respectivement (**Figure 32**).
- Le douzième proton oléfinique H-8 résonant à δ_H 6,26 et le carbone C-9 et le carbone quaternaire aromatique C-1 résonant à δ_C 128,0 en 2J . Ce dernier carbone (C-1) corrèle également en 2J avec les protons aromatiques H-2, H-6, eux-mêmes couplant avec les carbones aromatiques quaternaires résonants à δ_C 146,6 et 149,6. Ce qui indique que ce sont les carbones qui portent les fonctions hydroxyle OH, C-3 et C-4, respectivement.

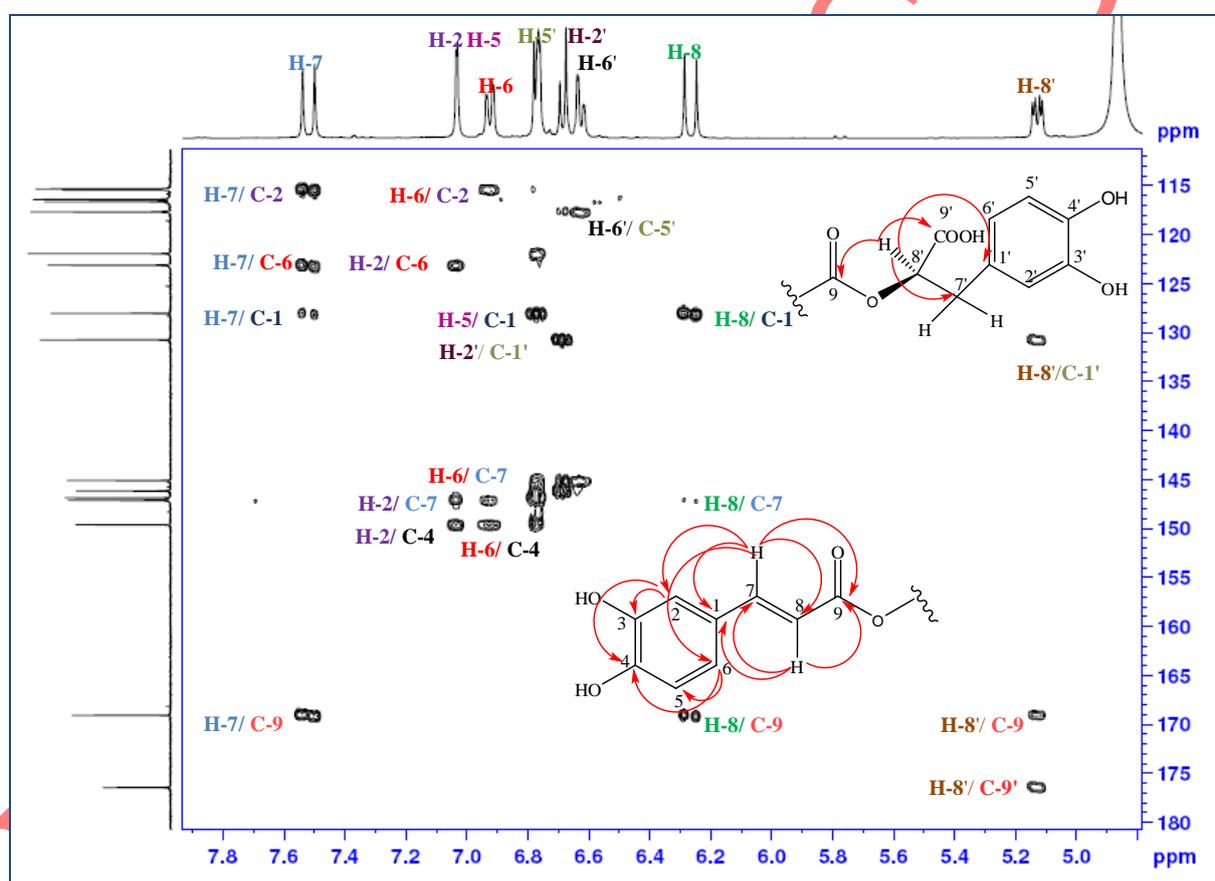
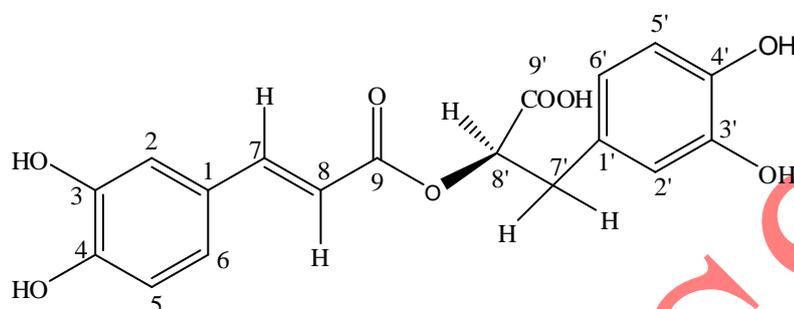


Figure 32 : Spectre HMBC du composé 1.

Cette analyse spectrale a permis d'attribuer tous les protons et les carbones constituant cette molécule. Leurs déplacements chimiques sont identiques à ceux d'un acide rosmarinique. Il a été isolé pour la première fois à l'état pur par deux chimistes italiens,

Scarpati et Oriente, en 1958 (Scarpati & Oriente, 1958; Trute & Nahrstedt, 1996; Petersen & Simmonds, 2003). Son nom provient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus Officinalis*).



L'acide rosmarinique (1).

Tableau 35 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **1** dans CD_3OD .

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
1	128,0	-	2'	116,4	6,69, sl
2	115,3	7,03, d (1,7)	3'	146,1	-
3	146,9	-	4'	145,1	-
4	149,6	-	5'	117,7	6,76, d (8,0)
5	116,6	6,77, d (8,0)	6'	121,9	6,63, dd (8,1 et 1,7)
6	123,1	6,92, dd (8,2 et 1,7)	7'a	38,7	2,96, dd (14,2 et 9,3)
7	147,1	7,52, d (15,9)	7'b		3,11, dd (14,2 et 3,6)
8	115,4	6,26, d (15,9)	8'	76,8	5,13, dd (9,1 et 3,6)
9	169,0	-	9'	176,4	-
1'	130,7	-			

III.2. Détermination structurale du composé 2

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C (Figures 33 et 34) sont globalement similaires à ceux de l'acide rosmarinique (1).

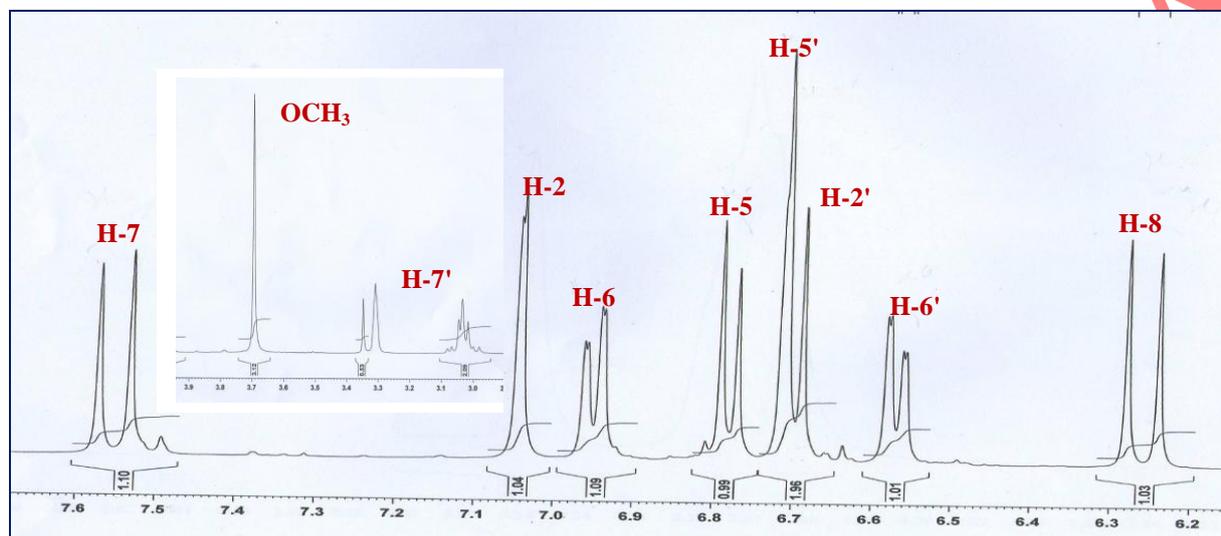


Figure 33 : Spectre de RMN ^1H du composé 2.

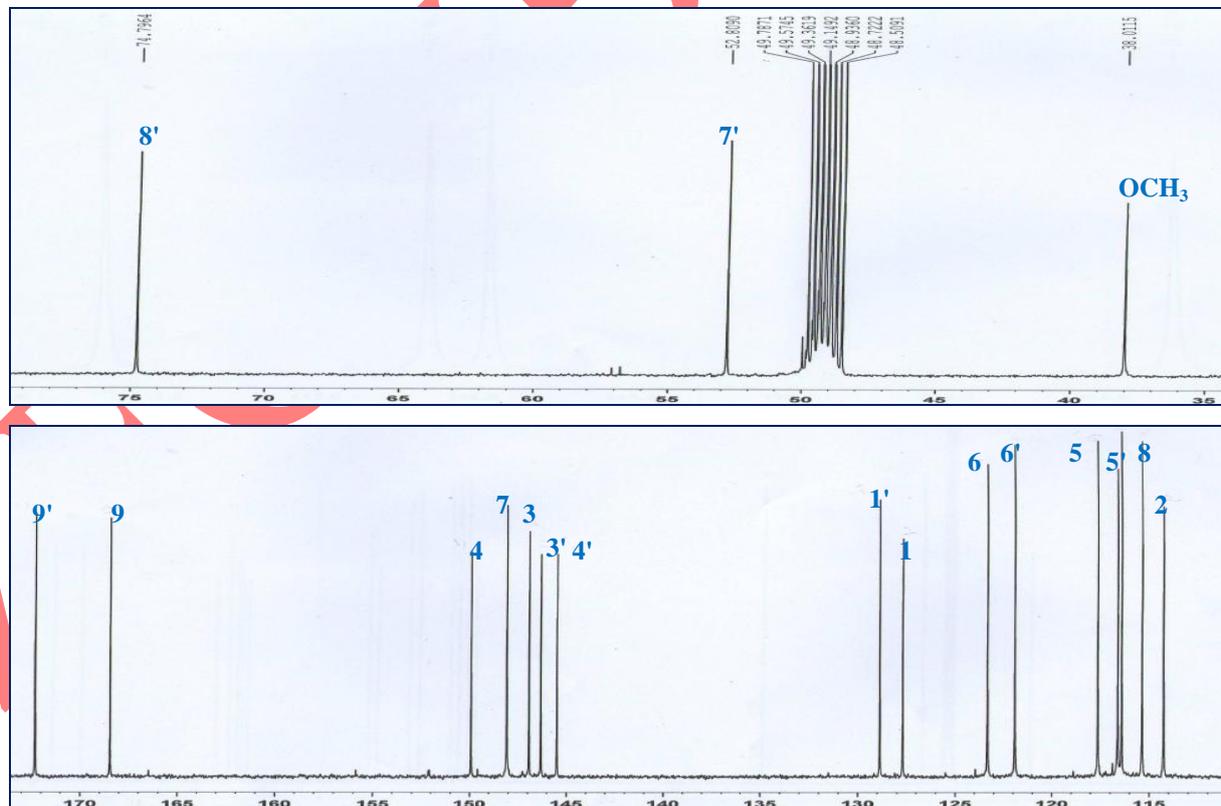


Figure 34 : Spectre de RMN ^{13}C du composé 2.

Les spectres RMN ^{13}C et HMQC permettent d'observer, en plus des signaux de l'acide rosmarinique, un signal à 52,8 ppm attribuable à un ester de méthyle.

La différence par rapport au composé précédent (1), observée en RMN du proton, concerne principalement l'apparition d'un signal supplémentaire résonnant à 3,69 ppm. Ce dernier corrèle sur le spectre HMBC (**Figure 35**) avec le carbone C-9' (δ_{C} 172,3). Ce qui indique la substitution de l'hydrogène du carbonyle par un méthyle.

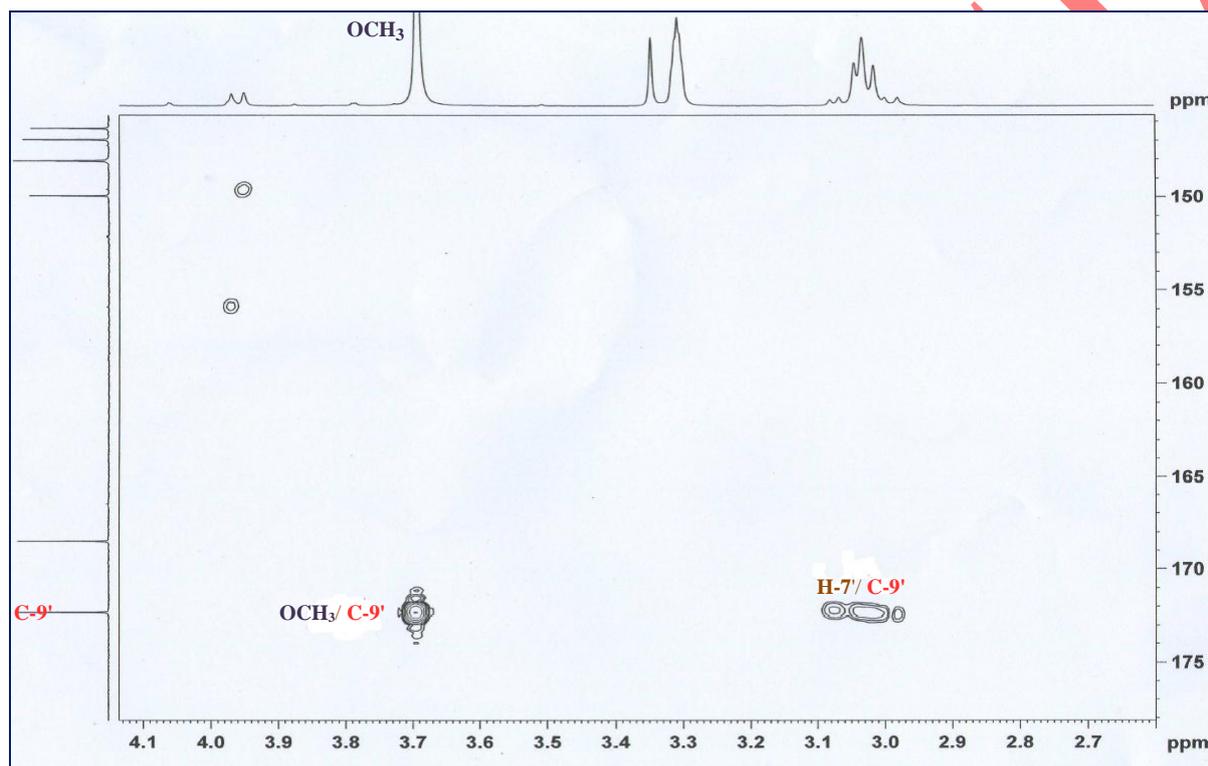
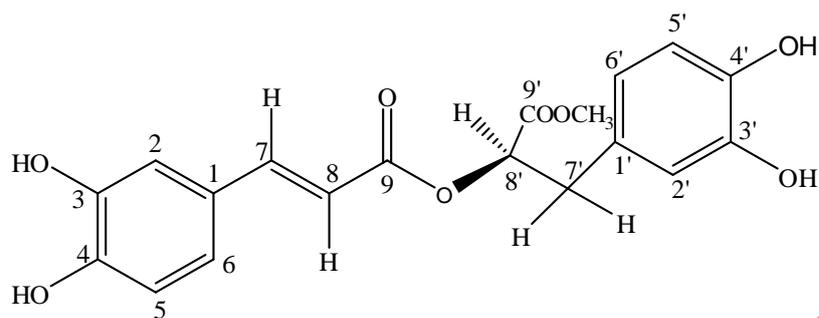


Figure 35 : Spectre HMBC du composé 2.

L'analyse combinée des spectres COSY, H-H, HMQC et HMBC, permet d'assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé (**Tableau 36**). Il s'agit du rosmarinate de méthyle, qui a été isolé pour la première fois de *Clinopodium laxiflorum* (Pfeffer et al., 1979).



Rosmarinate de méthyle (2).

Tableau 36 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **2** dans CD_3OD .

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
1	127,7	-	2'	116,4	6,68, sl
2	114,3	7,04 d, (1,6)	3'	146,3	-
3	146,9	-	4'	145,5	-
4	149,9	-	5'	117,7	6,71, d (8,1)
5	116,6	6,78, d (8,2)	6'	121,9	6,56, dd (8,0 et 1,7)
6	123,3	6,95, dd (8,2 et 1,6)	7'	38,0	3,03, m
7	148,1	7,55, d (15,9)	8'	74,8	5,19, dd (7,3 et 5,5)
8	115,4	6,25, d (15,9)	9'	172,3	-
9	168,5	-	COCH ₃	52,8	3,69, s
1'	128,9	-			

III.3. Détermination structurale du composé **3**

Le spectre de RMN ^1H (**Figure 36**) du composé **3**, montre cinq protons aromatiques caractéristiques d'un flavonol :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à δ_{H} 6,12 ($J = 1,9\text{Hz}$), le second à δ_{H} 6,38 ($J = 1,9\text{Hz}$) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, pour le cycle A. En outre, le cycle B est présenté par des signaux d'un système ABX à δ_{H} 6,88, 7,63 et 7,74, caractéristiques respectivement des protons H-5' (d , $J = 8,5\text{ Hz}$), H-6' (dd , $J = 8,5$ et $2,0\text{ Hz}$) et H-2' (d , $J = 1,9\text{ Hz}$) (**Tableau 37**).

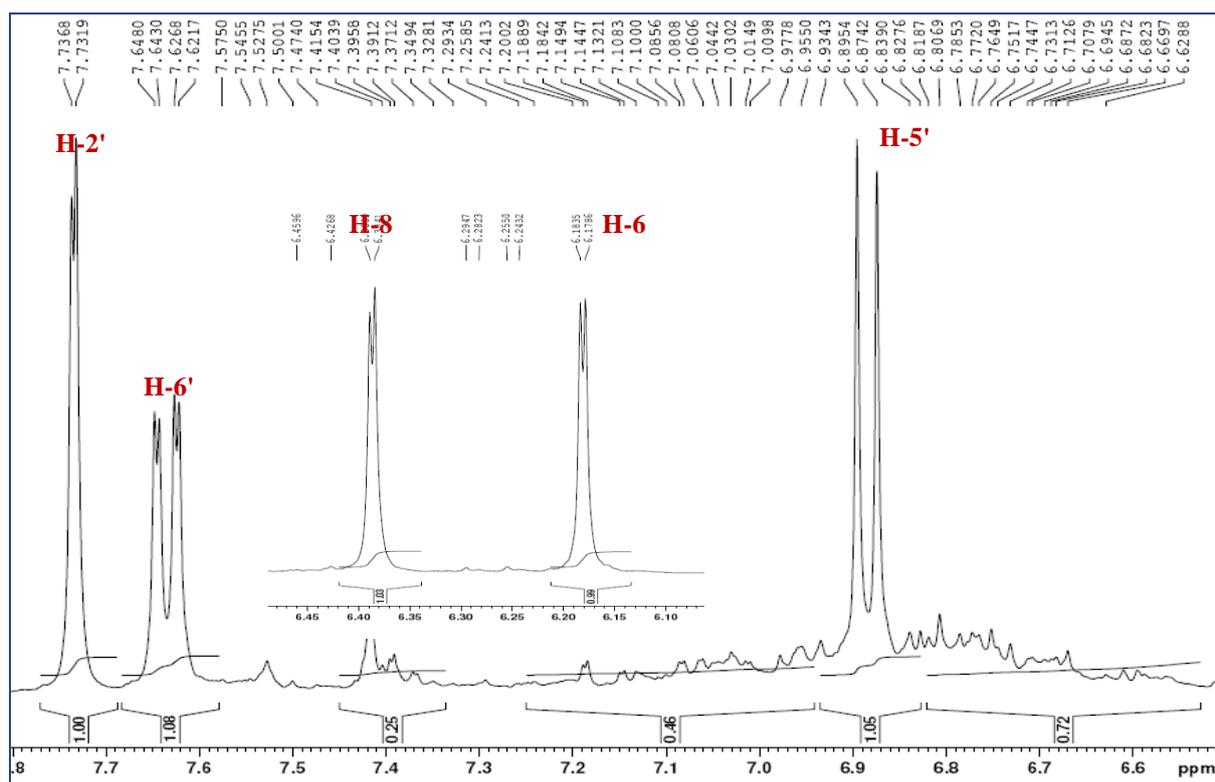


Figure 36 : Spectre de RMN ^1H du composé **3**.

L'étude du spectre de RMN ^{13}C de **3**, apporte des informations complémentaires en affichant quinze signaux (**Figure 37**). Nous observons sept carbones quaternaires aromatiques, ainsi que cinq CH aromatiques que nous pouvons attribuer aux cycles A et B d'un flavonoïde substitué en 5, 7, 3' et 4'.

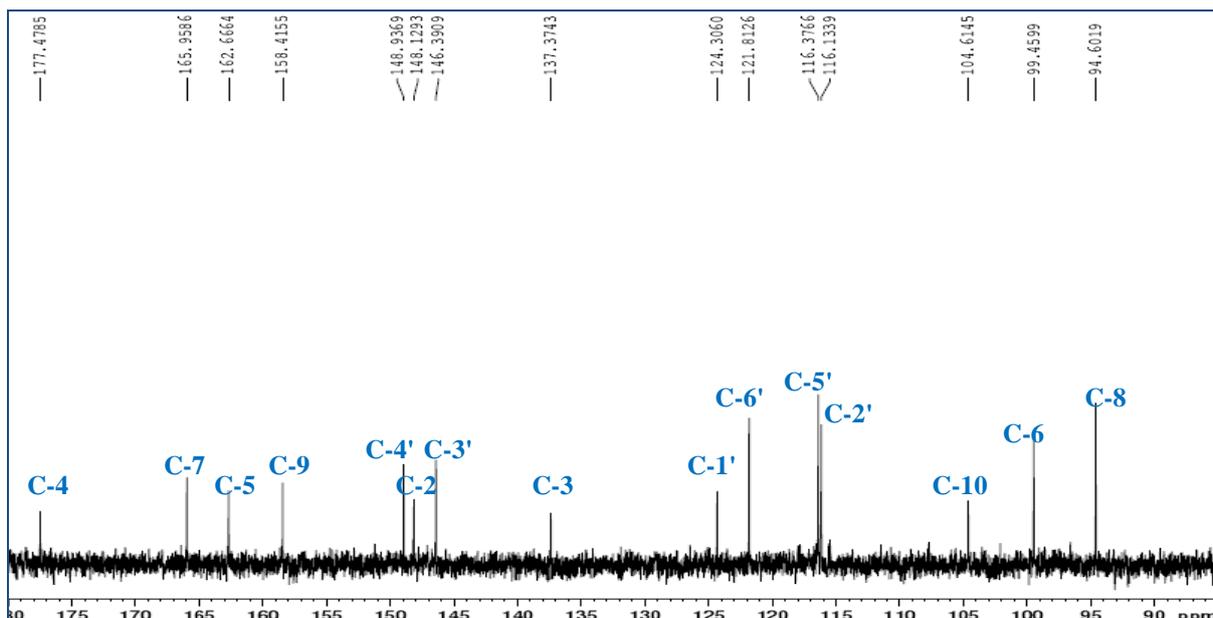


Figure 37 : Spectre de RMN ^{13}C du composé **3**.

Le spectre COSY montre des corrélations entre les protons du Cycle B H-5', H-6' et H-2' (**Figure 38**). Ces protons corrélient en HMQC avec les carbones C-5' (116,4 ppm), C-6' (121,8 ppm) et C-2' (116,1 ppm).

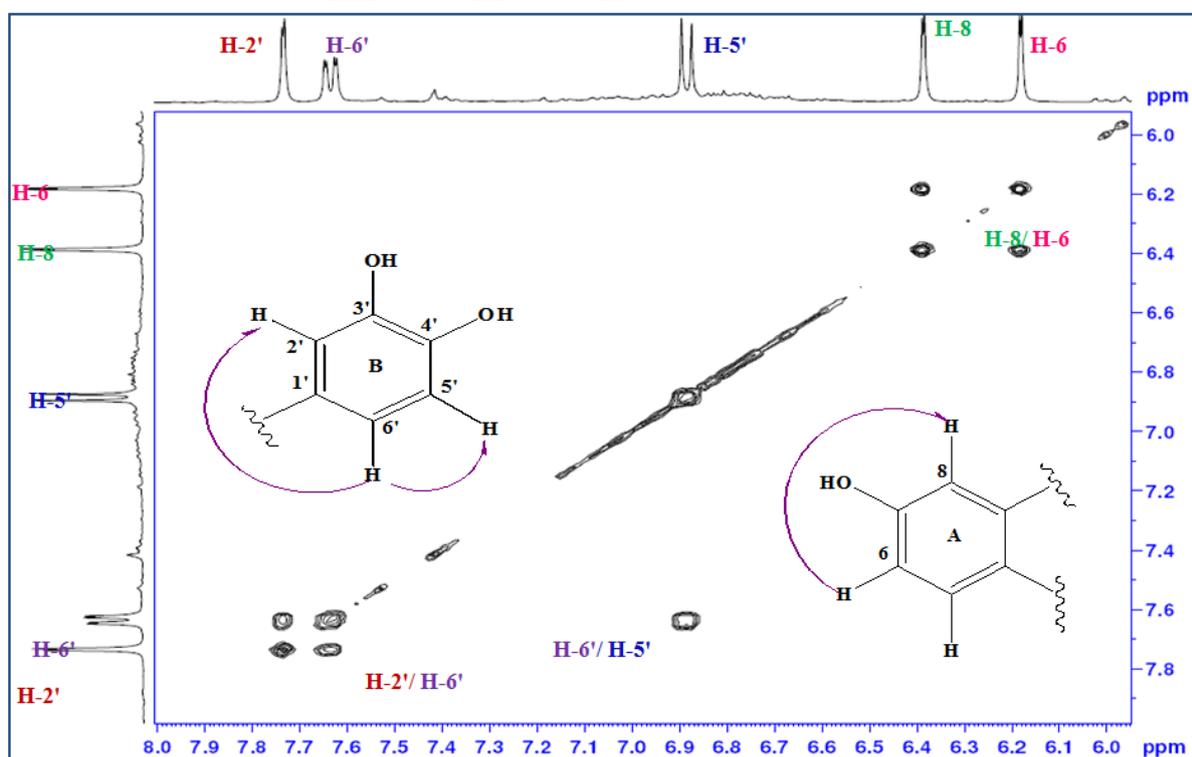


Figure 38 : Spectre COSY du composé **3**.

L'analyse du spectre HMBC (**Figure 39**) montre des corrélations entre :

- Le proton H-6 et les carbones C-5 (162,7 ppm), C-7 (165,9 ppm), C-8 (94,6ppm) et C-10 (104,6ppm).
- Le proton H-8 et les carbones C-6 (99,4 ppm), C-7 (165,9 ppm) et C-9 (158,4 ppm).
- Le proton H-5' et les carbones C-1' (124,3 ppm), C-3' (146,4 ppm) et C-4' (148,9 ppm).
- Le proton H-6' et les carbones C-4' (148,9 ppm) et C-5' (116,4 ppm).
- Le proton H-2' et les carbones C-3' (146,4 ppm), C-4' (148,9 ppm) et C-6' (121,8 ppm).

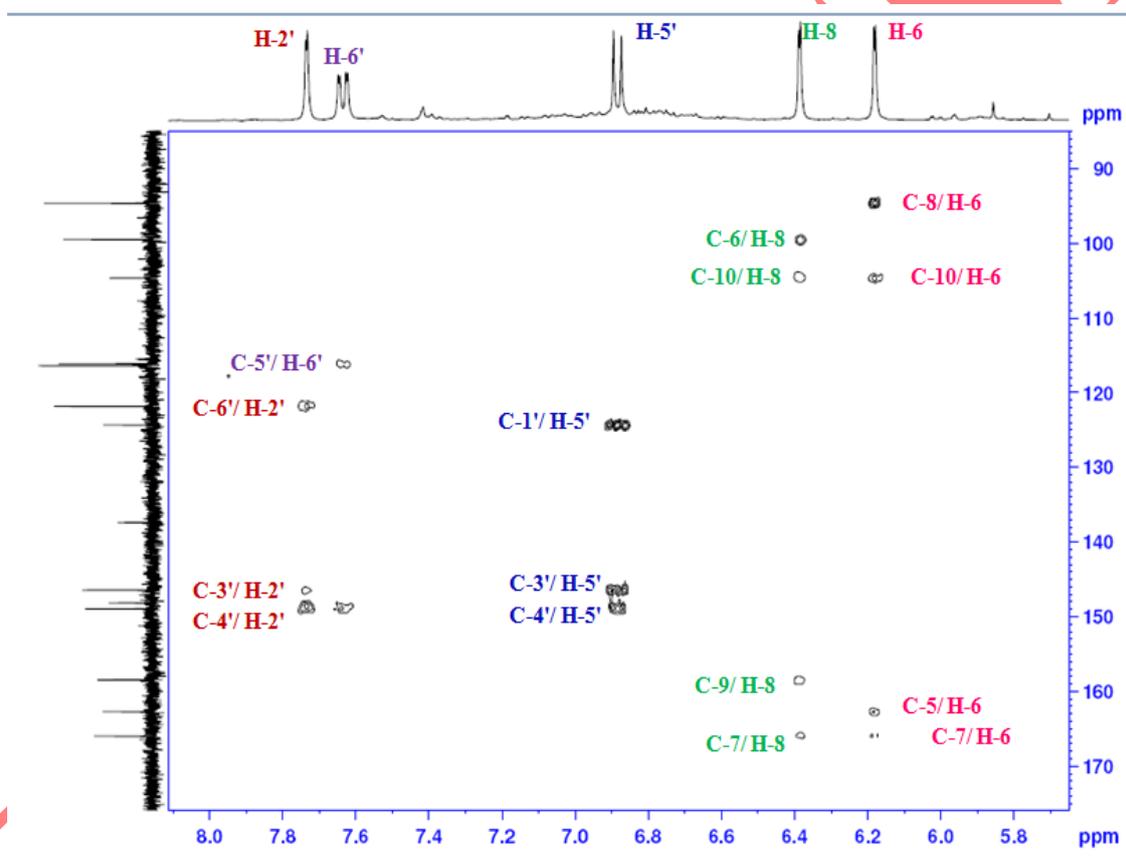
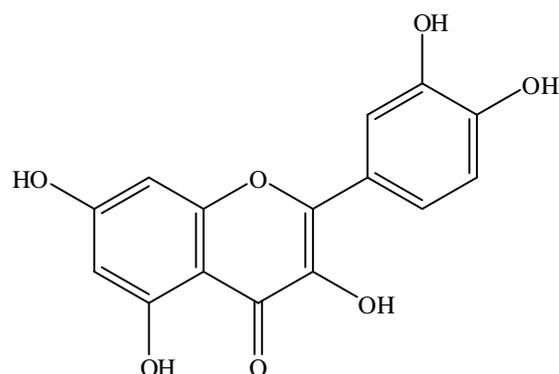


Figure 39 : Spectre HMBC du composé 3.

L'analyse des spectres de RMN¹H, ¹³C, HMQC, COSY et HMBC de (**3**), montre que ce composé est identique point par point à la quercétine. Cette molécule a été isolée antérieurement de plusieurs espèces du genre *Thymus* (**Duke**).



Quercétine (3).

La quercétine est réputée le plus actif des flavonoïdes. Elle a des propriétés biologiques très intéressantes : anti-oxydante (Mc Anlis *et al*, 1999), anti-inflammatoire (Tarayre & Laouressergues, 1977), anti-histaminique et anti-allergique (Thornhill & Kelly, 2000).

Tableau 37 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **3** dans CD_3OD .

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
2	148,1	-
3	137,4	-
4	177,5	-
5	162,7	-
6	99,4	6,12, d (1,9)
7	165,9	-
8	94,6	6,38, d (1,9)
9	158,4	-
10	104,6	-
1'	124,3	-
2'	116,1	7,74, d (1,9)
3'	146,4	-
4'	148,9	-
5'	116,4	6,88, d (8,5)
6'	121,8	7,63, dd (8,5 et 2,0)

III.4. Détermination structurale du composé 4

Le spectre de RMN ^1H de composé **4** (Figure 40) est très proche de celui du composé **1**. Nous retrouvons tous les signaux caractéristiques du composé **3**, les cinq protons aromatiques :

- Les protons H-6 et H-8 (couplage méta : d , $J = 2$ Hz) du cycle A à 6,20 et 6,42 ppm.
- Les protons H-5', H-6' et H-2' du cycle B à 6,90 (d , $J = 8,5$ Hz), 7,36 (dd , $J = 8,5$ et 2,1 Hz) et 7,38 (d , $J = 2,1$ Hz) (Tableau 38).

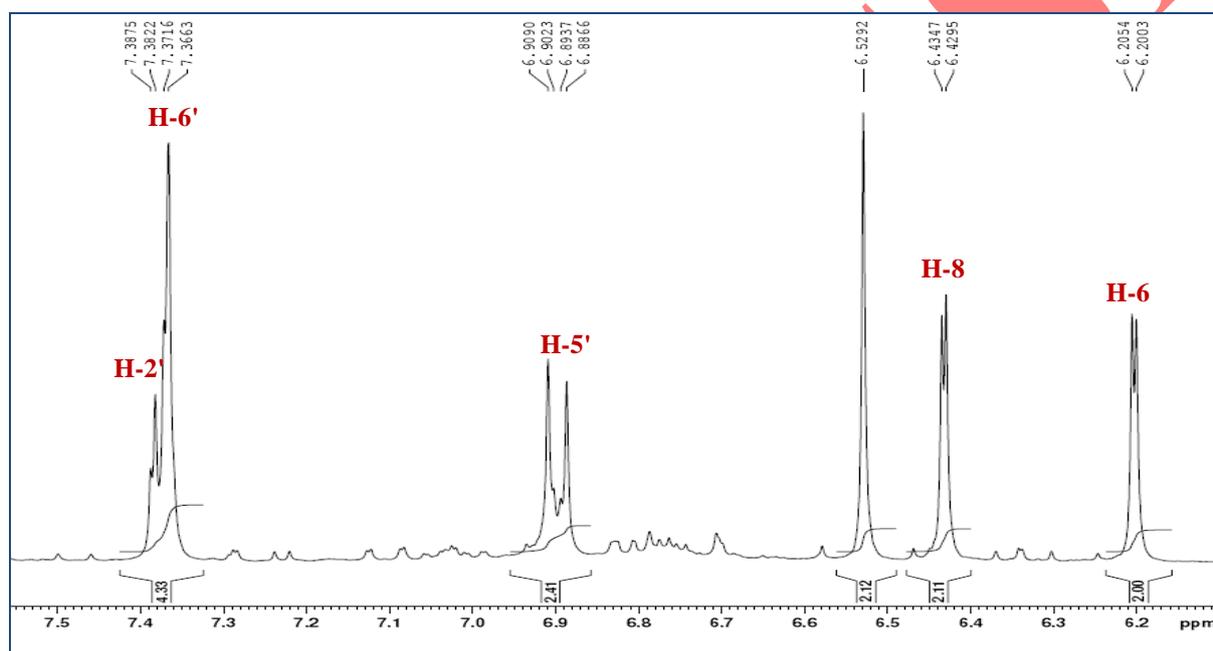


Figure 40 : Spectre de RMN ^1H du composé **4**.

Cependant, l'apparition d'un signal à 6,53 ppm indique cette fois la présence d'un squelette de type flavone. Son carbone est attribué à l'aide du spectre HMQC (Figure 41) à 104,0 ppm.

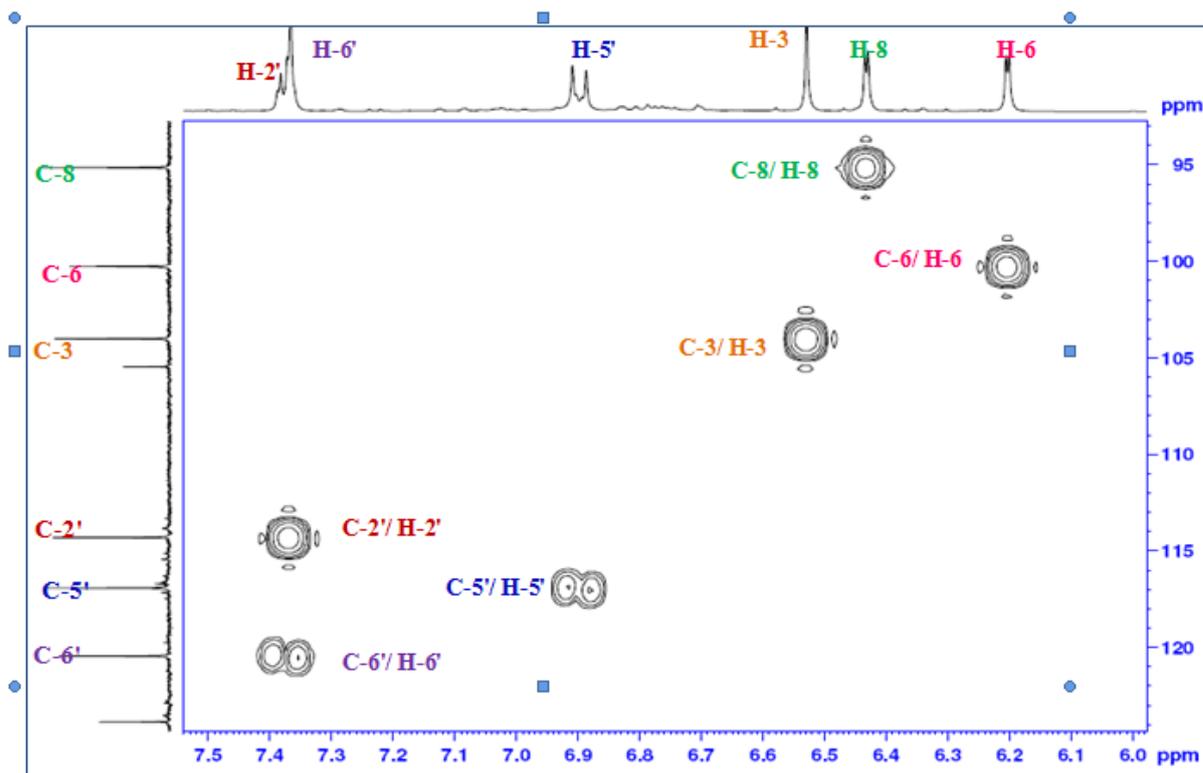


Figure 41 : Spectre HMQC du composé 4.

Ce proton corrèle sur le spectre HMBC (**Figure 42**) en 2J avec un carbone oxygéné résonant à 184,0 ppm, correspondant au carbone C-4 du cycle C et avec un carbone éthylénique oxygéné résonant à 166,2 ppm, correspondant au carbone C-2. Il couple également en 3J avec un carbone aromatique quaternaire qui est le C-1' résonant à 123,8 ppm.

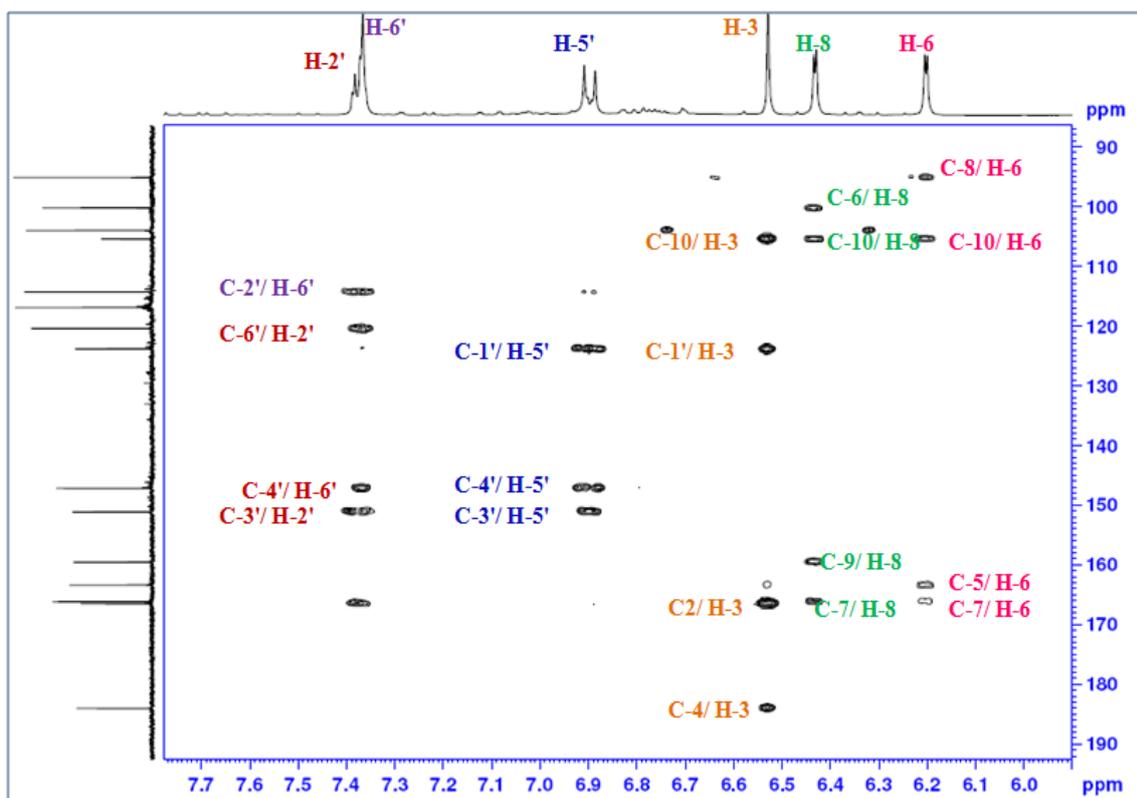
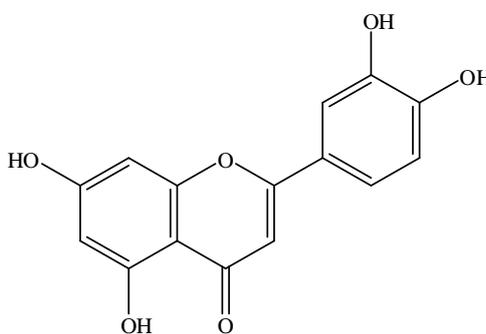


Figure 42 : Spectre HMBC du composé 4.

L'analyse conjointe des spectres HMQC et HMBC du composé 4 et la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'attribuer sur le spectre RMN ^{13}C tous les carbones correspondant à la 5,7,3',4'-tétrahydroxy flavone, connu sous le nom de la lutéoline. Ce composé a été anciennement isolé à partir de plusieurs espèces du genre *Hieracium* (Haag-berrurier & Duquenois, 1962).



Lutéoline (4).

Tableau 38 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (400 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **4** dans CD_3OD .

N°	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)
2	166,2	-
3	104,0	6,53,s
4	184,0	-
5	163,1	-
6	100,1	6,20, d (2,0)
7	166,5	-
8	95,1	6,42, d (2,0)
9	159,6	-
10	105,5	-
1'	123,8	-
2'	114,3	7,38, d (2,1)
3'	151,1	-
4'	147,2	-
5'	116,9	6,90, d (8,5)
6'	120,4	7,36, dd (8,5 et 2,1)

Les composés majoritaires isolés de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE *Tn*), sont l'**acide rosmarinique** et le **rosmarinate de méthyle** : **25,12** et **15,53** %, respectivement (**Tableau 39**).

Tableau 39 : Masses (mg) et pourcentages (%) des **quatre molécules** purifiées à partir des **sous-fractions SF₃₇ et SF₂₀₋₂₁**, issues de la **fraction acétate d'éthyle** de *T. numidicus* (F AE *Tn*).

Molécules purifiées à partir de la F AE <i>Tn</i>	Masse de la sous-fraction à purifier(mg)	Masse de la molécule purifiée (mg)	%
L'acide rosmarinique	SF ₃₇ : 78,22	19,65	25,12
Lutéoline	SF ₂₀₋₂₁ : 160 (80×2)	7,26	4,54
Rosmarinate de méthyle		24,84	15,53
Quercetine		1,03	0,64

Nous notons que malgré de nombreuses tentatives pour obtenir d'autres molécules (résultats non montrés), nous sommes systématiquement retombés sur ces 2 composés qui sont, aussi, largement majoritaires dans l'extrait méthanol antioxydant issu du *T. numidicus* (E Me *Tn*), traité par chromatographie d'exclusion stérique (gel de Séphadex LH 20), suivie de CCM préparative (gel de silice). Cette dernière a permis de séparer l'**acide rosmarinique** (**10,61** %) et le **rosmarinate de méthyle** (**44,02**%) à partir de la fraction F₂₂₋₂₇, issue d'une colonne d'exclusion sur gel (Séphadex LH 20) de la phase organique de l'extrait méthanol de *T. numidicus* (résultats non montrés).

La lutéoline (**4,54** %) et la quercetine (**0,64** %) sont présentes en quantités plus faibles dans la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE *Tn*), comparées aux deux composés majoritaires cités précédemment et trouvés dans cette fraction.

Nous avons voulu vérifier que ces composés majoritaires sont bien responsables, pour une grande part, de l'activité antioxydante des extraits polaires ainsi que de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus*. Pour cela, nous avons déterminé leur capacité à piéger le radical DPPH (cf. Section suivante).

IV. Activité antioxydante des produits isolés

Nous avons testé l'activité antiradicalaire DPPH, des quatre produits purifiés à partir de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn). Les résultats sont consignés dans le **Tableau 40**.

Tableau 40 : Activité antioxydante des **quatre produits** purifiés à partir de la **fraction acétate d'éthyle** de *T. numidicus* (F AE Tn).

Produits purifiés	CI ₅₀ (µg/mL)
L'acide rosmarinique	10,7 ± 0,2
Lutéoline	10,8 ± 1,2
Rosmarinate de méthyle	9,0 ± 0,4
Quercetine	12,0 ± 0,5

Toutes les molécules sont très actives avec une CI₅₀ aux environ de 10 µg/mL. L'**acide rosmarinique** et le **rosmarinate de méthyle**, isolés de la la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* (F AE Tn) avec des pourcentages respectifs de **25,12** et **15,53** %, sont les deux composés majoritaires de cette plante du fait que nous les retrouvons, aussi, dans l'extrait méthanol (E Me Tn), à meilleure activité antioxydante, avec des pourcentages de **10,61** et **44,02%**, respectivement. Ces deux molécules seraient donc, en grande partie, responsables du pouvoir antioxydant de *T. numidicus*.

Lors de la réalisation de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* (E Et Tn), il y'avait une légère perte de l'activité antioxydante, par rapport aux extraits méthanol et aqueux de départ (E Me Tn, E Aq Tn). Le fractionnement de cet extrait hydro-alcoolique avec des solvants de polarité croissante, a permis de concentrer les molécules antioxydantes dans la fraction acétate d'éthyle. Ces molécules sont majoritairement l'**acide rosmarinique** et le **rosmarinate de méthyle**.

V. Détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

L'activité antibactérienne des extraits éthanolique et aqueux du genre *Thymus* a été bien rapportée en littérature (Kandil et al., 1994; Ghasemi-Pirbalouti et al., 2011). Ainsi, nous avons voulu déterminer le potentiel antibactérien de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, vis-à-vis de huit souches bactériennes.

V.1. Effet de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions sur la croissance bactérienne

La mesure des diamètres de zones d'inhibitions (DZI) de la croissance bactérienne, par l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, a été faite après 24h d'incubation à 37°C et en sont comparés à ceux des antibiotiques-contrôles (Ceftazidime 30µg, Cefamandole 30µg, Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg, Gentamycine 500µg (10UI)). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 41**. Ce protocole a été pratiqué en duplicate.

Tableau 41 : DZI de la croissance bactérienne (en mm) de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, comparés à ceux des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
E Et Tn	17	21	17,5	20	17	15	21	18
F EP Tn	19	24	18	20,5	17,5	16,5	21	18
F DM Tn	19	20,5	17,5	21	17,5	16	22,5	18
F AE Tn	17,5	20	18	20,5	17,5	17,5	19,5	19
F Bu Tn	19,5	19,5	17	20	19	13,5	19	19
F Aq Tn	18,5	21	18	20,5	17,5	15,5	19,5	19
CAZ	27	22	32,5	31,5	22	21,5	23,5	18
MA	18,5	29,5	35,5	32,5	22	24	22,5	19,5
AMC	24	24,5	32	28	30	38,5	28	30
GM	0	37	26	0	26,5	24,5	22,5	20,5

(+) : bactérie Gram positif; (-) : bactérie Gram négatif.

CAZ : Ceftazidime 30µg; **MA** : Cefamandole 30µg; **AMC** : Amoxicilline+Acide clavulonique 20/10µg; **GM** : Gentamycine 500µg (10UI).

Nous reprenons dans le **Tableau 42** les différents diamètres de zones d'inhibitions (DZI) de la croissance bactérienne par l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, selon la codification de **Ponce et al. (2003)** et **Moreira et al. (2005)** (cf. Résultats & Discussion, **Chapitre 1.1**, Section **IV.1.1.**).

Tableau 42 : Codification de la sensibilité bactérienne, en terme de DZI de la croissance bactérienne (en mm), vis-à-vis de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions et des antibiotiques-contrôles (lecture après 24h d'incubation à 37°C, n = 2).

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
E Et Tn	++	+++	++	++	++	++	+++	++
F EP Tn	++	+++	++	+++	++	++	+++	++
F DM Tn	++	+++	++	+++	++	++	+++	++
F AE Tn	++	++	++	+++	++	++	++	++
F Bu Tn	++	++	++	++	++	+	++	++
F Aq Tn	++	+++	++	+++	++	++	++	++
CAZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
MA	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
AMC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GM	R	+++	+++	R	+++	+++	+++	+++

(R) : Bactérie résistante; **(+)** : Bactérie sensible; **(++)** : Bactérie très sensible; **(+++)** : Bactérie extrêmement sensible.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, montrent qu'ils sont en majorité très actifs (DZI = 15-19 mm) sur les huit souches bactériennes étudiées.

Une extrême activité antibactérienne (DZI >20 mm) est observée pour les fractions éther de pétrole et dichlorométhane (vis-à-vis de **PA**, **EIEC** et **ETEC**), l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* (vis-à-vis de **PA** et **ETEC**), la fraction aqueuse (vis-à-vis de **PA** et **EIEC**) et la fraction acétate d'éthyle (vis-à-vis de **EIEC**).

La sensibilité des huit souches bactériennes d'étude a été également testée vis-à-vis des antibiotiques-contrôles (Ceftazidime 30µg, Cefamandole 30µg, Amoxicilline+Acide

clavulonique 20/10 μ g, Gentamycine 500 μ g (10UI)). Les souches bactériennes **SA** et **EIEC** sont résistantes à la Gentamycine 500 μ g (10UI).

L'extrême activité antibactérienne de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que les fractions éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et aqueuse, en terme de DZI, vis-à-vis de certaines souches bactériennes sus-citées, est au moins équivalente à celle des antibiotiques-contrôles. L'activité antibactérienne des fractions éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et aqueuse, est meilleure que celle de la Gentamycine 500 μ g (10UI) (GM), vis-à-vis de la souche bactérienne **EIEC**.

Ainsi, en terme de DZI, la meilleure activité antibactérienne est trouvée pour les fractions éther de pétrole et dichlorométhane de *T. numidicus*. Cette activité est beaucoup plus meilleure que la Gentamycine 500 μ g (10UI) (GM), vis-à-vis de la souche bactérienne **EIEC**.

V.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

Les tests de détermination des CMI et CMB (en mg/mL) de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions, ont été faits pour ceux donnant des DZI > 8,5 mm, lors de l'évaluation de la sensibilité des huit souches bactériennes en milieu gélosé. Les résultats sont consignés dans **Tableau 43**.

A l'issue des résultats des tests de concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) vis-à-vis des huit souches bactériennes d'étude, les fractions éther de pétrole et dichlorométhane de *T. numidicus* possèdent la meilleure activité antibactérienne, suivies des fractions butanol, acétate d'éthyle et aqueuse : **F EP Tn \approx F DM Tn > F Bu Tn > F AE Tn > F Aq Tn**.

Le degré de vulnérabilité des souches bactériennes, par ordre décroissant, vis-à-vis de la fraction éther de pétrole est comme suit : **EPEC = EF > SA = PA = EAEC = EIEC = EHEC = ETEC**, alors que pour la fraction dichlorométhane il est ainsi : **ETEC = EF > EPEC > SA = PA = EAEC = EIEC > EHEC**.

Tableau 43 : CMI et CMB de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions (mg/mL).

	E Et <i>Tn</i>		F EP <i>Tn</i>		F DM <i>Tn</i>		F AE <i>Tn</i>		F Bu <i>Tn</i>		F Aq <i>Tn</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
SA	10	> 10	2,5	> 2,5	2,5	5	10	> 10	10	> 10	10	> 10
PA	10	> 10	2,5	> 2,5	2,5	5	10	> 10	10	> 10	10	> 10
EAEC	10	> 10	2,5	> 2,5	2,5	5	10	> 10	10	> 10	10	> 10
EIEC	10	> 10	2,5	> 2,5	2,5	5	10	> 10	2,5	1,25	10	> 10
EHEC	10	> 10	2,5	> 2,5	5	10	10	> 10	10	> 10	10	> 10
EPEC	10	> 10	0,625	1,25	1,25	2,5	2,5	5	1,25	5	5	10
ETEC	10	> 10	2,5	> 2,5	0,625	1,25	2,5	5	10	> 10	10	> 10
EF	10	> 10	0,625	1,25	0,625	1,25	10	> 10	2,5	5	2,5	5

V.3. Pouvoir antibactérien de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

Une fois que les CMI et CMB sont déterminées pour l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, le rapport CMB/CMI a été calculé.

Dans notre étude, ce rapport est indéterminé pour les échantillons d'étude avec des CMB supérieures à la concentration initiale de la solution mère, qui est de 10 mg/mL à l'exception de la fraction éther de pétrole (F EP *Tn*) testée à partir d'une concentration de 2,5 mg/mL. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 44**.

Tableau 44 : Détermination du rapport CMB/CMI de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions.

	SA (+)	PA (-)	EAEC (-)	EIEC (-)	EHEC (-)	EPEC (-)	ETEC (-)	EF (+)
E Et <i>Tn</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F EP <i>Tn</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	2
F DM <i>Tn</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
F AE <i>Tn</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND
F Bu <i>Tn</i>	ND	ND	ND	0,5	ND	4	ND	2
F Aq <i>Tn</i>	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	2

(ND) : Non Déterminé (CMB >10 mg/mL, CMB >2,5 mg/mL pour F EP *Tn*).

Selon **Berche et al. (1991)**, nos résultats montrent que les rapports CMB/CMI calculés, sont inférieurs ou égaux à 4, prouvant, ainsi, l'effet bactéricide de certaines fractions de *T. numidicus* étudiées.

La meilleure fraction de *T. numidicus* à effet bactéricide est celle de dichlorométhane (**F DM Tn**), du fait qu'elle possède un rapport CMB/CMI = 2 pour les 8 souches bactériennes étudiées. En deuxième position, la fraction butanol montre un pouvoir bactéricide vis-à-vis de 3 souches bactériennes, à savoir : **EIEC**, **EPEC** et **EF** (CMB/CMI = 0,5, 4 et 2, respectivement). Les fractions éther de pétrole, acétate d'éthyle et aqueuse, sont bactéricides (CMB/CMI = 2) vis-à-vis de deux souches bactériennes, chacune. L'effet bactéricide de la fraction acétate d'éthyle est dirigé contre les souches bactériennes **EPEC** et **ETEC**, alors que celui des fractions éther de pétrole et aqueuse est dirigé contre les bactéries **EPEC** et **EF**.

Ainsi, les fractions issues de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus*, sont bactéricides vis-à-vis de, au moins, deux souches bactériennes. La fraction dichlorométhane (**F DM Tn**) possède le meilleur effet bactéricide vis-à-vis de tous les pathogènes testés.

VI. Détermination des activités cytotoxique et antivirale de l'extrait hydro-alcoolique de *T. numidicus* et de ses différentes fractions

L'activité antivirale, vis-à-vis du coxsackievirus B3 (CV-B3), de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, a été étudiée selon les mêmes techniques détaillées dans la première partie de ce travail. Les cellules non-cancéreuses Vero, sont prises comme substrat pour les trois tests antiviraux.

Deux points sont pris en compte avant de réaliser ces trois tests antiviraux. Premièrement, pour chaque fraction de *T. numidicus* il faut, d'abord, faire le test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero et en déterminer la concentration cytotoxique 50% (CC₅₀), qui sera évitée lorsque nous testons cette fraction vis-à-vis du CV-B3, lors des trois tests antiviraux. Deuxièmement, la concentration de la fraction de *T. numidicus* qui sera testée pour l'activité antivirale, est celle donnant un pourcentage de viabilité cellulaire entre 90 et 100 %, lors du test de cytotoxicité vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.

VI.1. Activité cytotoxique

Nous avons étudié l'activité cytotoxique de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero. Les valeurs de CC₅₀ correspondantes (concentration de la fraction de *T. numidicus* donnant 50% de lyse des cellules non-cancéreuses Vero), sont présentées dans le **Tableau 45**.

Tableau 45 : Détermination de la concentration cytotoxique 50 (CC₅₀, µg/mL) de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, vis-à-vis des cellules non-cancéreuses Vero.

	CC ₅₀ (µg/mL)
E Et <i>Tn</i>	4,4
F EP <i>Tn</i>	3,8
F DM <i>Tn</i>	3,0
F AE <i>Tn</i>	3,8
F Bu <i>Tn</i>	21,0
F Aq <i>Tn</i>	19,6

Nos résultats montrent que l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, présentent des concentrations cytotoxiques 50% (CC₅₀) de 3,0 à 21,0 µg/mL (**F DM *Tn*** et **F Bu *Tn***, respectivement).

Selon l'American National Cancer Institute, le seuil de signification pour les extraits bruts est la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) < 30 µg/mL (**Hennebelle et al. 2008**). Par conséquent, l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, sont cytotoxiques pour les cellules non-cancéreuses Vero.

Ainsi, afin de réaliser les trois tests antiviraux sur les cellules Vero, prises comme substrat, il faut éviter ces concentrations cytotoxiques des fractions de *T. numidicus* donnant 50% de leur lyse (CC₅₀). Les concentrations des fractions de *T. numidicus* qui seront testées pour l'activité antivirale, sont celles donnant un pourcentage de viabilité cellulaire entre 90 et 100 %.

VI.2. Activité antivirale

Les résultats des trois tests antiviraux réalisés contre le coxsackievirus B3, pour l'extrait hydro-éthanolique ainsi que les quatre fractions de *T. numidicus* (F DM *Tn*, F AE *Tn*, F Bu *Tn* et F Aq *Tn*), sont présentés dans le **Tableau 46**. La fraction éther de pétrole (F EP *Tn*) n'a pas été étudiée, vu son épuisement lors des expérimentations précédentes.

Tableau 46 : Résultats des trois tests antiviraux, réalisés contre le coxsackievirus B3, de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions.

<i>T. numidicus</i>	[(E+V)+C] (µg/mL)	[(C+E)+V] (µg/mL)	[(C+V)+E] (µg/mL)
E Et <i>Tn</i>	Négatif	Négatif	Négatif
F DM <i>Tn</i>	Négatif	Négatif	Négatif
F AE <i>Tn</i>	Négatif	Négatif	Négatif
F Bu <i>Tn</i>	Négatif	Négatif	Négatif
F Aq <i>Tn</i>	1.10⁻⁵	0,001	0,001

Négatif : pas d'Effet CytoPathogène (pas d'ECP); [(E+V)+C]: effet de l'échantillon d'étude sur le virus; [(C+E)+V]: effet de l'échantillon d'étude sur les cellules Vero; [(C+V)+E] : effet de l'échantillon d'étude sur le cycle viral après adsorption.

Les résultats de notre étude montrent que la fraction aqueuse de *T. numidicus* (F Aq Tn), est la seule qui présente une activité antivirale vis-à-vis du coxsackievirus B3 et ce sur les trois niveaux d'inhibition. L'extrait hydro-éthanolique ainsi que les trois fractions restantes de *T. numidicus* sont inactifs dans ces trois tests antiviraux.

Dans le premier test antiviral codé [(E+V)+C], il s'agit de mettre en contact les différentes concentrations des échantillons d'étude, avec les suspensions virales, durant 1h30min à 37°C et 5% CO₂. Au terme de cette incubation, ces mélanges ont été ajoutés aux cellules Vero puis réincubés pendant 5 à 7 jours (37°C et 5% CO₂). Si aucun ECP viral n'a été observé au terme de cette incubation, nous pouvons conclure que le virus a été déjà inhibé par l'échantillon d'étude, d'où la mise en évidence de l'activité antivirale de ce dernier. Suite à ce test, nous avons remarqué que la fraction aqueuse de *T. numidicus* (F Aq Tn), était la seule à être active vis-à-vis du CV-B3, avec une concentration de **1.10⁻⁵ µg/mL (Pas d'ECP de la dilution 10⁻⁹ à 10⁻³)**.

Pour le deuxième test antiviral codé [(C+E)+V], nous avons incubé les cellules Vero avec les concentrations non cytotoxiques des différents échantillons d'étude, pendant 1h30min à 37°C et 5% CO₂, puis nous avons ajouté la suspension virale. Ce type de contact nous a permis de mettre en évidence la compétition entre les échantillons d'étude et le virus, sur les récepteurs cellulaires. Si un échantillon d'étude arrive à s'attacher aux récepteurs cellulaires, il peut empêcher l'adsorption et, donc, la pénétration du virus au niveau des cellules. Dans ce cas, l'ECP viral sera absent et nous pourrions mettre en évidence l'activité antivirale de l'échantillon d'étude en question. Parmi les échantillons d'étude testés, seule la fraction aqueuse de *T. numidicus* (F Aq Tn), était capable d'interagir avec les récepteurs cellulaires spécifiques au CV-B3, avec une très faible concentration : **0,001 µg/mL (Pas d'ECP de la dilution 10⁻⁷ à 10⁻³)**.

Dans le troisième test antiviral codé [(C+V)+E], nous avons incubé les cellules Vero en présence des suspensions virales, pendant 1h30min à 37°C et 5% CO₂, puis nous avons ajouté les échantillons d'étude. Dans ce type de contact, le virus a suffisamment de temps pour s'adsorber et pénétrer dans la cellule. Dans ce cas, l'absence de l'ECP viral, nous a permis de juger que l'échantillon d'étude agit pour empêcher le bon déroulement de la réplication virale, au sein de la cellule. D'où, la mise en évidence de l'activité antivirale de la fraction aqueuse de *T. numidicus* (F Aq Tn), avec une concentration de **0,001 µg/mL (Pas d'ECP de la dilution 10⁻⁷ à 10⁻³)**.

Ainsi, dans ce travail nous avons mis en évidence l'activité antivirale de la fraction aqueuse de *T. numidicus* (F Aq *Tn*), qui a montré une activité intéressante contre le coxsackievirus B3 (CV-B3) et ceci pour les trois phases testées : l'adsorption du virus à la membrane cellulaire, la réplication virale au sein de la cellule et l'inhibition du virus après contact direct avec celui-ci.

ZEGHIB ASSIA

VII. Bilan des résultats & discussion

Nous avons démontré, dans la première partie de notre travail, le potentiel antioxydant de *T. numidicus* via ses extraits les plus polaires (méthanol et aqueux). Ils sont les plus antioxydants de tous les extraits étudiés de *Thymus*.

Par exploration phytochimique de l'extrait méthanol de *T. numidicus*, deux acides phénoliques en sont purifiés : l'**acide rosmarinique (10,61 %)** et le **rosmarinate de méthyle (44,02%)**. Dans le but de concentrer la majorité des molécules responsables de l'activité antioxydante de l'espèce endémique *T. numidicus*, un extrait hydro-alcoolique a été réalisé pour cette plante.

Vu la légère diminution du potentiel antioxydant de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus*, par rapport à celui des extraits méthanol et aqueux de cette plante, son fractionnement par des solvants de polarité croissante, a permis de concentrer les principaux composés responsables de l'activité antioxydante dans la fraction acétate d'éthyle.

Dans le test d'inhibition du radical DPPH et par comparaison aux extraits antioxydants de référence, cette fraction se situe à un niveau compris entre le picnogénol et le marc de raisin. Quant aux molécules antioxydantes de référence, cette fraction est plus active que la vitamine E et 2 fois moins active que la quercétine. Ces résultats expliquent bien le taux élevé des composés phénoliques totaux de cette fraction qui est de 35 %, compris entre celui du picnogénol (30,7 %) et du marc de raisin (39,6 %).

Une flavone (la lutéoline, 4,54 %), un flavanol (la quercétine, 0,64 %) et deux acides phénoliques (l'**acide rosmarinique, 25,12 %** et le **rosmarinate de méthyle, 15,53 %**), ont été isolés de la fraction acétate d'éthyle. Toutes ces molécules sont très actives, avec une CI_{50} aux environ de 10 $\mu\text{g/mL}$. Comme dans l'extrait méthanol de *T. numidicus*, l'**acide rosmarinique** et le **rosmarinate de méthyle**, sont les deux composés majoritaires de la fraction acétate d'éthyle.

Ainsi, le potentiel antioxydant de *T. numidicus* pourrait être, en grande partie, lié à ces deux acides phénoliques, trouvés très antioxydants dans le test d'inhibition du radical DPPH et obtenus, avec de bons rendements, par deux protocoles de purification différents.

Nos résultats sont en accord avec la littérature. En effet, **Lamaison et al. (1991)** rapportent que l'**acide rosmarinique** [(R)-a-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2E-

propenyl]oxy]-3,4-dihydroxy-benzenepropanoic acid] est un composé polyphénolique présent en grande quantité dans plusieurs plantes de la famille des Lamiaceae.

Selon **Zheng & Wang (2001)** et **Shan et al. (2005)**, l'**acide rosmarinique** est le composé phénolique le plus abondant, identifié dans les extraits éthanol et méthanol d'espèces de *Thymus* ainsi que d'autres plantes appartenant la famille des Lamiaceae. Ce qui explique la présence de ce composé en bon pourcentage (**10,61 %**) dans l'extrait méthanol de *T. numidicus*.

Selon **Shan et al. (2005)** et **Matkowski (2008)**, l'**acide rosmarinique** possède deux groupes ortho-dihydroxy qui est une caractéristique structurale importante pour l'activité antioxydante élevée. Plusieurs auteurs (**Tepe et al., 2007; Blazekovic' et al., 2010**) ont rapporté la puissante capacité de l'**acide rosmarinique** pour le piégeage des radicaux libres de DPPH ainsi que ses propriétés réductrices élevées. Ainsi, nous pouvons déduire que l'activité antioxydante élevée de l'extrait méthanol et de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus* pourrait résulter, au moins en partie, de leur contenu en acide rosmarinique. Une forte corrélation entre le taux de l'acide rosmarinique et les activités antioxydantes, ont été rapporté pour le *T. vulgaris* (**Dorman et al., 2003; Cosio et al., 2006**) et pour d'autres espèces appartenant à la famille des Lamiaceae (**Dorman et al., 2003; Cosio et al., 2006; Tepe et al., 2007**).

Mesaik et al. (2012) rapportent que le **rosmarinate de méthyle** et le rosmarinate d'éthyle, manifestent l'inhibition de la production intra/extracellulaire de ROS, le mode d'action exact nécessite d'être étudié.

En plus du potentiel antioxydant observé pour la fraction acétate d'éthyle, les potentiels antibactérien (effet bactéricide vis-à-vis des huit souches bactériennes d'étude) et antiviral (vis-à-vis de la souche de coxsackievirus B3), ont été observés pour les fractions dichlorométhane et aqueuse, respectivement.

L'effet cytotoxique de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* ainsi que ses différentes fractions, vis-à-vis de la lignée cellulaire non-cancéreuse Vero, a été mis en

évidence via le test de cytotoxicité, réalisé préalablement au test antiviral. Il serait intéressant d'étudier leurs effets sur des lignées cancéreuses.

Nos résultats sont en accord avec la littérature (Sunar et al., 2009) rapportant les activités antibactériennes et antivirales au genre *Thymus*. Cervenka et al. (2006) rapportent que l'activité antibactérienne de *Thymus vulgaris* L est concentrée dans l'extrait chloroformique. Ce qui concorde avec nos résultats montrant que cette activité est trouvée essentiellement dans la fraction dichlorométhane, qui est apolaire comme l'extrait chloroformique.

En conclusion, cette deuxième partie de notre travail sur l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus* (E Et Tn) ainsi que ses différentes fractions, a permis de montrer le potentiel de cette plante tant en terme d'activités antioxydante, antibactérienne, antivirale que cytotoxique. En effet, les différentes fractions issues de l'extrait hydro-éthanolique de *T. numidicus*, présentent des vertus biologiques très intéressantes.

Chapitre 3

**Recherche de molécules antiprolifératives dans les
extraits apolaires de *Thymus numidicus***

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu mettre en évidence le potentiel antiprolifératif des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. numidicus*, sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29. Nous avons, donc, tenté d'isoler les composés responsables de cette activité.

Différentes techniques ont été essayées afin de purifier les molécules actives, à partir de l'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* (**E DM Tn**) présentant un rendement supérieur à celui de l'acétate d'éthyle.

3 composés majoritaires ont été mis en évidence, par la technique de précipitation à froid de molécules de type terpéniques dans le méthanol (cf. Matériels & Méthodes, Section VII.).

I. Etude de la nature des 3 composés majoritaires détectés par test de précipitation à froid de molécules de type terpéniques

A partir de 50 mg d'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* (**E DM Tn**) déchlorophyllé, nous avons obtenu, par test de précipitation à froid de molécules de type terpéniques, 1,50 mg de précipité froid (**Pf**) contenant 3 produits majoritaires (confirmation par RMN) (cf. **Figure 18**). L'analyse sur plaque CCM analytique de gel de silice, montre que ce précipité froid (**Pf**) se présente en monotache au même niveau que l'acide ursolique (1mg/mL dans l'éthanol) pris comme témoin (**Figure 43**).

Le test consiste à réaliser, dans un premier temps, une solution de 50 mg/mL d'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* (**E DM Tn**) déchlorophyllé avec du méthanol froid. Après précipitation à froid pendant 24h, le surnageant est enlevé pour ajouter du méthanol froid (4 mL) au précipité formé et laisser encore précipiter à froid. Ce procédé est répété jusqu'à ce que le surnageant devient incolore et le précipité devient bien blanc (propre).

Cette technique étant généralement utilisée au laboratoire pour extraire des composés terpéniques et, plus particulièrement, l'acide ursolique utilisé comme standard dans notre étude.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que ces 3 produits contenus dans le précipité froid (**Pf**), appartiennent bien à cette famille de composés (confirmation par RMN) dont fait partie l'acide ursolique, mais nous n'avons pas réussi à aller plus loin dans la purification.

L'acide ursolique étant connu pour ses propriétés antiprolifératives sur ce type cellulaire, nous pouvons, malgré tout, supposer que ces 3 produits doivent potentiellement présenter ce type d'activité.

Tout un travail reste, toutefois, à faire pour isoler dans cet extrait les molécules responsables de cette activité antiproliférative.

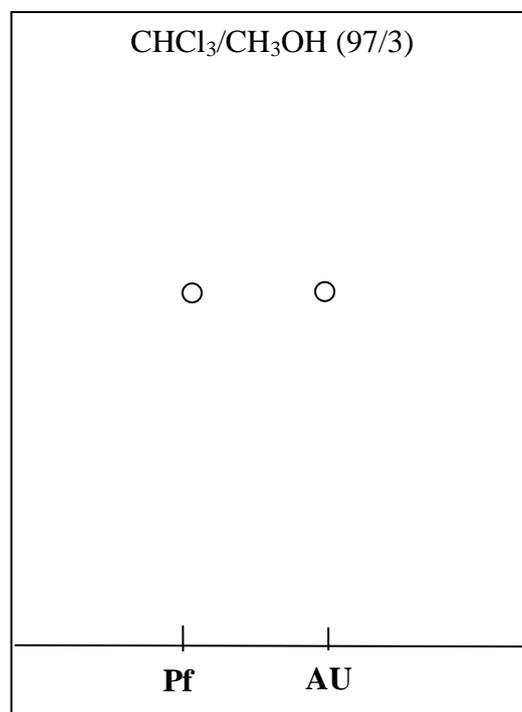


Figure 43 : Schéma de la présentation sur plaque CCM analytique de gel de silice du précipité à froid (Pf) au même niveau que l'acide ursolique (AU) (témoin antiprolifératif), révélation avec le réactif à la vanilline sulfurique.

II. Bilan

Le potentiel antiprolifératif, sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle de *T. numidicus*, a été mis en évidence dans la première partie de notre travail. Nous avons, donc, tenté d'isoler les composés responsables de cette activité.

Nous n'avons pas réussi à aller plus loin dans la purification. Néanmoins, par test de précipitation à froid de molécules de type terpéniques, un précipité froid similaire à l'acide ursolique et contenant 3 produits majoritaires (confirmation par RMN), a été obtenu à partir de l'extrait dichlorométhane de *T. numidicus* déchlorophylé. Une exploration phytochimique plus poussée doit, toutefois, se poursuivre pour purifier les molécules responsables de cette activité antiproliférative.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, quatre plantes du genre *Thymus* ont fait l'objet de notre étude des activités biologiques : *Thymus numidicus* (Poiret), *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf. et *Thymus hirtus* Willd., et ce aussi bien pour les extraits que les huiles essentielles. L'étude phytochimique s'est orientée par bioguidage, vers l'espèce aux meilleurs potentiels biologiques.

L'investigation biologique (activités antioxydante et antiproliférative) s'est portée sur les extraits éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol et aqueux des espèces endémiques *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. ciliatus*. L'espèce *T. vulgaris* a été prise comme référence du genre pour comparaison.

Les résultats observés lors du test d'inhibition du radical DPPH, ont montré que les propriétés antioxydantes des plantes de *Thymus* (endémiques et de référence), se trouvaient essentiellement dans les extraits les plus polaires (méthanol et aqueux) qui possèdent les rendements les plus élevés, à l'exception de l'extrait méthanol de *T. ciliatus*.

En terme de CI_{50} , les extraits aqueux sont légèrement plus actifs que les extraits méthanol, excepté l'espèce *T. numidicus*. De plus, les rendements de tous les extraits aqueux sont légèrement plus élevés que ceux des extraits méthanol.

L'espèce endémique à meilleur potentiel antioxydant est *T. numidicus*, via les extraits méthanol et aqueux. Ces derniers ne sont que 2 et 2,7 fois moins actifs que les extraits de référence (le picnogénol et le marc de raisin, respectivement) et 2 et 4 fois moins actifs que les molécules de référence (la vitamine E et la quercétine, respectivement). L'activité antioxydante de *T. numidicus* est presque deux fois supérieure pour les mêmes types d'extraits des trois autres espèces de *Thymus*.

Le taux élevé des composés phénoliques totaux (16,7 g/100g équiv. Pyrogallol) des extraits méthanol et aqueux de *T. numidicus*, confirme bien l'activité antioxydante de cette plante. De plus, une bonne corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de *Thymus* ($R^2 = 0,8405$) est bien démontrée dans notre étude.

Ce résultat est **très intéressant** pour l'utilisation des **extraits polaires** de la plante *T. numidicus*, comme **protecteurs contre le stress oxydatif**, tel que l'irradiation UV.

L'**activité antiproliférative** vis-à-vis de la **lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29**, s'est manifestée pour les **extraits apolaires** de *Thymus*, excepté ceux de *T. guyonii* ainsi que l'extrait acétate d'éthyle de *T. ciliatus*.

L'espèce endémique *T. numidicus* manifeste le **meilleur effet antiprolifératif**, via les **extraits dichlorométhane** et **acétate d'éthyle**. Cet effet est presque identique à celui de l'espèce de référence *T. vulgaris* pour les mêmes types d'extraits.

Selon les normes (seuil de signification pour les extraits bruts : $CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, Hennebelle et al., 2008) posés par l'ANCI (American National Cancer Institute), les **extraits dichlorométhane** et **acétate d'éthyle** de l'espèce endémique *T. numidicus*, peuvent servir de **source potentielle de composés anti-cancéreux**. Par ailleurs, ces **deux extraits** ne sont que **quatre fois moins actifs** que l'**acide ursolique**, molécule naturelle de référence pour ce type d'activité ($CI_{50} = 6,85 \mu\text{g/mL}$).

La synthèse des résultats des activités **antioxydante** et **antiproliférative** d'**extraits** de *Thymus*, montre que le *T. numidicus* est l'espèce qui présente le **meilleur potentiel biologique** : les extraits les **plus polaires** sont les **plus antioxydants** et les **extraits les moins polaires** sont les **plus antiprolifératifs**. Ainsi, ce **bioguidage** oriente vers l'étude **phytochimique** de cette **espèce endémique**, afin d'**en purifier** les **molécules actives**.

Deux acides phénoliques, l'**acide rosmarinique (10,61 %)** et le **rosmarinate de méthyle (44,02%)** ont été purifiés de l'**extrait méthanol** de *T. numidicus*. Dans le but de **concentrer la majorité des molécules** responsables de l'**activité antioxydante** de *T. numidicus*, un **extrait hydro-alcoolique** a été réalisé pour cette plante.

Vu la **légère diminution** du **potentiel antioxydant** de l'**extrait hydro-éthanolique** de *T. numidicus*, par rapport à celui des **extraits méthanol** et **aqueux** de cette plante, son **fractionnement** par des solvants de **polarité croissante**, a permis de **concentrer les principaux composés** responsables de l'**activité antioxydante** dans la **fraction acétate d'éthyle**.

En terme de CI_{50} , **cette fraction** se situe à un **niveau compris** entre le **picnogénol** et le **marc de raisin** (extraits antioxydants de référence), et est **plus active** que la **vitamine E** et

2 fois moins active que la **quercétine** (molécules antioxydantes de référence). Cette **meilleure activité antioxydante** de la **fraction acétate d'éthyle**, est confirmée par sa **teneur élevée en composés phénoliques totaux** (35 g/100g équiv. Pyrogallol).

Une flavone (la lutéoline, 4,54 %), un flavanol (la quercétine, 0,64 %) et deux **acides phénoliques** (l'**acide rosmarinique, 25,12 %** et le **rosmarinate de méthyle, 15,53 %**), ont été isolés de la **fraction acétate d'éthyle**. Toutes ces **molécules** sont **très actives**, avec une CI_{50} aux environ de 10 $\mu\text{g/mL}$. Comme dans l'extrait méthanol de *T. numidicus*, l'**acide rosmarinique** et le **rosmarinate de méthyle**, sont les **deux composés majoritaires** de la **fraction acétate d'éthyle**.

Ainsi, le **potentiel antioxydant** de *T. numidicus* pourrait être, en grande partie, lié à **ces deux acides phénoliques**, trouvés **très antioxydants** dans le test d'inhibition du radical DPPH et obtenus, avec de **bons rendements**, par deux protocoles de purification différents.

L'investigation des **activités antibactérienne** et **antivirale** de l'**extrait hydro-éthanolique** de *T. numidicus* ainsi que **ses différentes fractions**, met en lumière d'autres potentiels biologiques pour cette plante. Ainsi, la **fraction dichlorométhane** est la **plus bactéricide** (vis-à-vis de toutes les souches bactériennes d'étude) alors que la **fraction aqueuse** est la **seule** à être **antivirale** (vis-à-vis de la souche de coxsackievirus B3). L'**effet cytotoxique** (test réalisé préalablement aux tests antiviraux) de l'**extrait hydro-éthanolique** de *T. numidicus* ainsi que **ses différentes fractions**, vis-à-vis de la lignée cellulaire non-cancéreuse Vero, a été **mis en évidence**. Il serait intéressant d'étudier leurs effets sur des lignées cancéreuses.

Le **potentiel antiprolifératif**, sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT-29, des **extraits dichlorométhane** et **acétate d'éthyle** de *T. numidicus*, a été **mis en évidence** dans la présente étude.

L'**investigation phytochimique** visant la **purification** de **molécules antiprolifératives**, à partir de l'**extrait dichlorométhane** de *T. numidicus*, a conduit à l'obtention d'un **précipité froid** similaire à l'acide ursolique et contenant **3 produits majoritaires**. Une exploration phytochimique plus poussée doit, toutefois, se poursuivre pour purifier les molécules responsables de cette activité antiproliférative.

En conclusion, l'investigation des **extraits** et **fractions** de *T. numidicus*, a permis de montrer le **potentiel** de cette plante tant en terme d'**activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne** qu'**antivirale**.

La valorisation des ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles. Ainsi, l'analyse GC-MS des huiles essentielles de *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus*, a permis d'identifier 11 composés majoritaires : l' **α -pinène**, le **camphène**, l'**o-cymène**, l'**eucalyptol (1,8-Cinéole)**, le **δ -terpinène**, le **2-bornanone**, le **thymol**, le **carvacrol**, le **linalool**, le **γ -terpinène** et le **thymol méthyl éther**.

Les composants majoritaires avec les pourcentages les plus élevés sont le thymol (23,92 %) pour *T. numidicus*, le **carvacrol (55,60%)** pour *T. guyonii* et l'**eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %)** pour *T. hirtus*.

27 composés, représentant 99,89 % de l'huile essentielle des parties aériennes sèches de *T. guyonii*, ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de **o-cymène (9,69 %)**, **δ -terpinène (5,73 %)**, **thymol (21,18 %)** et **carvacrol (55,60 %)**.

L'huile essentielle des parties aériennes fraîches de *T. hirtus*, est majoritairement composée de **α -pinène (9,46 %)**, **camphène (5,38 %)**, **eucalyptol (1,8-cinéole) (34,62 %)** et **2-bornanone (18,55 %)**, parmi 49 composés identifiés qui représentent 100 % cette essence.

34 composants, représentant 98,14 % des parties aériennes fraîches de l'huile essentielle de *T. numidicus*, ont été détectés avec comme composants majeurs le **thymol (23,92%)**, le **linalool (17,20%)**, l'**o-cymène (11,41%)**, le **γ -terpinène (10,84%)**, le **thymol méthyl éther (6,73%)** et le **carvacrol (6,02%)** (Zeghib A et al., 2013).

L'**investigation biologique (activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale)**, des **huiles essentielles des espèces endémiques *T. numidicus*, *T. guyonii* et *T. hirtus***, montre le **potentiel bactéricide** manifesté pour *T. guyonii*, vis-à-vis des huit souches bactériennes d'étude.

La **meilleure activité bactéricide** de l'huile essentielle de *T. guyonii*, pourrait être due à l'**effet synergique** de ses **composés majeurs**, surtout le **thymol** et le **carvacrol** rapportés être de bons antibactériens (Baydar et al., 2004; Nejad Ebrahimi et al., 2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achour, S., Khelifi, E., Attia, Y., Ferjani, E., Hellal, A.H. (2012). Concentration of Antioxidant Polyphenols from *Thymus capitatus* extracts by Membrane Process Technology. *Journal of Food Science*, **77 (6)** : 703-709.

Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois, 4th Ed.

AFNOR. (Normes) (1992). *Recueil des normes françaises, Huiles essentielles*, Paris.

Akhlaghi, H. (2008). The essential oils from flowers, stems and leaves of *Ferulago angulata* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, **44** : 396-397.

Aliaga, C., Lissi, A. E. (2004). *Canadian Journal of Chemistry*, **82** : 1668-1673.

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cells lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48** : 589-601.

Almeida, V., Goncalves, V., Galego, L., Miguel, G., Costa, M. (2006). From *Acta Horticulturae* (2006), 723 (Proceedings of the 1st International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation, 2006), 239-242.

Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** : 149-157.

Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, **6** : 342-347.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **(14)** : 141-148.

Areias, F.M., Rego, A.C., Oliveire, C.R., Seabra, R.M. (2001). Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe²⁺-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochemical Pharmacology*, **62** : 111-118.

Arora, D.S., Kaur, j. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **12** : 257-62.

Arraiza, M.P., Andres, M.P., Arrabal, C., Lopez, J.V. (2009). Seasonal variation of essential oil yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris* L.) grown in Castilla – La Mancha (Central Spain). *Journal of Essential Oil Research*, **21(4)** : 360-362.

Asfaw, N., Storesund, H.J., Skattebol, L., Tonnesen, F., Aasen, A.J. (2000). Volatile oil constituents of two *Thymus* species from Ethiopia. *Flavour and Fragrance Journal*, **15(2)** : 123-125.

Askari, F., Sefidkon, F. (2003). Essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **6(3)** : 217-219.

Asllani, U., Toska, V. (2003). Chemical compositions of Albanian thyme oil (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Essential Oil Research*, **15(3)** : 165-167.

Association française de Normalisation. (2000). Huiles essentielles, Tome 1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2-Vol.1 et 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6^{ème} édition. Afnor, Paris.

Astani, A., Reichling, J., Schnitzler P. (2010). Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. *Phytotherapy Research*, **24** : 673-679.

Avci, A.B. (2011). Chemical variation on the essential oil of *Thymus praecox* ssp. *scorpilii* var. *laniger*. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13(4)** : 607-610.

Bader, A., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. (2001). *Thymus richardii* Pers. subsp. *nitidus* (Guss.) Jalas: A new *Thymus* type rich in b-bisabolene. *Journal of Essential Oil Research*, **13(1)** : 8-10.

Barazandeh, M.M., Bagherzadeh, K. (2007). Investigation on the chemical composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak from four different regions of Isfahan province. Edited By : Bazarnova, N.G., Markin, V.I. From *Faslnameh-i Giyahan-i Daruyi*, **6(23)** : 12-19.

Baser, K.H.C., Demici, B., Demici, F., et al. (2000). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta Medica*, **68(10)** : 941-3. **In : Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A. (2008).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, **6** : 342-347.

Baser, K.H.C., Kirimer, N., Tumen, G., Duman, H. (1998) . Composition of the essential oils of *Thymus canaoviridis* Jalas. *Journal of Essential Oil Research*, **10** : 199-200. **In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** : 149 -157.

Baser, K.H.C., Ozek, T., Tumen, G. (1992). Essential oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, two endemic species in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*; **4** : 659-61. **In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A.,**

Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** : 149 -157.

Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., Karadogan, T. (2004). Antimicrobial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **15** : 169-172. **In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011).** Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Behravan, J., Ramezani, M., Nobandegani, E.F., Gharaee M.E. (2011). Antiviral and antimicrobial activity of *Thymus transcaspicus* essential oil. *Pharmacologyonline*, **1** : 1190-1199.

Bekhechi, C., Bekkara, F.A., Abdelouahid, D.E., Tomi, F., Casanova, J. (2007). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **19(6)** : 594-596.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marín, F.R., Ortuño, A., Del Rio, J.A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** : 4505-4515. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Ben Bnina, E., Hammami, S., Daami-Remadi, M., Cheraif, I., Hajjlaoui, H., Ben Jannet, H., Ben Said, M., Mighri, Z. (2009). Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils From the Aerial Parts and Flowers of *Thymus hirtus* W. Growing in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, **21** : 567-572.

Benyahia, S. (2006). *Recherche des métabolites secondaires terpéniques et phénoliques d'espèces d'Eucalyptus Algériens. Détermination structurale et activité biologique.* Thèse de doctorat d'état, Université Mentouri, Constantine.

Bentes, J., Miguel, M.G., Monteiro, I., Costa, M., Figueired, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2009). Antioxidant activities of the essential oils and extracts of Portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian Journal of Food Science*, **21(2)** : 183-195.

Beraoud, L., Bessièrre, J.M., Tantaoui Elaraki, A., (1991). Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine. *Al Birunya, Revue Marocaine de Pharmacognosie*, **7** : 49-69.

Berche, P., Gaillard, J.L., Simonet, M. (1991). Les bactéries des infections humaines. Editeur Flammarion, Médecine et Sciences, 660p. **In : Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Dombia, I., Coulibaly, A. (2012).** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences*, **58** : 4234-4242.

Beuchat, L.R., (1976). Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Al Birunya, Revue Marocaine de Pharmacognosie*, **41** : 899-902.

Beylier–Maurel, MF. (1976). Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista italiana*, **58** : 283-286.

Bilgrami, K.S., Sinha, K.K., Sinha, A.K. (1992). Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian Journal of International Medical Research*, **96** : 171-175.

Blazekovic´, B., Vladimir-Knezevic´, S., Brantner, A., Stefan, M.B. (2010). Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia*. Emeric ex Loisel. ‘Budrovka’: A comparative study with *L. Angustifolia* Mill. *Molecules*, **15** : 5971-5987. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Blazquez, M.A., Manez, S., Zafrapolo, M.C. (1994). Further flavonoïds and other phenolics of *Thymus-webbianus rouy*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **49(9-10)** : 687-688. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and cancer*, **18** : 1-29. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines : Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Bonniere, G., Douin, R. (1992). *Labiataea*, **5**, 396.

Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilár, F., Felinger, A. (2010). *Journal of Chromatography A*, **1217** : 7972-7980. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84.

Borris, R.P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, **51** : 29-38.

Boyle, P., Langman, J.S. (2000). ABC of colorectal cancer: epidemiology. *British Medical Journal*, **321** : 805-808. **In : Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011).** Anti-tumorigenic activity of five culinary And medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91** : 1849-1854.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **28** : 25-30.

Brantner, A.H., Pfeifhofer, H.W., Ercegovac, O., Males, Z., Plazibat, M. (2005). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus bracteosus* vis. ex Benth. Flavour and Fragrance Journal, **20(6)** : 596-600.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, **56** : 317-333. In : **Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. Nutrition and cancer, **49(2)** : 191-199.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales*, (3ème ed.), Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc.

Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Tec & Doc. 4ème Ed Lavoisier, Paris.

Bucar, F., Males, Z., Plazibat, M. (2005). Essential oil of *Thymus bracteosus* Vis. ex Benth., an endemic species of Dinaric Karst. Journal of Essential Oil Research, **17(4)** : 457-458.

Busta, F.F., Foegeding, P.M., (1980). Chemical food preservatives. In S. block. "Disinfection, sterilization and preservation", 656-694. Lea and Fibiger Eds, Philadelphia. USA.

Calliste, C.A., Le Bail, J.C., Trouillas, P., Pouget, C., Habrioux, G., Chulia, A.J., Duroux, J.L. (2001). Chalcones : structural requirements for antioxydant, estrogenic and antiproliferative activities. Anticancer Research, **21 (6)**.

Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P., Duroux, J.L. (2005). Castanea sativa Mill. Leaves as New Sources of Natural Antioxidant: An Electronic Spin Resonance Study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53** : 282-288.

Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P, Simon, A., Duroux J.L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviours of seven plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49** : 3321-3327.

Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. Cancer Research, **47** : 936-942.

Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Durantou, B., Gosse, F., Seiler, N. Raul, F., (2001). Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **298 (1)** : 197-200.

Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Verdar Sucan, O., Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanolic extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, **100** : 553-559. In **Bouزيد**,

W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C., Ayachi, A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. Lebanese Science Journal, **12**(1) : 59-69.

Cervenka, L., Peskova, I., Foltynova, E., Pejchalova, M., Brozkova, I., Vytrasova, J. (2006). Inhibitory Effects of Some Spice and Herb Extracts Against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. Skirrowii*. Current Microbiology, **53** : 435-439.

Cetin, B., Cakmakci, S., Cakmakci, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, **35** : 145-154.

Çetinus, E., Temiz, T., Ergül, M., Altun, A., Çetinus, Ş., Kaya, T. (2013). Thyme essential oil inhibits proliferation of DLD-1 colorectal cancer cells through antioxidant effect. Cumhuriyet Medical Journal, **35** : 14-24.

Shahnazi, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M., Taghizad-Farid, R. (2007). Study on chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Desj. – Shost. Edited By : Bazarnova, N.G., Markin, V.I. From Faslnamah-i Giyahan-i Daruyi, **6**(23) : 80-88.

Chattopadhyay, D. & Bhattacharya, S.K. (2008). Ethnopharmacology: a new search engine for the development of antivirals from naturaceuticals. In Handbook of Ethnopharmacology (Eddouks, M., ed.), 129-197, Research Signpost Publication. In : Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Hassan-Khan, M.T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnology, **25** (5) : 347-368.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Hassan-Khan, M.T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnology, **25** (5) : 347-368.

Chattopadhyay, D. & Khan, M.T.H. (2008). Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses. Biotechnology Annual Review, **14** : 297-348. In : Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Hassan-Khan, M.T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnology, **25** (5) : 347-368.

Chattopadhyay, D. & Naik, T.N. (2007). Antivirals of ethnomedicinal origin : structure–activity relationship and scope. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, **7** : 275-301 Review. In : Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Hassan-Khan, M.T. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnology, **25** (5) : 347-368.

Chaverri, C., Ciccio, J. F. (2005). Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica., I. *Ocotea brenesii*. International Journal of Tropical Biology and conservation, **53** : 431-436.

Chen, G., Tang, Y., Qu, C., Zhang, Q., Mu, S. (2009). Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* Celak. from Shandong Yimeng. Jingxi Huagong Zhongjianti, **39**(2) : 70-72.

Chun, S. S., Vатtem, D. A., Lin, Y. T., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochemistry, **40** : 809-816. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369.

Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunois, A., Voirin, B. (1995). Phytochemistry, **40**, 115.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel ,B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Van den Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine-oxydase and superoxyde scavengers. Journal of Natural Products, **61** : 71-76.

Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. Food Chemistry, **97** : 725-731. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369.

Cowan, N. M. (1999). Plant products as anti microbial agents. Clinical microbiology Reviews, **12** : 564-582.

Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., Barnes, S. (1993). Genistein, daidzein and their β -glycosides conjugates : antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **41** : 1961-1967.

Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, New York, USA. **In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011).** Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant Omics Journal, **4(4)** : 209-214.

Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationship. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **56 (2)** : 324-325.

Dapkevicius, A., van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J.P.H., Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. Journal of Natural Products, **65(6)** : 892-896. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Dayal, B., Purohit, R.M. (1971). Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. The flavor industry, **2** : 484-485.

De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De-Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S., Senatore F. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Thymus* Growing Wild in Southern Italy. *Molecules*, **14** : 4614-4624.

Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, **89** : 271-277.

Dixon, R.A. (2004). Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, **55** : 225-261.

Djarri, L., Medjroubi, K., Akkal, S., Elomri, A., Seguin, E., Vérité, P. (2006). Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. *Flavour and Fragrance Journal*, **21** : 647-649.

Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. *Pharmaceutical Biology*, **44(8)** : 607-612.

Dob, T., Dahmane, D., Chelghoum, C. (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss et Reuter. *The international Journal of Aromatherapy*, **16** : 95-100.

Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants : antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88** : 308-16. **In : Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A. (2008).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*, **6** : 342-347.

Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, **83** : 255–262. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Merillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57** : 1768–1774. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Durville, J.P. (1893). Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants. J. Fritsch, Paris.

Durville, J.P. (1930). Fabrication des essences et des parfums : Chimie des parfums. Desforges, Girardot et Cie, Paris.

Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., Dobson, V.L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research*, **393** : 223-331. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Eftekhar, F., Nariman, F., Yousefzadi, M., Hadian, J., Ebrahimi, S.N. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity and essential oil composition of *Thymus caramanicus* from Iran. *Natural Product Communications*, **4(8)** : 1139-1142.

El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Amarti, F., Rahouti, M., Aafi, A., Ismaili, M.R., Farah, A. (2010). Chemical composition and antifungal activity of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. essential oils against wood-rotting fungi. *Acta Botanica Gallica*, **157(2)** : 285-294.

El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. *Toxicon*, **57 (Issues 7-8)** : 984-991.

Ernst, E., März, R., Sieder, C. (1997). *Phytomedicine*; **4** : 287-293. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84.

Fan, J.J., Chen, J.H. (1999). Inhibition of aflatoxin-producing fungi by welsh onion extracts. *Journal of Food Protection*, **62** : 414-417.

Fecka, I., Turek S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, **108** : 1039-1053.

Forbes, B.A., Sahn, D.F., Weissfeld, A.S. (1988). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

Gafner, S., Wolfender, E.F., Mavi, S., Hostettman, K. (1996). Antifungal antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Medica*, **62** : 67-69.

Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1472** : 643-650.

Garnero, J. (1996). *Les huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur*, K 345, Paris.

Gattefossé, R.M. (1937). *L'Aromathérapie – Les HE hormones végétales*. Librairie des sciences Girardot, Paris. **In : Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou,**

L., Vergnes, M.F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, **6** : 160-164.

Gazim, Z.C., Rezende, C.M., Fraga, S.R., Svidzinski, T.I.E., Cortez, D.A.G. (2008). Antifungal Activity of the Essential Oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) Growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **39** : 61-63.

Geiger, J.L. (2005). The essential oil of *ginger*, *Zingiber officinale*, and *anaesthesia*. *International Journal of Aromatherapy*, **15** : 7-14.

Gerhard, Krastanov, A., Stoyanova, A., Schimdt, E., Jirovetz, L. (2008). Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil of *Thymus vulgaris* L. from Germany. *Natural Product Communications*, **3(7)** : 1047-1050.

Gerlier, H.W., Thomasset, N. (1986). Use the MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, **94** : 57-63.

Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Glisic, S.B., Misic, D.R., Stamenic, M.D., Zizovic, I.T., Asanin, R.M., Skala, D.U. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil : Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, **105** : 346-352.

Goncalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, **32(1)** : 70-75.

Green, L.M., Reade, J.L., Ware, C.F. (1984). Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantification of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *Journal of Immunological Methods*, **70** : 257-268.

Guignard, J. L. (2001). Botanique systématique moléculaire, Masson, Paris, 221-225.

Guillen, M.D., Manzanos, M.J. (1998). Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild growing plant *Thymus vulgaris* L. Flavour and Fragrance Journal, **13(4)** : 259-62. In : **Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** : 149 -157.

Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea carechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1427** : 13-23.

Haag-berrurier, M., Duquenois, P. (1962). Extraction and physicochemical characterization of the luteolin in the flowers of the hawkweed *Hieracium pilosella* L.C.R. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **7(254)** : 3419-21.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86(6)** : 985-990.

Hashemi, P., Abolghasemi, M.M., Hassanvand, H., Ahmadi, S. (2010). Headspace solvent microextraction of volatile components of *Thymus daenensis*. *Journal of Essential Oil Research*, **22(4)** : 365-368.

Harborne, J.B. (1985). Phenolics and plant defence. Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe, **25** : 393-408.

Harborne, J.B. (1988). The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman and Hall.London.

Harborne, J.B. (1993). (ed.) : *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London: Chapman Hall. In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004). Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Hatanaka, A., Kajiwara, T., Sekiya, J. (1987). Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44** : 341-361.

Hay Robert, K.M., Waterman, P.G. (1993). *Volatile Oil Crops, Their Biology, Biochemistry and Production*, John Wiley and Sons Inc., New York.

Hazzit, M., Baaliouamer, A. (2007). Essential oil composition of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Rivista Italiana EPPOS*, **43** : 11-18.

Hazzit, M., Baaliouamer, A. (2009). Variation of essential oil yield and composition of *Thymus palloscens* de Noe from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **21(2)** : 162-165.

Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. (2006). Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** : 6314-6321.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). The Journal of Nutritional Biochemistry, **13(10)** : 572-584.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von-Wright, A. (1998) . Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** : 3590-3595. In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, **116** : 211-222.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : The Zutphen elderly study. *Lancet*, **342** : 1007-1011.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., et al. (1995). Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, **155** : 381-386. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines : Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Heywood, V.H. (1993). Flowering plants of the world. London, England : London University Press. **In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011).** Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Hitokoto, H., Morozomi, S., Wauke, T., Sakai, S., Kurata, H. (1980). Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **39** : 818-822.

Hitokoto, H., Morozomi, S., Wauke, T., Sakai, S., Ueno, I. (1978). Inhibition effects of condiments and herbal drugs on growth and toxin production of toxinogenic fungi. *Mycopathologia*, **66** : 161-167.

Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80(7)** : 1081-1093.

Horwath, A.B., Grayer, R.J. Keith-Lucas, D.M. Simmonds, M.S.J. (2008). Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36** : 117-133.

Hossain, M.B., Patras, A., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P. (2011). Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on in vitro antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. *Journal of Functional Foods*, **3** : 179-189. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58(19)** : 10576-10581. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Howes, M.J. R., Simmonds, M.S.J., Kite, G.C. (2004). Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas, chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1028** : 307-312.

Inyoue, S., Goi, H., Miyouchi, K., Ogihara, M., Iwanami, I. (1983). Inhibitory effect of volatil components on the proliferation of bacteria. *Bokin.Bobai*, **11** : 609-615.

Jaafari, A., Ait-Mouse, H., Rakib, E., Ait-M'barek, L., Tilaoui, M., Benbakhta, C., Boulli, A., Abbad, A., Ziad, A. (2007). Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **17(4)** : 477-491.

Jamshidi, A.M., Aminzadeh, M., Azarnivand, H., Abedi, M. (2006). Effect of evaluation for quality and quantity of essential oil of *Thymus kotschyanus* (damavand-tar). *Fashnamah-i Giyahan-i Daruyi*, **5(18)** : 17-22, 69.

Janicsak, G., Mathe, I., Miklossy-Vari, V., Blunden, G. (1999). Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27(7)** : 733-738. In : **Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Jham, G. N., Dhingra, O.D., Jardim, C.M., Valente, V.M.M. (2005). Identification of the Major Fungitoxic Component of *Cinnamon* Bark Oil. *Fitopatol. Brasil*, **30** : 404-408.

Jia, H.L., Ji, Q.L., Xing, S.L., Zhang, P.H., Zhu, G.L., Wang, X.H. (2010). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. *Journal of Food Science*, **75(1)** : 59-65.

Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., Bagchi, M., Bagchi, D. (2000). Chemoprotective effects of grape seed proanthocyanidin extract on chang liver cells. *Toxicology*, **155** : 83-90.

Jost, P.C., Griffith, O.H. (1984). The spin-labeling technique. *Methods in Enzymology*, **105** : 369-418.

Justesen, U. (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A*, **902(2)** : 369-379. In : **Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Juven, B.J., Kanner, J., Schued, F., Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, **76** : 626-631. In : **Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011).** Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., Benlabeled K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international Journal of Aromatherapy*, **15** : 129-133.

Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C. (2005). Analysis from the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, **20** : 235-236.

Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, M.F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, **6** : 160-164.

Kandaswami, C., Middleton, E. (1994). Free radical scavenging and antioxydant activity of plant flavonoïds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **366** : 351-376.

Kandil, O., Radwan, N.M., Hassan, A.B., Amer, A.M.M., El-Banna, H.A., Amer, W.M.M.(1994). Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **44** : 19-24.

Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B.D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxydant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, **100** : 584-589.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94** : 550–557. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Kato, T., Lijima, H., Ishihara, K., Kanek, T., Hirai, K., Naito, Y., Okuda, K. (1990). Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, **31(4)** : 301-307.

Katsiotis, S.T., Chatzopoulou, P., Svendsen, A.B. (1990). The Essential Oil of *Thymus sibthorpii* Benth. Growing Wild in Greece. *Scientia Pharmaceutica*, **58** : 303-306.

Kellen, J., Krcmery, V. (1966). Determination of lactic and malic dehydrogenase activity in microorganisms by means of phenazine metosulphate. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, **10** : 1-7.

Kiwank, M., Akgul, A. (1990). Mold growth on black table olives and preservation by sorbic acid, methyl-eugenol and spice essential oil. *Nahrung*, **34** : 369-73.

Kizil, S., Uyar, F. (2006). Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. *Asian Journal of Chemistry*, **18(2)** : 1455-1461.

Knols, G., Stal, P.C., Van Ree, J.W. (1994). *HUISARTS WET* **37** : 392-394. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84.

Kosar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species.

Food Chemistry, **91(3)** : 525-533. In : **Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013)**. Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Lao, A., Fujimoto, Y., Tatsuno, T. (1984). Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta, **792** : 92-97.

Kucukbay, F.Z., Kuyumcu, E. (2010). Essential oil composition of *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jales from Turkey. Asian Journal of Chemistry, **22(5)** : 3615-3621.

Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. (2000). Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root : distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **48** : 5338-5342.

Kulevanova, S., Ristić, M., Stafilov, T., et al. (1996). Essential oil analysis of some taxa of genera *Thymus* L.- Environnement influences. Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, **15(1)** : 33-8. In : **Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A. (2008)**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. Phytothérapie, **6** : 342-347.

Kulevanova, S., Stefova, M., Stafilov, T. (1998). Analytical Laboratory, **7**, 103.

Kulisic, T., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M. (2006). Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. Food Technology and Biotechnology, **44(4)** : 485-492. In : **Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013)**. Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Kurt B.G. Torssell. (1998). *A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*, Apotekarsocieteten, Stockholm. Natural Products Chemistry.

Lachowicz, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bievenu, F.E., Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J. (1998). The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. Letters in Applied Microbiology, **26** : 209-14.

Lafferty, F.W.Mc., Stauffer, D.B. (1991). The Important Peak Index of the Registry of New York. Mass Spectral Data. John Wiley & Son.

Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. (1991). Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. Pharmaceutica Acta Helvetiae, **66** :185-188. In : **Lecomte, J., López-Giraldo, L.J., Laguerre, M., Bare'a, B., Villeneuve P. (2010)**. Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic Acid Fatty Esters. Journal of the American Oil Chemists' Society, **87** : 615-620.

Lambinon, J., Delvosalle, L., Duvigneaud, J. (2004). La nouvelle flore de la Belgique du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines, 5ème édition, Jardin Botanique National de Belgique.

Laouer, H., Boulaacheb, N., Akkal, S., Meierhenrich, U.J., Baldovini, N., Prado, S. (2009). Composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *Thymus numidicus* Poiret. *Journal of Essential Oil Research*, **21(4)** : 374-377.

Laranjinha, J., Almada, L., Madeira, V. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals : antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **48 (3)** : 487-94.

Lauthier, F., Taillet, L., Trouillas, P., Delage, C., Simon, A. (2000). Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anti Cancer Drug*, **11** : 737-745.

Laycock, M.V., Thurman, D.A., Boulter, D. (1965). An improved method for the detection of dehydrogenase using tetrazolium salts. *Clinica Chimica Acta*, **11** : 98-100.

Lazze, M.C., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A.I., et al., (2004). Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis*, **25** : 1427-1433. **In : Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011).** Antitumorogenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**: 1849-1854.

Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G. (2000). Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life science*, **66 (14)** : 1281-1291.

Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.L., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N. (2000). Antioxydant properties of di-*tert*-butylhydroxylated flavonoïds. *Free Radical Biology & Medicine*, **29 (9)** : 900-912.

Lecomte, J., Lopez-Giraldo, L.J., Laguerre, M., Barea, B., Villeneuve P. (2010). Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic Acid Fatty Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **87** : 615-620.

Lee, I.C., Bae, J.S., Kim, T., Kwon, O.J., Kim, T.H. (2011). Polyphenolic Constituents from the Aerial Parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Collected on Ulleung Island. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **54(5)** : 811-816. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Lehbili, M., Chibani, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Abuhamdah, S., Touzani, R., Kabouche, Z. (2013). Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, **5 (2)**: 306-310.

Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., Canigual, S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **45** : 519-524.

Loupy, A. (2006). *Microwaves in Organic Synthesis*, 2ieme édition, Tome I et II. Wiley-VCH, Weinheim,

Ložienė, K., Vauciunine, J., Venskutonis, P. (1998). Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. *Planta Medica*, **64** : 772-3. **In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** :149 -157.

Ložienė, K., Venskutonis, P.R., Šipailienė, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. Chemotypes. *Food Chemistry*, **103** : 546-559.

Madhyasta, M.S., Bhat, R.V. (1984). *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Applied and Environmental Microbiology*, **48** : 376-379.

Makarchuk, N.M., Krivenko, V.V., Akimov, Yu.A., Smorodinskaja, V.G., Marchenko, K.P. (1981). Antimicrobial activity of essential oils-peppermint, lavender, wormwood and lemon. *Khim. Vzaimodeistvie. Rast*, **1** : 146-150.

Makris, D.P., Rossiter, T. (2001). Comparison of quercetin and non-orthohydroxy flavonol as antioxidant by competing in-vitro oxidation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** : 3370 - 3377.

Malik, M., Zhao, C.W., Schoene, N., Guisti, M.M., Moyer, M.P., Magnuson, B.A. (2003). Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutrition and cancer*, **46** : 186-196. **In : Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011).** Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91** : 1849-1854.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79** : 727-747. **In : Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011).** Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91** : 1849-1854.

Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Veljic, M. (2005). External flavones from *Thymus striatus* Vahl (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33(11)** : 1179-1182. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (1999). *Journal of Food Protection*, **62** : 1017-1023. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84.

Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Frau, M.A., Molicotti, P., Zanetti, S. (2010). Composition and Biological Activity of Supercritical CO₂

Extract of Some Lamiaceae Growing Wild in Sardinia (Italy). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **13**(5) : 625-632.

Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Pellicer, F., López-Muñoz, F.J., Navarrete, A. (2009). Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Medica*, **75** (5) : 508-511.

Martinez-Perez, Y., Quijano-Celis, C.E., Pino, J.A. (2007). Volatile constituents of Cuban thyme oil (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **10**(3) : 179-183.

Maruzzella, J.C. (1962). The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet*, **77**(1) : 67-72.

Masaki, H., Okamoto, N., Sakaki, S., Sakurai, H. (1997). Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxydes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **20** (4) : 304-308.

Masquelier, J. (1990). Procédé de préparation d'extraits polyphénoliques de type flavane-3-ol purifiés et extraits obtenus. Brevet européen **0 384 796-A1**.

Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review. *Biotechnology Advances*, **26** : 548-560. In : **Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Mc Anlis, G. T., Mc Eneny, J., Pearce, J., Young, I. S., (1999). Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, **53** : 92-96.

Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R., Bayet, C., Voirin, B. (1995). Five 8- C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*; **38**, 637.

Mesaik M-A, Jabeen A, Halim S-A, Begum A, Khalid A-S, Asif M, Fatima B, Ul-Haq Z and Choudhary M-I. (2012). In Silico and In Vitro Immunomodulatory Studies on Compounds of *Lindelofia stylosa*. *Chemical biology & drug design*, **79** : 290-299.

Meshkatalasadat, M.H., Sarabi, R.S., Amiri, H., Piraei, M. (2006). GC/MS analysis of the essential oil of *Thymus persicus* leaves. *Asian Journal of Chemistry*, **18**(3) : 2385-2387.

Miao, Y., Tang, Y., Wu, Y., Liu, C. (2011). Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Shizhen Guoyi Guoyao*, **22**(2) : 305-306.

Middleton, E.J., Kandaswami C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoïds on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, **52** : 673-751. In : **Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines : Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49**(2) : 191-199.

Miguel, M.G., Duarte, F., Venancio, F., Tavares, R. (2004). Composition of the essential oils from Portuguese *Thymus albicans* collected at different regions of Ria Formosa (Algarve). *Journal of Essential Oil Research*, **16(4)** : 308-311.

Miguel, M.G., Falcato-Simoes, M., Figueiredo, A.C., Goncalves Barroso, J.M., Pedro, L.G., Carvalho, L.M. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *Journal of Food Lipids*, **12(3)** : 181-197.

Miller, H. M. (1971). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **45**, 91.

Miri, R., Ramezani, M., Javidnia, K., Ahmadi, L. (2002). Composition of the volatile oil of *Thymus transcaspicus* Klokov from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, **17(4)** : 245-246.

Miron, T.L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibanez, E., Herrero, M. (2011). Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, **1218(30)** : 4918-4927. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Miura, K., Nakatani, N. (1989). Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L). *Agricultural and Biological Chemistry*, **53(11)** : 3043-3045. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Mkaddem, M.G., Romdhane, M., Ibrahim, H., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Bouajila, J. (2010). Essential Oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis and Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Medicinal Food*, **13(6)** : 1500-1504.

Mockute, D., Bernotiene, G. (2004). 1,8-Cineole-caryophyllene oxide chemotype of essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Vilnius (Lithuania). *Journal of Essential Oil Research*, **16(3)** : 236-238.

Mojab, F., Nickavar, B. (2003). Composition of the Essential Oil of the Root of *Heracleum persicum* from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2** : 245-247.

Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. **In** *Thyme: the Genus Thymus*; Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles 17; Stahl-Biskup, E., Saez, F., Eds.; Taylor and Francis: London, U.K. **In : Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. (2006).** Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** : 6314-6321.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., de Valle, C.E., Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-LWT*, **38** : 565-570. **In : Celikel, N., Kavas, G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences*, **26(3)** : 174-181.

Morteza-Semnani, K., Rostami, B., Akbarzadeh, M. (2006). Essential oil composition of *Thymus kotschyanus* and *Thymus pubescens* from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **18(3)** : 272-274.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65** : 55-63.

Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi, M.S., Ghorbani, A. (2005). Labiateae family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology- *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2** : 63-79.

Nagy, T.O., Solar, S., Sontag, G., Koenig, J. (2011). Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. *Food Chemistry*, **128(2)** : 530-534. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Naithani, R. et al. (2008). Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **8** : 1106-1133. **In : Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Sharma-Dey, R., Bag, P., Chakraborti, S., Hassan-Khan, M.T. (2009).** Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnology*, **25 (5)** : 347-368.

Najid, A., Simon, A., Cook, J., Chable-Rabinobitch, H., Delage, C., Chulia, A., Rigaud, M. (1992). Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Letter*, **299** : 213-217.

Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M. Scaccini, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxydation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivates. *Free Radical Biology & Medicine*, **19(5)** : 541-552.

Nardini, M., Nutella, F., Gentili, V., Di Felice, M., Scaccini, C. (1997). Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxydant defense system in rat : an in vivo study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , **342 (1)** : 157-60.

Nasab, M.Z., Hejazi, S.M.H., Bihamta, M.R., Mirza, M., Naderi-Shahab, M.A. (2012). Assessment of karyotypical variation among 16 populations of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus kotschyanus* Boiss. species in Iran. *African Journal of Biotechnology*, **11(5)** : 1028-1036.

Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivates as antioxydants : structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** : 1453-1459.

NCCLS (1993). Performance standards for antimicrobial disk susceptibilities tests; Villionova, PA, USA: Approach Standard NCCLS : Publication M2-A5.

Nejad-Ebrahimi, S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, **110** : 927-931. **In : Ghasemi-Pirbalouti, A.,**

Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant Omics Journal, **4(4)** : 209-214.

Nickavar, B., Mojab, F., Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chemistry, **90** : 609-611. **In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011).** Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant Omics Journal, **4(4)** : 209-214.

Nkiliza, J., Marzelle, J.C. (1996). Procédé de préparation d'extraits contenant des composés polyphénoliques oligomères de type catéchiques à partir de sources végétales et d'extraits obtenus. Brevet européen **0 692 480-A1**.

Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **48 (10)** : 1467-1469.

Omidbaigi, R., Sefidkon, F., Hejazi, M. (2005). Essential oil composition of *Thymus citriodorus* L. cultivated in Iran. Flavour and Fragrance Journal, **20(2)** : 237-238.

OMS. (2005). La résistance aux antimicrobiens : une menace pour la sécurité sanitaire mondiale. A58/14, 1-6.

Oroojaliana, F., Kasra-Kermanshahia, R., Azizic, M., Bassamid, M.R. (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, **120** : 765-770.

Özcan, M.M., Chalchat, J.C. (2007). Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: characterization of the seed oil and essential oil. Grasas y Aceites; **58** : 359-365.

Ozen, T., Demirtas, I., Aksit H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. Food Chemistry, **124** : 58-64.

Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Kazaz, C., Asci, A., Kaya, Y., Secen, H. (2011). Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*. Records of Natural Products, **5(1)** : 12-21. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Papageorgio, V. (1980). GLC-MS Computer analysis of the essential of *Thymus capitatus*. Planta Medica Supplement : 29-33. **In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie, **9** : 149 -157.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Kole, C. (1996). Microbios; **86** : 237-246. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, **905** : 75-84.

Pavela, R. (2009). Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Industrial Crops and Products, **30(2)** : 311-315.

Pavel, M., Ristic, M., Stevic, T. (2010). Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania : chemical composition and antimicrobial activity. Journal of the Serbian Chemical Society, **75(1)** : 27-34.

Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369.

Petersen, M., Simmonds, M.S.J. (2003). Molecules of Interest, Rosmarinic acid. Phytochemistry, **62** : 121-125.

Pfeffer, P.E., Valentine, K.M., Parrish, F.W. (1979). Deuterium-induced differential isotope shift carbon-13 NMR. 1. Resonance assignments of mono- and disaccharides. Journal of the American Chemical Society, **101(5)** : 1265-1274.

Pharmacopée européenne, Addendum (2001) (3^{ème} Ed.), 107, Conseil de l'Europe, Strasbourg.

Pieters, R., Huismans, D.R., Loonen, A.H., Hahlen, K., Van der Does-Van den Berg, A., Van Wering, E.R., Veerman, A.J.P. (1991). Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Lancet; **338** : 399-403.

Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C.E., Roura, S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, **36** : 679-684. **In : Celikel, N., Kavas, G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech Journal of Food Sciences, **26 (3)** : 174-181.

Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., et al. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetable reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radical Research, **36** : 217-233. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369.

Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome II. Editions du centre National de la Recherche Scientifique. 15, quai Anatole-France - Paris 7^e.

Raal, A., Arak, E., Orav, A. (2005). Comparative chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. from different geographical sources. *Herba Polonica*, **51(1/2)** : 10-17.

Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M., Tabatabaei, B.E.S. (2009). Genetic Variability and Geographic Differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an Endangered Medicinal Plant, as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Biochemical Genetics*, **47** : 831-842. **In : Nasab, M.Z., Hejazi, S.M.H., Bihanta, M.R., Mirza, M., Naderi-Shahab, M.A. (2012).** Assessment of karyotypical variation among 16 populations of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus kotschyanus* Boiss. species in Iran. *African Journal of Biotechnology*, **11(5)** : 1028-1036.

Rasooli, I., Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry (Elsevier)*, **66(24)** : 2851-2856.

Reed, L.J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **21 (3)** : 493-497.

Reichling, J., Nolkemper, S., Stintzing, F.C., Schnitzler, P. (2008). Impact of Ethanolic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. *Forschende Komplementarmedizin*, **15(6)** : 313-320. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, **9** : 382-396.

Ricciardelli D'Albore, G.C. (1986). Les insectes pollinisateurs de quelques ombellifères d'intérêt agricole et condimentaire (*Angelica archangelica* L., *Carum carvi* L., *Petroselinum crispum* A.W. HILL., *Apium graveolens* L., *Pinpinella anisum* L., *Daucus carota* L., *Foeniculum vulgare* MILLER V. *Azoricum* THELL.). *Apidologie*, **17** : 107-124.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. (1996). Antioxydant activities of flavonoïds as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, **24** : 790-795.

Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.

Rimbach, G., Höhler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archives of Animal Nutrition*, **52** : 203-222.

Rivero-Perez, M. D., Muniz, P., & Gonzalez-Sanjose, M. L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, Scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** : 5476–5483. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martínez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Rodriguez, R.J., Mirande, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R. (2001). Influence of prenylated and non-prenylated flavonoïds on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, **39** : 437-445.

Roulier, G. (1992). Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt. Dangles. France.

Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012). Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **905** : 75-84.

Rustaiyan, A., Lajevardi, T., Rabbani, M., Yari, M., Masoudi, S. (1999). Chemical constituents of the essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. from Iran. *Daru, Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, **7(4)** : 27-28.

Saad, H.E.A., El-sharkawy, S.H., Halim, A.F. (1995). Composition of the essential oils of the leaves and stems of *Torilis aruensis*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **70** : 85-87.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Mansredini, S., Radice, M. and Irimi, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essentials oils of different origin as functional antioxydants, antiradicals and antimicrobial in food. *Food Chemistry*, **91** : 621-632. In **Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C., Ayachi, A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*, **12(1)** : 59-69.

Saez, F. (1998). Variability in essential oils from populations of *Thymus hyemalis* Lange in southeastern Spain. *Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants*, **5** : 65-76. In : **Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9** :149 -157.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. et al. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , **322** : 339-346. In : **Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).**Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Salas, J.B., Tellez, T.R., Pardo, F.M.V., Alonso, M.J.P., Capdevilla, M.A.C. (2011). Study of the essential oil of three species of thyme in their limit of distribution in Spain. From *Acta Botanica Gallica*, **158(2)** : 251-262.

Salgueiro, L.R., Pinto, E., Goncalves, M.J., Costa, I., Palmeira, A., Cavaleiro, C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains. *Flavour and Fragrance Journal*, **21(5)** : 749-753.

Sanchez-Moreno, C., Satué-Garcia, M.T., Frankel, E.N. (2000). Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** : 5581-5587.

Sarikurkcu, C., Sabih Ozer, M., Eskici, M., Tepe, B., Can, S., Mete, E. (2010). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. Food and Chemical Toxicology, **48(7)** : 1801-1805.

Satoh, K., Kadofuku, T., Sakagami, H. (1997). Effect of Trolox, a synthetic analog of R-tocopherol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. Anticancer Research, **17** : 2459-2464. **In : Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P, Simon, A., Duroux J.L. (2001).** Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviours of seven plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49** : 3321-3327.

Scalbert, A., Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal of Nutrition; **130** : 2073S-85S. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. Nutrition and cancer, **49(2)** : 191-199.

Scarpati, M., Oriente, G. (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal Rosmarinus off) . Rice Science, **28** : 2329-2333.

Schilcher, H. (1985). « Effets and side effets of essential oils » in « essential oils and aromatic plants. 217-231. Baerheim, A. Schefer J. J. C. (Eds). Dordrecht, Holland.

Schwartz, R., Davis, R., Hilton, T.J. (1992). Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. American Journal of Dentistry , **5 (3)** : 147-150.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53** : 7749-7759. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Schanenstein, E., Hoffer-Bergthaler, E. (1972). Cytospectrometric determination of the succinodihydrogenase activity in isolated cells with MTT reagent. Mantshefte für Chemie, **266** : 261-267.

Sergediene, E., Jonsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I.M., et al. (1999). Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. FEBS Letters, **462** : 392-396. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines : Relationship Between Structure and Activity. Nutrition and cancer, **49(2)** : 191-199.

Shahnazi, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M., Taghiazd-Farid, R. (2007). Study on chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Desj. – Shost. Faslnamah-i Giyahan-i Daruyi, **6(23)** : 80-88.

Shirataki, Y., Kawase, M., Saito, S., Kurihara, T., Tanaka, W., Satoh, K., Sakagami, H., Motohashi, N. (2000). Selective cytotoxic activity of grape peel and seed extracts against oral tumor cell lines. *Anticancer Research*, **20** : 423-426.

Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima, Jr., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez Ferreira, E., Soares, R.O.A., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimaraes, A.C., Zoghbi, M.G.B., Henriques, M.G.M.O. (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, **66** (1) : 57- 69.

Siddiqui, Y.M., Ettayebi, M., Haddad, A.M., Al-Ahdal, M.N. (1996). Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *herpes simplex* virus type 1 and Newcastle disease virus. *Medical Science Research*, **24** : 185-186.

Sierens, J., Hartley, J.A., Campbell, M.J., Leathem, A.J.C., Woodside, J.V. (2001). Effects of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutation Research*, **485** : 169-176.

Simon, A., Najid, A., Chulia, A. J., Delage, C., Rigaud, M. (1992). Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1125** : 68-72.

Skaper, S.D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M., Leon A. (1997). Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, **22** : 669-678. In : **Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49**(2) : 191-199.

Slater, T.F., Sawyer, B., Strauly, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, **77** : 383-393.

Slavkovska, V.N., Lakusic, B.S., Jancic, R.B., Mimica-Dukic, N.A., Vujcic, D.S. (2006). Chemical composition of the essential oil of *Thymus bracteosus* Vis. ex Bentham (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **18**(3) : 310-311.

Soares, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M. (1997). Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, **26** : 469-478.

Sokmen, A., Gulluce, M., Askin A.H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, **15**(8) : 627-634.

Sourai, P.G. (1989). Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry : a review *Odontostomatol. Proodos*, **43** (5) : 399-408.

Spiridon, I., Bodirlau, R., Teaca, C.A. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*, **6(3)** : 388-396

Stahl-Biskup, E., Saez, F. (2002). *Thyme*, The genus *Thymus*. Taylor and Francis. (331 pp).
In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, **4(4)** : 209-214.

Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, **2** : 325-357. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*, **2** : 427-442. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1996). : Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, **96** : 1027-1039. **In : Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel J.A. (2004).** Cytotoxicity and Antiproliferative Activities of Several Phenolic Compounds Against Three Melanocytes Cell Lines: Relationship Between Structure and Activity. *Nutrition and cancer*, **49(2)** : 191-199.

Stoilova, I., Bail, S., Buchbauer, G., Krastanov, A., Stoyanova, A., Schmidt, E., Jirovetz, L. (2008). Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil of *Thymus vulgaris* L. from Germany. Edited By : Bazarnova, N. G.; Markin, V. I *From Natural Product Communications*, **3(7)** : 1047-1050.

Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H., Fujiki, H. (1998). Wide distribution of [H-3](–)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*, **19** : 1771-1776. **In : Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011).** Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**: 1849-1854.

Sunar, S., Aksakal, O., Yildirim, N., Agar, G., Gulluce, M., Sahin, F. (2009). Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, **14(2)** : 4313-4318. **In : Nasab, M.Z., Hejazi, S.M.H., Bihamta, M.R., Mirza, M., Naderi-Shahab, M.A. (2012).** Assessment of karyotypical variation among 16 populations of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus kotschyanus* Boiss. species in Iran. *African Journal of Biotechnology*, **11(5)** : 1028-1036.

Svoboda, K.P. (2000). *Secretory structures of Aromatic and medicinal plant*. Microscopix Publications. Powys, UK.

Swigar, A.A., Silverstein R.M. (1981). Monoterpenes, Infrared, Mass, NMR Spectra and Kovats Indices, Aldrich Chem. Co. Milwaukee, WI, USA.

Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2010). Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Taldykin, O.E. (1979). Use of phytoncidic activity of essential oils for improving the air in sealed place. *Rol Biogeotsenozkh Znach Med Mater Soveshch*, **1** : 201-203.

Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N., Mori, H. (1993). Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Research*, **53** : 2775-2779.

Tantaoui- Elaraki, A., Beraoud, L. (1994). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* , **13** : 67-72.

Tarayre, J.P., Lauressergues, H. (1977). Advantages of a combination of proteolytic enzymes flavonoids and ascorbic acid in comparison with non-steroid anti-inflammatory agents. *Arzneimittel forschung.*, **27(6)** : 1144-9.

Teimouri, M. (2012). Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6(4)** : 631-635.

Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) ssp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) borne. *Food Chemistry*, **100** : 985-989.
In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, **130** : 362-369.

Tepe, B., Sarikurkcu, C., Berk, S., Alim, A., Akpulat, H.A. (2011). Chemical Composition, Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products*, **5 (3)** : 208-220.

Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takama, K. (1993). Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolics compounds in solution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57 (7)** : 1204-1205.

Thornhill, S.M., Kelly, AM. (2000). Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Alternative Medicine Review*, **5.5** : 448-454.

Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I. (1990). *Revista Latinoamericana de Quimica*. **21**, 134.

Tomas-Barberan, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I. (1987). *Biochemical Systematics and Ecology*, **16**, 43.

Tomas-Barberan, F.A., Wollenweber, E. (1990). Plant Systematics and Evolution; **173**,109.

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). Journal of Applied Biosciences, **58** : 4234-4242.

Trouillas, P., Calliste, C.A., Allais, D.P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., Duroux, J.L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chemistry, **80** : 399-407.

Trute, A., Nahrstedt, A. (1996). Separation of Rosmarinic Acid Enantiomers by Three Different Chromatographic Methods (HPLC, CE, GC) and the Determination of Rosmarinic Acid in *Hedera helix* L. Phytochemical Analysis, **7** : 204-208.

Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin-Wu, H.W., Wang, C.J. (1997). Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. Food and Chemical Toxicology , **35** : 1159-1164.

Tumen, G., Baser, K.H.C, Demirci, B., Ermin, N. (1998). The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. Flavour and Fragrance Journal, **13(1)** : 65-7.
In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie, **9** :149 -157.

Tzakou, O., Couladis, M. (2008). Essential oil of *Thymus zygioides* var. *lycaonicus* from Greece. Journal of Essential Oil Research, **20(5)** : 442-443.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, **65** : 4606-4610.
In : Ghasemi-Pirbalouti, A., Rahimmalek, M., Malekpoor, F., Karimi, A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant Omics Journal, **4(4)** : 209-214.

Ündeğer, Ü., Başaran, A., Degen, G.H., Başaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. Food and Chemical Toxicology, **47** : 2037-2043.

Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.j., Tromp, M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996). Free Radical Biology & Medicine , **20 (3)** : 331-342.

Vargas, I., Sanz, I., Prima-Yufer, E. (1999). Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. Journal of Food Protection, **62(8)** : 929-93.

Vercauteren, J., Weber, J.F., Bisson, J.L., Bignon, J. (1993). Composition de dérivés phénoliques, leur préparation et leurs applications comme anti-oxydants. Brevet Français. **2 706 478-A1.**

Verma, R.S., Padalia, R.C., Chanotiya, C.S., Chauhan, A. (2010). Chemical investigation of the essential oil of *Thymus linearis* (Benth. ex Benth) from western Himalaya, India. Natural Product Research, **24(20)** : 1890-1896.

Vila, R., Freixa, B., Canigual, S. (1995). Composition and study of the variability of the essential oil and *Thymus funkii* Cosson. Flavour and Fragrance Journal, **10** : 379-83. **In : Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie, **9** :149 -157.

Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, D., Monks, A., Pittman, A., Boyd, M.R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability : A critical examination of selected parameters affecting formazan production. Cancer Research, **51** : 2515-2520.

Voirin, B., Bayet, C., Faure, O., Jullien, F. (1999). Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. Phytochemistry, **50(7)** : 1189- 1193. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Wang, M., Li, J., Ho, G.S., Peng, X., Ho, C.T. (1998). Isolation and identification of antioxidative flavonoid glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). Journal of Food Lipids; **5(4)** : 313-321. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chemistry, **87(2)** : 307-311. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

WHO. (1999). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, **vol. 1** (Geneva). **In : El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A. (2011).** Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. Toxicon, **57 (Issues 7-8)** : 984-991.

Wild, R. (1994). The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press, inc., Emmaus, Pa.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, **105(3)** : 940-949. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry, **99** : 775-783. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-**

Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369.

Wright, G.D., Sutherland, A.D. (2007). New strategies for combating multidrugresistant bacteria. Trends in Molecular Medicine, **13 (6)** : 260-7.

Yang, M., Hao, F., Han, J. (2004). Study on the chemical components of essential oil of *Thymus quinquecostatus* in Ningxia Guyuan by GC-MS. From Ningxia Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, **25(4)** : 353-355.

Yavari, A., Nazeri, V., Sefidkon, F., Hassani, M.E. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Thymus migricus* Klokov & Desj.-Shost. from Iran. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, **13(4)** : 385-389.

Yi, W., Wetzstein, H.Y. (2011). Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. Journal of the Science of Food and Agriculture , **91** : 1849-1854.

Youdim, K.A., Deans, S.G. (1999). Mech. Ageing Dev. **109** : 163-175. **In : Rubió, L., Serra, A., Macià, A., Borràs, X., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012).** Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, **905** : 75-84.

Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M. Vampa, G., Bellotti, A., Mazza, P., (1991). Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/Microsome Reversion Assay. Planta Medica, **57** : 237-241.

Zeghib, A., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Touzani, R., Kabouche, Z. (2013). Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Constantine (Algeria). Der Pharmacia Lettre, **5 (3)** : 206-210.

Zgorka, G., Glowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **26(1)** : 79-87. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49(11)** : 5165-5170. **In : Pérez-Tortosa, V., Lopez-Orenes, A., Martinez-Perez, A., Ferrer, M.A., Calderon, A.A. (2012).** Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. Food Chemistry, **130** : 362-369. **In : Pereira, O.R., Cardoso, S.M. (2013).** Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry, **9** : 382-396.

Zhigzhitzhapova, S.V., Rabzhaeva, A.N., Zvontsov, I.V., Radnaeva, L.D. (2008). Edited By : **Bazarnova, N.G., Markin, V.I.** Chemical composition of essential oil of *Thymus baicalensis* Serg. from Transbaikalia region. From Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya, **1** : 73-76.

Zhiri, A. (Octobre, 2006). Aromathérapie...un peu d'histoire... Nutra News. 6-7.

Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, **44** : 97-103.

WEBOGRAPHIE

Composants. Lien internet disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Thym#Composants>

Desmyter, J., Melnick, J.L., Rawls, W.E. (Octobre 1968). Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, **2 (10)** : 955-61 (PMID 4302013, PMCID 375423). Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Vero_%28cellule%29

Duke, J.A. Chemicals and their Biological Activities in : *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) -- Common Thyme, Garden Thyme, Thyme. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://huilesutiles.eu/docs/thyme.pdf>

Histoire. Lien internet disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Thym#Histoire>

Mohammedi, D. Classification et mode d'action des antibiotiques. 10p. Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://www.sante.dz/aarn/classification.pdf>

MTCC. Main Types of Cell Culture [archive]. *Fundamental Techniques in Cell Culture : a Laboratory Handbook*. Consulté le 2006-09-28. Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Vero_%28cellule%29

Phytothérapie et Aromathérapie. THYM, Nom scientifique : *Thymus vulgaris* L. Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : http://www.hippocratus.com/modules/mdc_fiches_plantes/detail_plante.php?ID_Plante=thy001

Rey, A. (1992). *Dictionnaire historique de la langue française*, Robert. Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Thym#Histoire>

Shimizu, B. (1993). *Manual of selected cultured cell lines for bioscience and biotechnology*. Tokyo, Kyoritsu Shuppan; 299-300. (ISBN 4-320-05386-9, lire en ligne [archive]). Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Vero_%28cellule%29

Thym. Lien internet disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Thym>

Yasumura, Y., Kawakita, M. (1963). The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*, **21(6)** : 1201-1219 (lire en ligne [archive]). Disponible (jusqu'à la date du 22/11/2013) à partir de : http://fr.wikipedia.org/wiki/Vero_%28cellule%29.

ZEGHIB ASSIA

ANNEXE

ZEGHIB ASSIA

ANNEXE

Annexe 1 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus*.

Collectes de 150 mL chacune	Nom de la sous-fraction	Eluants				Quantité d'éluants (L)				
		EP %	DM %	ME %	H ₂ O%					
0	SF ₁	100	0	0	0	Plus de 0,250				
1 à 6		50	50	0	0	1				
7 et 8		0	100	0	0	1,5				
9 à 14	SF ₂	0	100	0	0					
15 à 18		0	99	1	0	4,5				
19 à 21	SF ₃	0	99	1	0					
22 à 25	SF ₄									
26 à 37	SF ₅									
38 à 40	SF ₆									
41 à 46	SF ₇₋₈									
47 et 48	SF ₉					0	98	2	0	4,5
49 à 55	SF ₁₀₋₁₁									
56 et 57	SF ₁₂									
58 à 67	SF ₁₃₋₁₄									
68	SF ₁₅									
69 à 73	SF ₁₆									
74 à 82	SF ₁₇	0	97	3	0	5				
83 à 94	SF ₁₈									
95	SF ₁₉									
96 à 105	SF ₂₀₋₂₁	0	97	3	0	5,5				
106 à 126		0	96	4	0					
127 à 138	SF ₂₂	0	96	4	0	4				
139 à 148		0	92	8	0					
149 à 163		SF ₂₃₋₂₄	0	92	8		0			
164 à 167	0		90	10	0	4				
168 à 170	SF ₂₅	0	90	10	0					
171 à 179	SF ₂₆									
180 à 182	SF ₂₇									
183 à 188	SF ₂₈						0	90	10	0
189 à 191							0	85	15	0
192 à 194	SF ₂₉					0	85	15	0	3,5
195 et 196	SF ₃₀									
197 à 205	SF ₃₁									
206 et 207	SF ₃₂									
208 et 209	SF ₃₃	0	85	15	0					
210		0	80	20	0	4,5				

211 et 212	SF ₃₄₋₃₅					
213 et 214	SF ₃₆	0	80	20	0	
215 à 222	SF₃₇					
223 à 228	SF ₃₈					
229 à 236	SF ₃₉	0	80	20	0	
237		0	75	25	0	
238 à 250	SF ₄₀	0	75	25	0	4,5
251 à 255	SF ₄₁					
256 à 258	SF ₄₂					
259 à 263	SF ₄₃	0	75	25	0	
264 et 265		0	70	30	0	
266 et 267	SF ₄₄					
268 et 269	SF ₄₅					
270 à 274	SF ₄₆					
275 à 277	SF ₄₇					
278	SF ₄₈	0	70	30	0	6,5
279 à 284	SF ₄₉					
285 à 289	SF ₅₀					
290 à 292	SF ₅₁					
293 et 294	SF ₅₂					
295 et 301	SF ₅₃					
302 et 306	SF ₅₄					
307 et 310	SF ₅₅	0	65	35	0	
311 et 317	SF ₅₆					
318 à 320	SF ₅₇	0	65	35	0	
321 et 322		0	60	40	0	
323 à 327	SF ₅₈					
328	SF ₅₉					
329 à 332	SF ₆₀	0	60	40	0	4
333	SF ₆₁					
334 à 338	SF ₆₂					
339 à 345	SF ₆₃	0	60	40	0	
346 à 348		0	50	50	0	
349 et 350	SF ₆₄					
351 à 355	SF ₆₅					
356 à 358	SF ₆₆	0	50	50	0	6
359	SF ₆₇					
360 et 361	SF ₆₈					
362 à 374	SF ₆₉					
375 à 381	SF ₇₀	0	50	50	0	
382 à 386		0	0	100	0	
387 à 390	SF ₇₁	0	0	100	0	1,5
391	SF ₇₂	0	0	100	0	
392 à 401		0	0	50	50	1,5
402 à 411		0	0	0	100	2

Les masses des sous-fractions obtenues suite à la séparation sur colonne de gel de silice de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus*, ainsi que les différents systèmes d'éluion permettant leur visualisation sur plaque CCM analytique de gel de silice et leur caractéristiques sont présentés dans l'Annexe 2.

Annexe 2 : Caractéristiques des sous-fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction acétate d'éthyle de *T. numidicus*.

Sous-Fractions (SF)	Eluants en CCM analytique	Masse (g)	Observations	
SF ₁	DM (100 %)	-	Mélange séparable non traité à cause de sa faible quantité	
SF ₂		-	Mélange séparable non traité à cause de sa faible quantité	
SF ₃		Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	-	Mélange séparable non traité à cause de sa faible quantité
SF ₄			-	Mélange séparable non traité à cause de sa faible quantité
SF ₅			-	Mélange séparable non traité à cause de sa faible quantité
SF ₆	DM/ME (9,5/0,5)	0,06504	Mélange complexe	
SF ₇₋₈		0,05511	Mélange complexe	
SF ₉	Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	0,00282	Mélange complexe	
SF ₁₀₋₁₁		0,01254	Mélange complexe	
SF ₁₂		0,01014	Mélange complexe	
SF ₁₃₋₁₄		0,09785	Mélange complexe	
SF ₁₅	DM/ME (9,5/0,5) DM/ME (9/1)	0,00601	Mélange complexe	
SF ₁₆	AE/ME/H ₂ O (10/2/1) Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	0,02318	Mélange complexe	
SF ₁₇	DM/ME (9/1) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	0,11223	Mélange complexe	
SF ₁₈	DM/ME (9/1) AE/ME/H ₂ O (10/1/0,5)	0,30803	Mélange complexe	
SF ₁₉	AE/ME/H ₂ O (10/2/1)	0,0219	Mélange complexe	

	Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique		
SF ₂₀₋₂₁	DM/ME (9/1) DM/ME (8,5/1,5) AE/ME/H₂O (10/2/1) Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	0,85016	Mélange séparable avec 2 produits majoritaires dans le 1^{er} tiers de la plaque CCM analytique
SF ₂₂	DM/ME (9/1) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	0,62967	Mélange complexe
SF ₂₃₋₂₄	DM/ME (9/1) DM/ME (8,5/1,5) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) Hexane/AE (50/50) + 100 µL acide acétique	1,42199	Mélange complexe
SF ₂₅	DM/ME (9/1) DM/ME (8,5/1,5) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) AE/ME/H ₂ O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,12768	Mélange complexe
SF ₂₆	DM/ME (8,5/1,5) DM/ME (8/2) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) AE/ME/H ₂ O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,29968	Mélange complexe
SF ₂₇	DM/ME (8,5/1,5) DM/ME (8/2) DM/ME (7,5/2,5) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) AE/ME/H ₂ O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,07004	Mélange complexe
SF ₂₈	DM/ME (8/2) DM/ME (7,5/2,5) AE/ME/H ₂ O (10/1/1) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) AE/ME/H ₂ O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,1754	Mélange complexe
SF ₂₉	AE/ME/H ₂ O (10/1/1)	0,16752	Mélange complexe
SF ₃₀	AE/ME/H ₂ O (10/2/1)	0,09096	Mélange complexe

SF ₃₁	AE/ME/H ₂ O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,23965	Mélange complexe
SF ₃₂	AE/ME/H₂O (10/2/1) AE/ME/H₂O (10/1/1) + 100 µL acide acétique	0,04031	Mélange complexe
SF ₃₃		0,05257	Mélange complexe
SF ₃₄₋₃₅		0,04523	Mélange complexe
SF ₃₆		0,08853	Mélange complexe
SF₃₇		0,23465	Mélange séparable avec 1 produit majoritaire en deux tiers de la plaque CCM analytique
SF ₃₈	AE/ME(10/1) AE/ME/H ₂ O (10/2/1) AE/H ₂ O (9/1) + 100 µL acide acétique	0,2533	Mélange complexe
SF ₃₉		0,1058	Mélange complexe
SF ₄₀		0,1036	Mélange complexe
SF ₄₁		0,0385	Mélange complexe
SF ₄₂		0,0093	Mélange complexe
SF ₄₃		0,0716	Mélange complexe
SF ₄₄		0,0185	Mélange complexe
SF ₄₅		0,0196	Mélange complexe
SF₄₆		0,056	Mélange séparable avec 1 produit majoritaire en mi- plaque CCM analytique
SF ₄₇		0,0126	Mélange complexe
SF ₄₈		0,0062	Mélange complexe
SF ₄₉		0,0256	Mélange complexe
SF ₅₀	0,0632	Mélange complexe	
SF ₅₁	0,0177	Mélange complexe	
SF ₅₂	0,0215	Mélange complexe	
SF ₅₃	0,0104	Mélange complexe	
SF ₅₄	0,0434	Mélange complexe	
SF ₅₅	0,0167	Mélange complexe	
SF ₅₆	0,0373	Mélange complexe	
SF ₅₇	0,0079	Mélange complexe	
SF ₅₈	0,02	Mélange complexe	
SF ₅₉	0,0025	Mélange complexe	
SF ₆₀	0,0102	Mélange complexe	
SF ₆₁	0,005	Mélange complexe	
SF ₆₂	0,0479	Mélange complexe	
SF ₆₃	0,0632	Mélange complexe	
SF ₆₄	AE/ME/H ₂ O (10/2/1) BAW (4/1/5) AE/H ₂ O (9/1) + 100 µL acide acétique	0,021	Mélange complexe avec traînée
SF ₆₅		0,1451	Mélange complexe avec traînée
SF ₆₆		0,0192	Mélange complexe avec traînée
SF ₆₇		0,0066	Mélange complexe

			avec traînée
SF ₆₈		0,0086	Mélange complexe avec traînée
SF ₆₉		0,039	Mélange complexe avec traînée
SF ₇₀		-	Mélange complexe avec traînée
SF ₇₁	AE/ME/H ₂ O (10/2/1) BAW (4/1/5)	-	Mélange complexe avec traînée
SF ₇₂		-	Mélange complexe avec traînée

ZEGHIB ASSIA

RESUMES EN FRANÇAIS, ANGLAIS ET ARABE

Résumé

L'investigation des activités **antioxydante** et **antiproliférative**, des extraits de *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf. et *Thymus numidicus* (Poiret), montre que cette dernière présente le **meilleur potentiel biologique** : les **extraits les plus polaires** sont les **plus antioxydants** alors que les **extraits les moins polaires** sont les **plus antiprolifératifs**.

L'**acide rosmarinique** (10,61%) et le **rosmarinat de méthyle** (44,02%), ont été purifiés de l'**extrait méthanol** de *T. numidicus*. Le **fractionnement** de l'**extrait hydro-éthanolique** de *T. numidicus*, par des solvants de polarité croissante, a permis de concentrer les **principaux composés** responsables de l'**activité antioxydante** dans la **fraction acétate d'éthyle**. Une flavone (la lutéoline, 4,54 %), un flavanol (la quercétine, 0,64 %) et deux acides phénoliques (l'**acide rosmarinique**, 25,12 % et le **rosmarinat de méthyle**, 15,53 %) ont été isolés de la **fraction acétate d'éthyle**. Toutes ces **molécules isolées** sont très actives, avec une CI_{50} aux environ de 10 µg/mL.

La **fraction dichlorométhane** de *T. numidicus*, présente le **meilleur potentiel bactéricide**, vis-à-vis des huit souches bactériennes étudiées. La **fraction aqueuse** de *T. numidicus*, est la seule à être **antivirale**, vis-à-vis de la souche de coxsackievirus B3.

L'**investigation phytochimique** de l'**extrait dichlorométhane** (antiprolifératif) de *T. numidicus*, a conduit à l'obtention d'un **précipité froid** similaire à l'acide ursolique et contenant **3 produits majoritaires**.

L'**analyse GC** et **GC/MS** de l'**huile essentielle** de *T. guyonii*, a montré qu'elle est majoritairement composée de **o-cymène** (9,69 %), **δ-terpinène** (5,73 %), **thymol** (21,18 %) et **carvacrol** (55,60 %).

L'**analyse GC** et **GC/MS** de l'**huile essentielle** de *Thymus hirtus* Willd., a montré qu'elle est majoritairement composée de **α-pinène** (9,46 %), **camphène** (5,38 %), **eucalyptol** (1,8-cinéole) (34,62 %) et **2-bornanone** (18,55 %).

L'**analyse GC** et **GC/MS** de l'**huile essentielle** de *T. numidicus*, a montré qu'elle est majoritairement composée de **thymol** (23,92%), **linalool** (17,20%), **o-cymène** (11,41%), **γ-terpinène** (10,84%), **thymol méthyl éther** (6,73%) et **carvacrol** (6,02%).

L'**huile essentielle** de *T. guyonii* a manifesté la **meilleure activité bactéricide**, vis-à-vis des huit souches bactériennes étudiées, surtout *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Mots clés : *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus numidicus* (Poiret), *Thymus hirtus* Willd., extrait, huile essentielle, activités biologiques, investigation phytochimique.

Abstract

The **antioxidant** and **antiproliferative** activities investigation of the **extracts** of *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf. and *Thymus numidicus* (Poiret) , shows that this latter species presents the best biological potential : the **most polar extracts** are the **most antioxidant** while the **least polar extracts** are the **most antiproliferative**.

The **rosmarinic acid (10.61%)** and the **methyl rosmarinate (44.02%)** were purified from the *T. numidicus* **methanol extract**. The **fractionnation** of the *T. numidicus* **hydro-ethanolic extract**, by increasing polarity solvents, allowed to concentrate the **main compounds** responsible of the **antioxidant activity** in the **ethyl acetate fraction**. A flavone (luteolin, 4.54 %), a flavanol (quercetin, 0.64 %) and two phenolic acids (**rosmarinic acid, 25.12 %** and **methyl rosmarinate, 15.53 %**) were isolated from the **ethyl acetate fraction**. **All these isolated molecules** are **very active**, with a CI_{50} in approximately of 10 $\mu\text{g/mL}$.

The *T. numidicus* **dichloromethane fraction** presents the **best bactericidal potential** towards the eight studied bacterial strains. The *T. numidicus* **aqueous fraction** is the only one to be **antiviral** towards the coxsackievirus B3 strain.

The **phytochemical investigation** of the *T. numidicus* **dichloromethane extract** (**antiproliferative one**), led to the obtaining of a **cold precipitate** similar to the ursolic acid and **containing 3 predominant products**.

The **GC and GC/MS analysis** of *T. guyonii* **essential oil** showed that it is mainly composed of : **o-cymene (9,69 %)**, **δ -terpinene (5,73 %)**, **thymol (21,18 %)** and **carvacrol (55,60 %)**.

The **GC and GC/MS analysis** of *Thymus hirtus* Willd. **essential oil** showed that it is mainly composed of : **α -pinene (9,46 %)**, **camphene (5,38 %)**, **eucalyptol (1,8-cineole) (34,62 %)** and **2-bornanone (18,55 %)**.

The **GC and GC/MS analysis** of *T. numidicus* **essential oil** showed that it is mainly composed of: **thymol (23,92%)**, **linalool (17,20%)**, **o-cymene (11,41%)**, **γ -terpinene (10,84%)**, **thymol methyl ether (6,73%)** and **carvacrol (6,02%)**.

The *T. guyonii* **essential oil** showed the **better bactericidal activity** towards the eight studied bacterial strains, especially *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

KEYWORDS : *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus numidicus* (Poiret), *Thymus hirtus* Willd., extract, essential oil, biological activities, phytochemical investigation.

المخلص

بينت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة و المثبطة لتكاثر ونمو الخلايا السرطانية المنجزة على مستخلصات (*T. guyonii*) و (*T. ciliatus*) و (*T. numidicus*) أن هذا الأخير أظهر أحسن فعالية بيولوجية : إذ تتمتع المستخلصات الأكثر قطبية بفعالية مضادة للأكسدة بينما تمتلك المستخلصات الأقل قطبية بفعالية مضادة لتكاثر الخلايا السرطانية.

تم فصل (**10,61%**) و (**44,02%**) من المستخلص الميثانولي لـ *T. numidicus*. سمحت لنا عملية التجزئة للمستخلص الهيدروإيثانولي باستعمال مذيبات ذات قطبية متزايدة، من تركيز المركبات الرئيسية المسؤولة عن الفعالية المضادة للأكسدة في طور خلات الإيثيل، إذ تم عزل فلافون (**4,54%**)، فلافونول (**0,64%**) بالإضافة إلى حمضين فينولينين :

(**25,12%**) و (**15,53%**) تعتبر كل المركبات المفصولة مركبات جد نشطة خاصة وأن تركيز التثبيط CI_{50} لا يتعدى 10 ميكروغرام/مل. أظهر طور ثاني كلور الميثان لـ *T. numidicus* أفضل نشاط مضاد للبكتيريا و هذا ضد كل السلالات. في حين لم يبدى سوى الطور المائي نشاطا مضادا للسلالة الفيروسيّة coxsackievirus B3

سمحت لنا الدراسة الفيتوكيميائية للمستخلص ثاني كلور الميثان لـ *T. numidicus* بالتحصل على راسب شبيه بحمض الأورسوليك و يحتوي على ثلاثة مركبات رئيسية.

بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي GC وكروماتوغرافيا الطور الغازي المتزاوجة مع مطيافية الكتلة GC/MS بأن الزيت الطيار لـ *T. guyonii* يحتوي أساسا على المركبات :

(**55,60%**) و (**21,18%**)، (**5,73%**)، (**9,69%**)، بينما يحتوي الزيت الطيار لـ *T. hirtus* بشكل رئيسي على المركبات التالية :

(**18,55%**)، (**34,62%**)، (**5,38%**)، (**9,46%**)، في حين يحتوي الزيت الطيار لـ *T. numidicus* أساسا على المركبات :

(**23,92%**)، (**17,20%**)، (**11,41%**)، (**10,84%**)، (**6,73%**)، (**6,02%**)، (**23,92%**)، (**17,20%**)، (**11,41%**)، (**10,84%**)، (**6,73%**)، (**6,02%**).

أظهر للزيت الطيار لـ *T. guyonii* فعالية مضادة للبكتيريا جيدة ضد كل السلالات خاصة *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

كلمات مفتاحية :

Thymus ، *Thymus guyonii* De Noe, *Thymus ciliatus* Desf., *Thymus numidicus* (Poiret) *hirtus* Willd. ، المستخلص، الزيت أساسي ، الفعاليات البيولوجية، الدراسة الفيتوكيميائية.