

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji - Laghouat



Faculté des Sciences

THÈSE DE DOCTORAT LMD

Spécialité : Chimie organique appliquée

Présentée et soutenue publiquement

Le 24/11/2020

REZZOUG MARIA ASSIA

THEME

**Etudes phytochimiques comparatives des extraits de trois
plantes locales de la famille *lamiacée***

JURY :

Monsieur Saidat Boubakeur	Président du jury	Professeur	Université de Laghouat
Monsieur Benalia Mokhtar	Examineur	Professeur	Université de Laghouat
Monsieur Fodili Mokhtar	Examineur	Professeur	Université de Djelfa
Monsieur Souilah Rachid	Examineur	Docteur	ENS Laghouat
Monsieur Gherib Abdelaziz	Directeur de thèse	Professeur	Université de Laghouat
Monsieur Bakchiche Boulanouar	Co-directeur de thèse	Docteur	Université de Laghouat

دراسات فيتوكيميائية مقارنة لمستخلصات من ثلاثة نباتات محلية من عائلة *lamiaceae*.

تتمحور هذه الدراسة حول التركيب الكيميائي وأنشطة مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات السرطان لمستخلصات الإيثانول (EE) والزيوت الأساسية (HE) لثلاثة أنواع من عائلة *Lamiaceae*: *Ocimum basilicum* L. و *Thymus algeriensis* و *Mentha spicata*، المزروعة في الأطلس الصحراوي الجزائري. كشف التحليل النوعي والكمي للمستخلصات بواسطة HPLC عن ثراء النباتات الثلاثة التي تمت دراستها بالعديد من المركبات الفينولية. يظهر التحليل الكيميائي للزيوت العطرية زيادة في النسبة المئوية للمونوتربين الأكسجيني في كل نبات. و كمركب رئيسية linalool (52,1%) و l'acétate de linalyle (19,1%) بالنسبة ل O.B ; l'acétate d' α -terpinyle (47,4%) و l'acétate de néryle (9,6%) و α -pinène (6,8%) بالنسبة ل T.A ; carvone (49,5%) و limonène (16,1%) و 1,8-cineole (8,7%) بالنسبة ل M.S. بالإضافة , جميع المستخلصات ؛ وخاصة الزيوت العطرية التي لها نشاط كبير مضاد للأكسدة. (DPPH, ABTS, FRAP et du phosphomolybdate). وجد أن تقييم النشاط المضاد للميكروبات لهذه المستخلصات ضد 8 كائنات دقيقة كان معتدلاً مع إجراءات معززة ضد البكتيريا موجبة الجرام. تحتوي المستخلصات الفينولية على نشاط مضاد للسرطان ضعيف في اختبار MTT مقارنة بالزيوت الأساسية ، تسجل هذه الزيوت قيم LD₅₀ كبيرة مقابل الخلايا السبعة التي تم اختبارها و هي تتراوح بين 279 و 1090 ميكروغرام / مل.

الكلمات المفتاحية: *Ocimum Basilicum* ، *Thymus algeriensis* ، *Mentha spicata*، زيت أساسي ، المستخلص الإيثانولي ، نشاط مضاد للأكسدة ،

نشاط مضاد للبكتيريا ، نشاط مضاد للسرطان

Résumé

Etudes phytochimiques comparatives des extraits de trois plantes locales de la famille *lamiacée* .

Le présent travail étudie la composition chimique et les activités antioxydantes, antimicrobiennes et anticancéreuses des extraits éthanoliques (EE) et des huiles essentielles (HE) de trois espèces de la famille des *Lamiacées*, *Ocimum basilicum* L, *Thymus algeriensis* et *Mentha spicata*, Cultivé dans l'Atlas algérien saharien. L'analyse qualitative et quantitative des extraits par HPLC a révélé la richesse de plusieurs composés phénolique dans les trois plantes étudiées. L'analyse GCMS des HEs montre une augmentation du pourcentage des monoterpènes oxygénés dans chaque plante. Majoritairement, le linalool (52,1%) et l'acétate de linalyle (19,1%) pour O.B ; l'acétate d' α -terpinyle (47,4%), l'acétate de néryle (9,6%) et l' α -pinène (6,8%) pour T.A ; le carvone (49,5%), le limonène (16,1%) et 1,8-cineole (8,7%) Pour M.S. Par ailleurs, tous les extraits ; et spécialement les HEs montrent des activités antioxydantes importantes (DPPH, ABTS, FRAP et du phosphomolybdate). L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits vis-à-vis de 8 microorganismes s'est révélée modérée avec des actions renforcées contre les bactéries gram-positives. Les EE possèdent une activité anticancéreuse du test MTT faible par rapport aux HEs , ces dérivés enregistrent des valeurs LD₅₀ considérables contre les 7 lignées cellulaires testées varient entre 279 et 1090 μ g / mL.

Mots clés : *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis*, *Mentha spicata*, huile essentielle, extrait éthanolique, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité anticancéreuse

Abstract

Comparative phytochemical studies of extracts from three local plants of the *lamiaceae* family

The present work studies the chemical composition and the antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of ethanolic extracts (EE) and essential oils (EO) of three species of the *Lamiaceae* family, *Ocimum basilicum* L, *Thymus algeriensis* and *Mentha spicata*, Cultivated in the 'Algerian Saharan Atlas. The qualitative and quantitative analysis of the extracts by HPLC revealed the richness of several phenolic compounds in the three plants studied. GCMS analysis of HEs shows an increase in the percentage of oxygenated monoterpenes in each plant. Predominantly, linalool (52.1%) and linalyl acetate (19.1%) for O.B; α -terpinyl acetate (47.4%), neryl acetate (9.6%) and α -pinene (6.8%) for T.A ; carvone (49.5%), limonene (16.1%) and 1,8-cineole (8.7%) For M.S. In addition, all extracts; and especially EOs show significant antioxidant activities (DPPH, ABTS, FRAP and phosphomolybdate). The evaluation of the antimicrobial activity of these extracts against 8 microorganisms was found to be moderate with enhanced actions against gram-positive bacteria. EEs have a low anti-cancer activity in the MTT test compared to EOs, these derivatives record considerable LD₅₀ values against the 7 cell lines tested vary between 279 and 1090 μ g/mL

Keywords : *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis*, *Mentha spicata*, essential oil, ethanolic extract, antioxidant activity, antibacterial activity, anticancer activity

Remerciements

Premièrement, je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Deuxièmement, je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Professeur Gherib Abdelaziz qui a accepté de m'encadrer et qui m'ont fait bénéficier de leur savoir et de leurs conseils éclairés afin de perfectionner ce travail.

Je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à mon co-promoteur Mr Bakchiche Boulanouar, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je remercie également Mr le Professeur Saidat Boubakeur pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je tiens à remercier également les membres du Jury : Le Professeur Benalia Mokhtar, le professeur Foudili Mokhtar et le Docteur Souilah Rachid qui m'ont honoré pour avoir accepté de juger ma thèse.

Je tiens à remercier profondément Mr le Professeur Ramazan Mammadov pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de métabolites secondaires au département de la biologie à l'université de Denizli en Turquie. Je le remercie de m'avoir donné confiance à travers sa modestie scientifique et ses qualités humaines. Sans oublier tous les membres de son équipe surtout Dr Ozge Kilincarslan Aksoy qui était toujours disponible pour moi. Qu'elle trouve ici mes sincères gratitude, remerciements et mon amitié.

Je dois mes profonde reconnaissance à Pr Sanaa Bardaweel Directrice de laboratoire des sciences pharmaceutiques à l'université de Amman, Jordan dont j'ai eu l'opportunité d'apprendre de nouvelles techniques et un soutien de haut niveau permet la réalisation de la partie microbiologique.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Guido Flamini de l'université de Pisa en Italie pour m'avoir aidé à réaliser les analyses chromatographiques dans son laboratoire. Qu'il trouve ici mes sincères expressions de gratitude et de respect.

Je remercie aussi les membres des équipes scientifiques et pédagogiques du laboratoire de génies des procédés. Ainsi que tous mes amis, mes collègues à l'université de Amar Thélidji de Laghouat, et toute personne qui me partage les mêmes idées, surtout ma chère soeur et amie Feriha.

Je remercie mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien et leurs encouragements. Je remercie mes beaux parents et tous les membres de famille, surtout mes frères, mes beaux frères, mes soeurs et belles soeurs.

Finalement, un grand merci du fond du coeur à mon époux «Mohamed» qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé et m'a soutenu surtout dans les moments difficiles. Un grand merci également, plein d'amour et de tendresse, pour mon petit ange «Yasmine» que Dieu la protège.

Liste des tableaux

Tableau	page
Tableau 1 : Classification botanique d' <i>Ocimum basilicum</i> .	6
Tableau 2 : Classification botanique du <i>Thymus algeriensis</i> .	8
Tableau 3 : Classification botanique de <i>Mentha spicata</i> .	9
Tableau 4 : Principales classes des composés phénoliques.	24
Tableau 5 : Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme.	26
Tableau 6 : Propriétés anticancéreuses , in vitro de quelques flavonoides.	43
Tableau 7 : Conditions opératoires de l'analyse GC/MS.	62
Tableau 8 : Conditions opératoires de l'analyse HPLC.	63
Tableau 9 : Micro-organismes utilisés pour l'activité antibactérienne.	72
Tableau 10 : Rendements des HEs obtenues par hydrodistillation.	79
Tableau 11 : Caractéristique organoleptiques des essences étudiées.	80
Tableau 12 : Densité, indice de réfraction , indice d'acide des HEs d' <i>O.basilicum</i> , <i>T.algeriensis</i> et <i>M.spicata</i> .	81
Tableau13 : Les propriété physicochimiques des HEs trouvé dans la littérature.	81
Tableau14 : Rendement d'extraction , teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les extraits phénoliques des trois plantes étudiées.	83

Tableau 15 : Composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d' <i>O. basilicum</i> et <i>T.algeriensis</i> et <i>Mentha spicata</i> .	89
Tableau16 : Composés majoritaires présents dans l'HEs des trois plantes étudiées de différents pays.	93
Tableau 17 : Les propriétés des étalons utilisés.	97
Tableau 18 : Teneur en composés phénoliques des extraits par l'analyse HPLC.	98
Tableau 19 : Composé phénoliques présents dans les trois plantes étudiées d'après des recherches.	100
Tableau 20 : Activité antioxydante des extraits phénoliques et des huiles essentielles des plantes et des standards déterminée par les tests DPPH , ABTS , FRAP et phosphomolybdate.	109
Tableau 21 : Corrélation entre les quatre tests d'activité antioxydante des extraits éthanoliques des trois plantes étudiées.	118
Tableau 22 : Activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques et des huiles essentielles des plantes étudiées contre huit micro-organismes pathogènes exprimée en valeurs MIC ($\mu\text{g} / \text{mL}$).	120
Tableau 23 : Activités antiprolifératives des extraits phénoliques et d'huiles essentielles des trois plantes étudiées sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines , temps d'exposition 48h .	123

Figure	Page
Figure 1 : Présentation d' <i>Ocimum basilicum</i> .	7
Figure 2 : Présentation du <i>Thymus algeriensis</i> .	10
Figure 3 : Présentation de la plante <i>Mentha spicata</i> .	10
Figure 4 : Monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles.	15
Figure 5 : Sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.	15
Figure 6 : Phénylpropanoïdes rencontrés dans les huiles essentielles.	16
Figure 7 : Schéma du procédé d'extraction par hydrodistillation .	17
Figure 8 : Schéma d'extraction par entraînement al vapeur .	18
Figure 9 : Les principaux aglycones des flavonoïdes .	21
Figure 10 : Structure de certains composés synthétiques.	32
Figure 11 : Principaux composés naturels (ou synthétisés) possédant des propriétés antioxydantes.	32
Figure 12 : Réduction du radical DPPH en présence d'antioxydant.	33
Figure 13 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•]	34
Figure 14 : Comparaison des parois des bactéries Gram- et Gram+.	36
Figure 15 : Différentes étapes du cancer.	40
Figure 16 : Schéma du montage d'hydrodistillation Clevenger.	51
Figure 17 : Photo du montage expérimental clevenger.	52
Figure 18 : Les résidus secs.	55
Figure 19 : Schéma illustrant l'extraction éthanolique.	56
Figure 20 : Structure de l'acide gallique.	57
Figure 21 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.	58
Figure 22 : Structure de la rutine.	59
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoïdes totaux	60
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (test FRAP).	71
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (test phosphomolybdate).	72
Figure 26 : Décongélation des lignées cancéreuses .	74
Figure 27 : Le passage des cellules.	75
Figure 28 : Structures chimiques du MTT jaune et du formazon violet dans les cellules vivantes.	76
Figure 29 : Structure chimique de la doxorubicine.	77

Figure 30 : Pourcentage des flavonoïdes dans les trois plantes étudiées.	85
Figure 31 : Corrélation entre teneur en phénols totaux et tests d'activité antioxydante.	115
Figure 32 : Corrélation entre teneur en flavonoides totaux et tests d'activité antioxydante.	116
Figure 33 : Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de <i>O.Basilicum</i> sur trois lignées cellulaires cancéreuses , temps d'exposition 48h.	124
Figure 34 : Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de <i>T.Algeriensis</i> sur trois lignées cellulaires cancéreuses , temps d'exposition 48h.	124
Figure 35 : Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de <i>M. spicate</i> sur trois lignées cellulaires cancéreuses, temps d'exposition 48 h.	125

Liste des abréviations

ABTS	[2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATB	Antibiotique
BuOH	Butanol
CHCl₃	Chloroform
CMI	concentration minimale inhibitrice
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EE	Extrait ethanolique
Et₂O	L'éther diéthylique
EtOAc	Ethyl acetate
FBS	Sérum de veau fœtal
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IC₅₀	Concentration de substrat qui inhibe 50% du radical DPPH
LD₅₀	Concentration qui produit une suppression de croissance cellulaire de 50%.
LOD	Limite de détection.
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium.
RDT	Rendement.
TCP	Teneur en composés phénoliques.

Introduction générale.	01
------------------------	----

Partie Généralités et données Bibliographiques

Chapitre I

Présentation des plantes étudiées.

I. Introduction.	05
II. La famille des <i>Lamiacées</i> .	05
II.1. Etude botanique d' <i>Ocimum basilicum</i> (Basilic).	05
II.2. Etude botanique de <i>Thymus algeriensis</i> .	09
II.3. Etude botanique du <i>Mentha spicata</i> .	08
III. Conclusion.	10
Références.	11

Chapitre II

Les substances actives : Huiles essentielles et composés phénoliques.

I. Introduction.	
II. Les huiles essentielles.	
II.1. Composition chimique des huiles essentielles.	13
• Les terpènes.	13
• Les monoterpènes.	14
• Les sesquiterpènes.	15
• Composés aromatiques.	15
• Composés d'origine diverses.	16
II.2. Les techniques d'extractions des huiles essentielles.	16
• Extraction par Hydrodistillation.	16
• Entraînement à la vapeur d'eau.	17
II.3. Méthodes d'identification des huiles essentielles.	18
• La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).	18
• Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM).	19
III. Les composés phénoliques.	19
III.1. Classification.	20
• Flavonoïdes.	20
• Anthocyanosides.	21
• Tannins.	21
• Tannins hydrolysables.	22
• Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols.	22
• Acides phénoliques et phénols simples.	22
• Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.	22
• Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.	22
• Phénols simples.	22
• Coumarines.	23
• Stilbène.	23

• Lignanes.	23
III.2. Rôle et intérêt des composés phénoliques.	25
IV. Conclusion.	27
Références.	27

Chapitre III

Généralités sur les activités biologiques.

I. Activité anti-oxydante.	30
I.1. Activité anti-oxydante et leur mécanisme d'action.	30
I.2. Teste de DPPH.	33
I.3. Test d'ABTS.	34
I.4. Test du pouvoir réducteur (Ferric reducing antioxidant power).	35
I.5. Test de Phosphomolybdate.	35
II. Activité antibactérienne.	35
II.1. Milieux de culture.	37
II.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques.	37
II.3. Notion du bactériostatique et du bactéricide.	37
II.4. Méthodes d'étude in vitro de l'activité des antibiotiques.	38
II.4.1. Méthode par diffusion en milieu gélosé et facteurs influençant la dimension de la zone d'inhibition.	38
II.4.2. Méthodes par dilution.	38
III. Activité anti-cancéreuse.	39
III.1. Cancer.	39
III.2. La cellule cancéreuse.	40
III.3. Diagnostic et traitements.	41
III.4. Phytothérapie.	42
III.4.1. Activité anticancéreuse des flavonoïdes.	42
III.4.2. Activité anticancéreuse des huiles essentielles.	44
IV. Conclusion.	44
Références.	45

Partie Expérimentale

Chapitre IV

Extraction, quantification des composés phénoliques et propriétés des huiles essentielles.

I. HUILES ESSENTIELLES.	51
I.1. Isolation des huiles essentielles.	51
I.2. Détermination des constantes physico-chimique des HEs extraites	52
I.2.1. Propriétés physiques.	53
a. Rendement d'extraction.	53
b. La densité relative à 20 °C (d_{20}^{20}).	53
c. L'indice de réfraction à 20 °C (n_D^{20}).	53
I.2.2. propriétés chimiques.	54
a. Indice d'acide I_a .	54
II. COMPOSES PHENOLIQUES.	54
II.1. Extraction des composés phénolique.	54

II.2. Rendement d'extraction et dosage des composés phénoliques.	56
III . Conclusion.	60
Références.	61

Chapitre V

Techniques d'analyse des polyphénols et des huiles essentielles.

I. Introduction.	62
II. Conditions opératoires de l'analyse GC/MS.	62
II.1. Identification des composés.	63
III. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) pour l'analyse des composés phénoliques.	63
III.1. Conditions opératoires de l'analyse HPLC.	63
IV. Conclusion.	64
Références.	64

Chapitre VI

Activités biologiques.

I.Introduction.	69
II. Activité anti-oxydante.	69
II.1. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits éthanoliques des trois plantes par le test au DPPH.	69
II.2. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits éthanoliques des trois plantes par le teste ABTS.	70
II.3. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits éthanoliques des trois plantes par le test FRAP.	70
II.4. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits éthanoliques par le hosphomolybdate.	71
III. Activité antibactérienne.	72
✓ <i>Microorganismes.</i>	72
✓ <i>Détermination de la CMI.</i>	72
IV. Activité anticancéreuse.	73
IV.1. Conditions de la culture cellulaire.	73
IV.2. MTT assay.	76
V. Conclusion.	77
Références.	78

Partie Résultats et discussion

Chapitre VII

Propriétés physico-chimiques des HEs et quantification des composés phénoliques.

I.HUILES ESSENTIELLES.	
I.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles.	79
I.2. caractéristiques organoleptiques.	80
I.3. Propriétés physicochimique des huiles essentielles.	80

II. EXTRAIS ETHANOLIQUES.	82
II.1. Rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux des extraits bruts.	82
III.Conclusion.	85
Références.	86

Chapitre VIII *Analyse GC-MS & HPLC*

I. Composition chimique des HE des trois plantes étudiées.	89
I.1. Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles extraite avec les essences étrangères.	92
• Conclusion.	95
II. Composition chimique des extraits ethanoliques des trois plantes étudiées.	96
• Conclusion.	101
Références.	104

Chapitre IX *Résultats des activités biologiques.*

I. Activité antioxydante.	108
I.1. Activité anti-radicalaire DPPH.	110
I.2. Activité antiradicalaire ABTS.	111
I.3. Test de FRAP.	112
I.4. Test du phosphomolybdate.	114
I.5. Corrélation entre teneur en polyphénols totaux et activité antioxydante.	114
II. Activité antibactérien.	118
III.Activité anticancereuse.	122
IV.Conclusion.	129
Références.	130
Conclusion générale.	138
Annexe.	

Introduction générale

De tout temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages ou cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. Ces utilisations se sont diversifiées au fil des temps pour s'adapter aux besoins de l'homme [1].

L'homme pour se protéger contre toute maladie, fait appel quotidiennement à ses systèmes de défense intrinsèques notamment son système immunitaire. Mais parfois ces systèmes de défense s'avèrent insuffisants pour venir à bout de leur vocation curative. A cet effet, l'homme a recouru à des ressources thérapeutiques en l'occurrence, celles végétales qui sont des entités vivantes ayant la capacité de produire une grande diversité de substances ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire comme, les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes...etc. Qui aident ou stimulent les systèmes de défense interne [2].

Malgré les efforts des chimistes pour la synthèse de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes [3]. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous-exploitées surtout dans le domaine thérapeutique. Certaines populations pratiquent une automédication, le plus souvent à base de tisane de plantes [4].

Plusieurs études ont montré que les plantes médicinales sont très riches en molécules à activité biologique comme les huiles essentielles et les polyphénols. Ces composés sont très répandus dans les aliments d'origine végétale et sont doués de plusieurs activités biologiques y compris les activités antioxydante, anticancéreuse et chimiopréventive. Parmi les plantes médicinales riches en ces molécules prometteuses de grande thérapeutique on trouve les plantes de la famille *Lamiaceae*. Les composés actifs trouvés dans de nombreuses plantes de cette famille.

Le romarin, le thym, le basilic et la sauge sont des membres essentiels de la famille des Lamiacées et sont parmi les plantes les plus couramment utilisées dans la médecine méditerranéenne traditionnelle, principalement pour le traitement des gastrites, de diverses infections, de dermatites, de la bronchite et de l'inflammation [5-8]. Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses

étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement par des essais bio-guidés ainsi que leur identification [9].

Notre recherche s'inscrit dans une démarche innovante, puisqu'elle vise à étudier et comparer, dans un premier temps, la composition chimique et les activités biologiques des huiles essentielles et des extraits phénoliques de *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis* et du *Mentha spicata* autochtones dans l'Atlas saharien algérien (spécifiquement dans la région de Laghouat).

Parmi les critères ayant conduit au choix de ces plantes, se trouve l'origine géographique (le climat aride et l'exposition aux rayons solaires peuvent influencer le développement des mécanismes de protection, basés sur la synthèse de métabolites secondaires spécifiques, avec des caractéristiques et des activités chimiques et biologiques originales), d'autre part, nous visons aussi l'enrichissement de la bibliographie qui comporte peu de données relatives aux études phytochimiques et même biologiques de ces trois plantes.

Dans ce contexte, Les travaux de cette thèse s'axent sur la définition de l'activité biologique des parties aériennes (en particulier la capacité antioxydante, antibactériennes et anticancéreuses des extraits phénoliques et des huiles essentielles) et sur la caractérisation chimique des molécules qui seraient responsables de ces activités.

Cette démarche a un double objectif : celui, de valoriser et d'améliorer les connaissances quasi inexistantes sur ces plantes endémiques d'Algérie, mais aussi, d'entrevoir des usages nouveaux relatives aux activités biologiques de ces plantes et à leur composition chimique par la création de produits dérivés, tels que des compléments alimentaires ou des produits cosmétiques ou pharmaceutiques.

La première partie de cette thèse est consacrée à l'étude des données bibliographiques et les généralités sur le sujet, et comprend trois chapitres : Le premier chapitre est constitué d'une description botanique des trois plantes choisies. Le deuxième chapitre est réservé à la définition des composés bioactifs (huiles essentielles et les phénols), leur classification, leurs méthodes d'extraction et leurs propriétés thérapeutiques. Dans le troisième chapitre nous expliquons les activités

biologiques étudiées tout en mettant l'accent sur le mécanisme d'action des composés bioactifs des plantes et leurs bienfaits sur la santé.

La deuxième partie est relative aux méthodes expérimentales utilisées dans cette recherche, elle est divisée en trois chapitres le premier chapitre est consacré aux méthodes d'extractions des deux composés bioactifs : des huiles essentielles avec l'étude de ces propriétés physicochimiques et les composés phénoliques avec leurs quantification. L'identification par les méthodes chromatographiques HPLC et GCMS des principaux substituants contenues dans les huiles essentielles et les polyphénols sont exposés dans le deuxième chapitre ; le troisième chapitre est consacré à la mise en évidence de l'activité antioxydante, antibactérienne et anticancéreuse des extraits recueillies des trois plantes.

Nous mettons en exergue et discutons les résultats de chacun de ces chapitres dans un chapitre associé dans la troisième partie.

A cela s'ajoute une conclusion générale dans laquelle sont résumés les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives envisagées.

Références

- [1] L Messai. Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (*artemisia herba alba*). Mémoire de Doctorat. Université Mentouri Constantine. 2011.
- [2] A Gurib-Fakim. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006.27:1–93.
- [3] N'Guessan K, Kadja B, Zirihi G N, Traoré D & Aké-assi L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*. 2009.1-15.
- [4] Dahanukar SA, Kulkarni RA & Rege NN. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian Journal of Pharmacology*. 2000.81-118.
- [5] Pop A, Muste S, Muresan C, Pop C, Salanta L. Comparative study regarding the importance of sage (*Salvia officinalis* L.) in terms of antioxidant capacity and antimicrobial activities. *Hop Med Plants*. 2013. 21:1–2.
- [6] Stević T, Berić T, Šavikin M, Soković M, Gođevac I, Dimkić I, Stanković S. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Ind Crop Prod*. 2014.55:116–22.
- [7] Paton A, Harley RM, Harley MM. Ocimum-an overview of relationships and classification. In: Holm Y, Hiltunen R, editors. Ocimum. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles. Amsterdam: Harwood Academic. 1999. p 1–38.
- [8] Simon JE, Morales MR, Phippen WB, Vieira RF, Hao Z. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: Janick J, editor. Perspectives on new crops and new uses: biodiversity and sustainability. Alexandria: ASHS Press. 1999. p 499–505.
- [9] Satyajit S, Zahid L & Alexander G. Natural products isolation, *Ed^{2ème} humana*. 2006:515.

Partie

Généralités et données Bibliographiques

Chapitre I

Présentation des plantes étudiées

I. Introduction

Une plante est dite médicinale lorsqu'un de ses organes possède des activités pharmacologiques, pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. On utilise généralement qu'une partie de la plante : la racine, la feuille, la fleur, la graine, ... la plus riche en principe actif.

Avant d'antamer l'étude chimique et biologique des huiles essentielles et des composés phénoliques des trois plantes de la famille des *Lamiacées* : *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis* et *Mentha spicata* ; il nous a paru nécessaire de présenter dans le premier chapitre les trois plantes choisies.

II. La famille des *Lamiacées*

Les *Lamiacées* constituent une famille très diversifiée avec 224 genres et environ 4000 espèces [1]. Un des traits les plus caractéristiques de cette famille réside dans le fait que plusieurs genres renferment des terpènes qui sont responsables de l'odeur aromatique de ces plantes et qui sont utilisés dans la médecine traditionnelle et dans les plats de cuisine [2]. Les *Lamiacées* sont essentiellement représentées dans le pourtour de la Méditerranée et le Sud-Ouest de l'Asie et dans les forêts tropicales. Certaines *Lamiacées* sont très connues du grand public comme les : bugles, brunelles, lamiers, lavandes, menthes, basilics, origans et marjolaines, romarins, sauges, sarriettes, épiaires, germandrées, et les thyms. Un très grand nombre des genres de la famille des *Lamiaceae* sont des sources riches en terpénoides, flavonoïdes et iridiodes, glycosylés et composés phénoliques [3].

II.1. Etude botanique d'*Ocimum basilicum* (Basilic)

Description :

O. basilicum est une plante annuelle de la famille des *Lamiacées* (Labiacée, Labiées) [4], herbacée ligneuse, feuillée, très ramifiée et parfumée.

- ✓ *La tige* : quadrangulaire, pouvant atteindre jusqu'à 1m de hauteur.
- ✓ *Les feuilles* : sont opposée, denticulées dans la partie supérieure, ovales, cunées à la base, acuminées au sommet [5]. Elles sont petites ou large et toujours très brillantes (vert pale à vert foncé).
- ✓ *Les fleurs* : bilabiées et petites, ont la lèvre supérieure découpée en quatre lobes, entourée d'une substance mucilagineuse qui se renfle dans l'eau

comme celle de la graine de lin [6]. Elles sont de couleur crème, blanche, rose ou violacée selon la variété [7], [8].

Graines : petites (fines), oblongues et marron foncé [5], la durée de germinative de cette graine est de huit ans [6].

- ✓ *Les fruits* : sont des tétrakènes renfermant chacun une seule graine marron-noire oblongue.
- ✓ *Le système racinaire* : est du type pivotant [7].

Classification :

D'après Quezel *et* Santa (1963) l'espèce de basilic appartient à :

Tableau 1 : Classification botanique d'*Ocimum basilicum* [9]

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Ocimum</i>
Espèce	<i>Ocimum basilicum</i>
Nom vernaculaire	Habak

Habitat et culture

✓ Le basilic étant une plante des pays chauds méditerranéen, introduit dans toutes les régions tropicales et subtropicales (Bulgarie, Madagascar, Italie, Comores et Maroc ...etc.) et cultivé dans les pays tempérés [10],[11].

✓ Herbe de saison chaude, son multiplication se fait par semis au printemps, vers Mars-Avril. En climat tempéré, il faut le faire en serre ou dans des pots maintenus à une température de l'ordre de 20°C. La germination se produit au bout de 4 à 7 jours. Le repiquage en pleine terre peut se faire lorsque le sol est suffisamment réchauffé. Le basilic a besoin d'un pH de 5 à 8 et d'une température plus de 15°C et une exposition abritée et cinq heures d'ensoleillement quotidien [12].



Figure 1 : Présentation d'*Ocimum basilicum* L [5].

II.2. Etude botanique de *Thymus algeriensis*

Description :

Le thym vient du mot grec *thymon* qui signifie courage, force. A une époque plus moderne, le thym était considéré comme l'«ennemi du poison» et l'on s'en servait pour la fumigation des chambres de malades [13].

Les populations de *T. algeriensis* sont réparties du sub-humide au bas aride bioclimat à des altitudes allant de 120 à 1100 m. L'espèce pousse sur des sols calcaires fertiles pauvres et se rencontre dans de petites populations dispersées, montrant différents niveaux de destruction, principalement en raison de la surexploitation et du surpâturage.

T. algeriensis est un arbuste diploïde de courte durée ($2n=42 \times 1/430$) et gynodioïque. Il se reproduit par graines et peut atteindre 20 à 50 cm de hauteur. Les feuilles sont opposées et linéaires / lancéolées (6 – 12 mm). Les fleurs, avec des bractées ovales et une corolle rose violacée ou pourpre blanchâtre, sont petites (5 – 7 mm). Des plantes hermaphrodites (mâles fertiles) et femelles (mâles stériles) peuvent être présentes dans la même population. La floraison a lieu entre avril et juin. L'espèce est considérée comme un croiseur comme la plupart des thymes et souvent pollinisées par les abeilles [14].

Classification :

D'après Quezel et Santa (1963) l'espèce de thym appartient à :

Tableau 2 : Classification botanique du *Thymus algeriensis* [9].

Règne	Plantae
Division	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus algeriensis</i> Boiss. & Reut
Nom vernaculaire	Djertil

Habitat et culture

T. algeriensis est une espèce endémique du Maroc, d'Algérie, de Tunisie et de Libye. *T. algeriensis* est largement utilisé frais ou séché, dans les aliments, comme herbe culinaire et en médecine populaire pour ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antifongiques.

À l'heure actuelle, la demande d'huiles essentielles pour cette plante est augmentée pour la parfumerie, la cosmétique et la médecine sans travail d'amélioration pour sélectionner les cultivars appropriés. La matière en vrac provient de populations naturelles fortement affectées par les pressions anthropiques (surpâturage, défrichement, etc). Par conséquent, les populations ont été gravement épuisées et fragmentées en raison de la collecte excessive et de la destruction de l'habitat. L'espèce a tendance à être présente dans des métapopulations dispersées, souvent de petite taille [15].



Figure 2 : présentation du *thymus algeriensis*.

II.3. Etude botanique du *Mentha spicata*

Description

C'est une plante vivace sauvage ou cultivée, elle est souvent subspontanée. Les feuilles sont sessiles, opposées, à limbes gaufré muni de dents pointus, elles sont lancéolées de couleurs vert vif sur les deux faces [16]. Les fleurs, comportent un calice en forme de clochette, glabre ou ciliée, divisé en 5 dents linéaires, une corole violet pâle, rose ou blanche, 4 étamines saillantes de taille identique. La floraison a lieu de juillet à septembre [17].

Classification

Parmi plusieurs classifications il existe celle qui est faite par [18] ; présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification botanique de *Mentha spicata* [19].

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha spicata</i>
Nom vernaculaire	<i>Naanaa</i>

Habitat et culture

Le genre *Mentha* se trouve dans les régions tempérées d'Eurasie, d'Afrique, les parties nord, ouest et est de l'Europe, ainsi qu'en Turquie et en Russie. La menthe est utilisée comme plante médicinale et aromatique depuis l'Antiquité, dans les cultures occidentales et orientales.

Des études sur les valeurs thérapeutiques de la menthe et des huiles de menthe ont été rapportées ; ceux-ci sont stomachaux, carminatifs, antispasmodiques, stimulants, anesthésiques locaux, anti-inflammatoires, diurétiques, anthelmentiques, antibactériens, antifongiques et antioxydants. Les usines de menthe produisent un certain nombre d'huiles essentielles commercialement valables à savoir. Huile de menthe verte (huile de *M. spicata*), huile de menthe poivrée (huile de *M. piperita*), huile de menthe de maïs (huile de *M. canadensis*) et huile de Pennyroyal (huile de *M.*

pulegium). Les rendements en huile des plantes de menthe varient considérablement selon les saisons, les conditions culturelles, la situation géographique et la composition génétique (espèces, sous-espèces, cultivar) [20].



Figure 3 : présentation de la plante *Mentha spicata*.

IV. Conclusion

Les *Lamiacée* particulièrement retrouvées sur le pourtour méditerranéen. Elles sont connues et utilisées en thérapeutique depuis des centaines d'années. Les propriétés et utilisations des *lamiacées* sont très nombreuses, en usage médicinal ou culinaire surtout. Les *lamiacées* donnent de nombreuses plantes médicinales, dont toutes les parties peuvent souvent être exploitées. Plusieurs d'entre-elles peuvent être transformées en huile essentielle. Nous présentons dans le chapitre II un rappel bibliographique sur les huiles essentielles et les composés phénoliques.

Références

- [1] G Debuigue. *Dictionnaire des plantes qui guérissent*. Paris. Larousse. 1972.256p.
- [2] E Guenter. *The essential Oils, Vol. III, Oil of Marjoram*. Huntington. New York. Robert E. Kriger Publishing co. Inc. 1972-1974. 519.
- [3] Lee S J, Umanok, Schibamotot, Lee k.G. Identification of Volatils composants in basil (*Ocimum basilicum L.*) And thyme Leaves (*thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 2005. 91: 131 -137.
- [4] Hurtel M J. *Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles*. Copyright 2000.
- [5] Pousset L J. *Plantes médicinales d'Afrique : comment les reconnaître et les utiliser ?* Ed. La calade. (2004). UE .P : 287 (187-188).
- [6] Riaz M., Qamar S, Choudhary F.M. et Pack. J, *Sci. Ind – Res.*1999. 6 :332.
- [7] Arabicio. Et Bayram E. The effect of nitrogen and different plant density on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum L.* (Basil). *Asian Network for Scientific Information*. 2004.3(4): 255-262.
- [8] Koudjega K. Développement de stratégies de gestion intégrée de la fertilité des sols pour le basilic (*Ocimum basilicum L.*) sur les exploitations de Darégal Equatorial. *Mémoire d'Ingénieur Agronome*, IFDC Afrique / ESA –UL. 2004.P : 96
- [9] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, Tome II. *Edition CNRS*, Paris in French.1963.
- [10] Schauenberge P. Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes. *Ed. Ferdinand*. Paris 2006 .P : 396
- [11] Hubert R. Les plantes aromatique et huiles essentielles à Grasse, Quatrième partie : les *Lamiacée*, Les basilics''*Ocimum ssp*''.'Botanique- culture-chimie- production et marché'' ; Ed. L'Harmattan, France (paris). 2007. P : 414
- [12] Bezanger L, Beauquesne L, Pinkas M et Torck Metotroutin F. *Plantes médicinales des régions tempérées*. Ed Maloine. 1990.
- [13] Nait Slimane D, Zaddi S. Effet de l'association de deux huiles essentielles de *Thymus algeriensis* (Boiss et Reut) et d'*Origanum glandulosum* (Desf.) sur *Scherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Mémoire de Fin de Cycle en Vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat. Université Abderrahmane MIRA. Bejaia.2012.

- [14] El Hadj Ali I B, Zaouali Y, Bejaoui A, & Boussaid M. Variation of the Chemical Composition of Essential Oils in Tunisian Populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (*Lamiaceae*) and Implication for Conservation. *Chemistry & Biodiversity*. 2010. 7(5) :1276–1289.
- [15] Ben El Hadj Ali I, Guetat A, & Boussaid M. Chemical and genetic variability of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (*Lamiaceae*), a North African endemic species. *Industrial Crops and Products*. 2012. 40 :277–284.
- [16] Abidjan C.L. 11^{ème} Symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales –Grasse .*Springer-Verlag France*. 2010 .8 :55-62.
- [17] Teuscher E, Anton R et Lobstein A .Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles : Edition Tec et Doc, Lavoisier. 2005. P310-318.
- [18] Barchan A, Bakkali M, Arakrak A .et Laglaoui A. Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie* .2016.14:89-76.
- [19] Benabdallah A. Etude écophysiologique, développement et importance des plantes médicinales du genre *Mentha* dans le parc national d'El-Kala (Nord -Est- Algérie). Thèse de doctorat en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences, filière Biologie Végétale .2016. p.41-54.
- [20] Şarer E, Toprak S. Y, Otlu B, & Durmaz R. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Mentha spicata* L. subsp. *Spicata*. *Journal of Essential Oil Research*. 2011. 23(1): 105108.

Chapitre II

Les substances actives :

Huiles essentielles

et composés phénoliques

I. Introduction

Les substances actives sont des composés chimiques synthétisés par les plantes (métabolites secondaires) ; exercent des fonctions de défense contre les prédateurs et les agents pathogènes et possèdent des propriétés biologiques et thérapeutiques. Dans cette recherche, on s'intéresse à l'étude des propriétés des huiles essentielles et les composés phénoliques dans les plantes choisies.

II. Les huiles essentielles

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celui-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) [1].

Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires [2], [3].

Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante. Néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques [4].

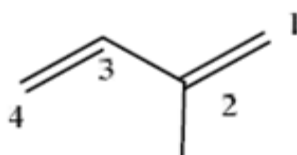
II.1. Composition chimique des huiles essentielles

Sur le plan chimique, les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène) [5].

- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans

leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'unités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Les tetraterpènes sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ont pour formule générale : $(C_5H_8)_n$ ou n peut être de 9 à 30 ; Les terpénoides sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) [6].



Isoprène (2méthylbuta-1,3-diène)

- Les monoterpènes

Sont volatils, entraînables à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HE, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène, o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). À ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique :

- Alcools : géraniol, menthol.
- Aldéhydes : géraniol, citronellal, sésényl.
- Cétones : carvone, menthone, β -vétinone.
- Esters : acétate de géranyle, acétate de linalyl, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle
- Peroxydes : ascaridol, allicine [7].

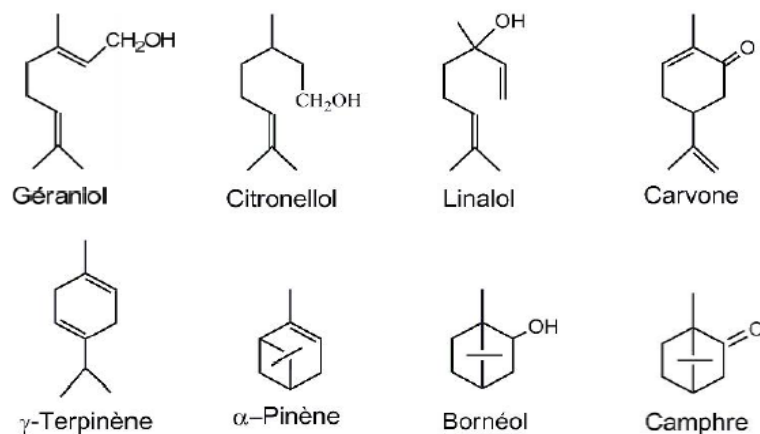


Figure 4 : Monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles.

- Les sesquiterpènes

il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnésol [8].

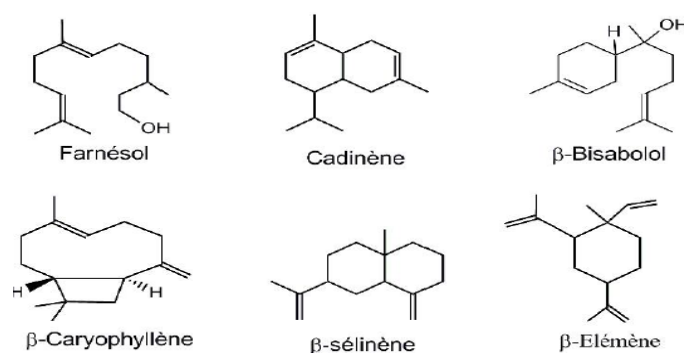


Figure 5 : Sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.

- Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. La biosynthèse par voie phénylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Également, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins représentés dans l'HE que les terpènes,

néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae : (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) [8].

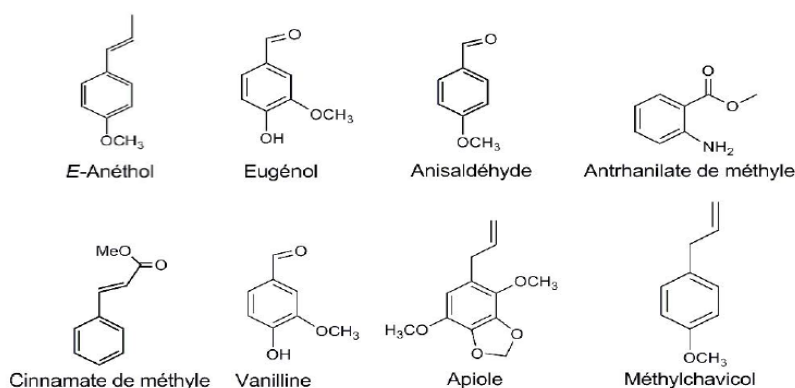


Figure 6 : Phénylpropanoïdes rencontrés dans les huiles essentielles.

- Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés).

Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînables par la vapeur d'eau [8].

II.2. Les techniques d'extractions des huiles essentielles

- Extraction par Hydrodistillation

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité.

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, et comme les HE sont insolubles dans l'eau mais solubles dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles [9].

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 azeotropique. 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 azeotropique « 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, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation [10].

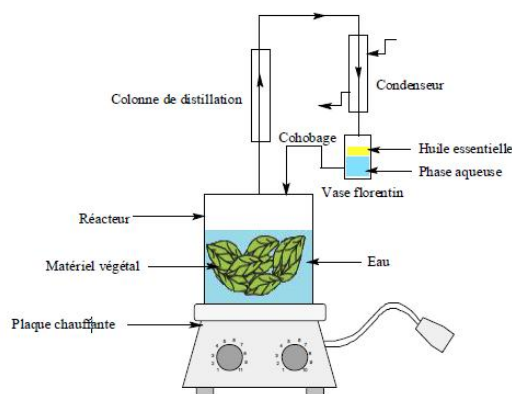


Figure 7 : Schéma du procédé d'extraction par hydrodistillation

- Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les

composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits [11].

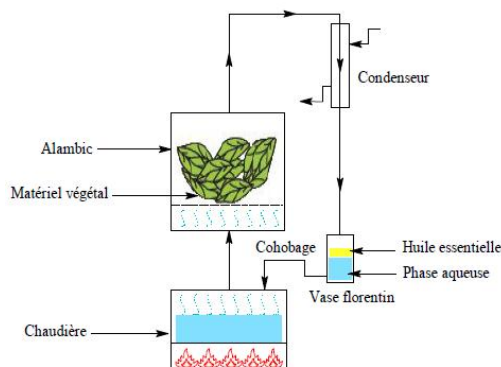


Figure 8 : Schéma d'extraction par entraînement al vapeur.

II.3. Méthodes d'identification des huiles essentielles

- La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit [12].

La CPG est aussi une méthode d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (DSM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60%. En effet, le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantification réelle avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique [13].

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température programmée (indice de rétention) [14].

- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux de composés de référence, contenu dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales [15].

Dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles [16],[17].

Il existe d'autres méthodes d'analyse, qui ont pour objet l'identification qualitative et quantitative, des différents constituants d'une huile essentielle on cite : l'HPLC, l'RMN, l'IR.

III. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytonutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales [18]. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la

lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes [19].

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables [20].

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) [21]. Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base [22].

III.1. Classification

- Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils sont formés d'un squelette de base à 15 carbones ($C_6-C_3-C_6$). Ces composés existent sous forme d'aglycones (génines) ou sous forme de glycosides et plus de 4000 structures sont connues à ce jour [23]. On peut remarquer ici que :

- Les *flavones* sont des 2-phénylchromones, incolores ;
- Les *isoflavones* sont des 3-phénylchromones, beaucoup moins répandues que les flavones ;
- Les *flavonols* sont des 3-hydroxyflavones. Ce sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glycosides ;
- Les *flavanones* sont des 2,3-dihydroflavones ;
- Les *chalcones* sont des isomères des flavanones avec ouverture du noyau pyronique entre les positions 1 et 2 ;
- Les *anthocyanidols* sont des dérivés réduits des flavonols avec formation d'un oxonium ;
- Les *flavanes* ou catéchines sont également des produits de réduction, au moins formellement, des flavonols.

Les flavonoïdes les plus étudiés appartiennent aux groupes des flavones, des flavonols, en particulier, la quercétine et son hétéroside la rutine, mais aussi à ceux

des flavanes, flavanones et chalcones. [23]. Les principaux aglycones sont représentés dans la figure 9. Tous les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central [24].

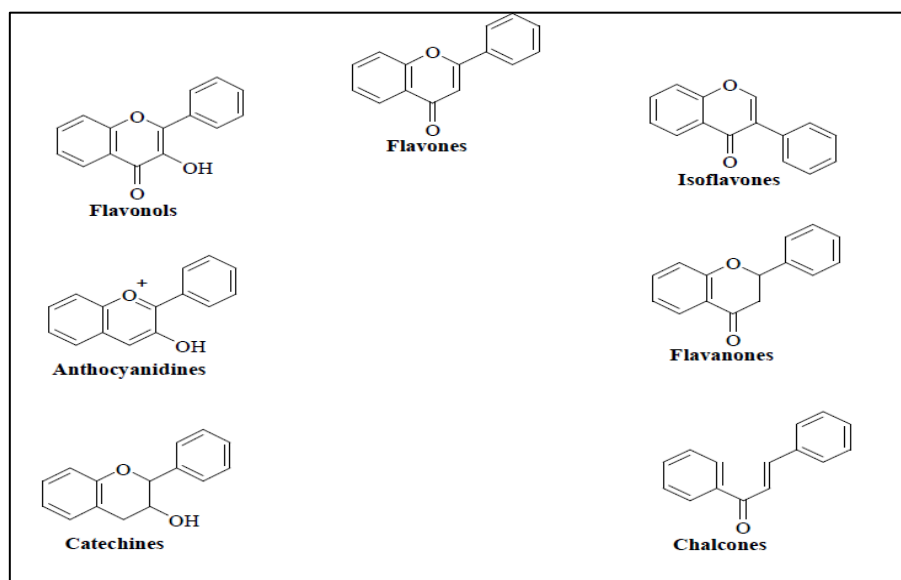


Figure 9 : Les principaux aglycones des flavonoïdes.

- Anthocyanosides

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits [24]. Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) [25].

- Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [26].

Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [27]. On

distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- Tannins hydrolysables

Ils sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins [24].

- Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères [21].

- Acides phénoliques et phénols simples

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

- Acide phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

Les acides phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique [24].

- Acide phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

La plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents [24]. Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation [28].

- Phénols simples

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae,

Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes [18],[28].

- Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C_6-C_3 , appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone [29]. Et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [28].

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5- diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) [24].Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactives [28].

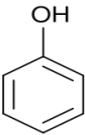
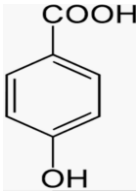
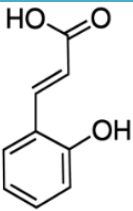
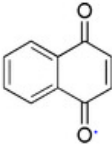
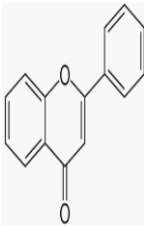
- Stilbène

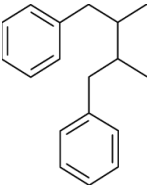
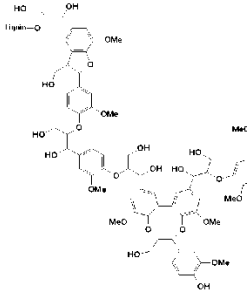
Les membres de cette famille possèdent la structure $C_6-C_2-C_6$ comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides [30].

- Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C_6-C_3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles.

Tableau 4 : Principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Structures de base	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples		Catechol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques		p-Hydroxybenzolque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique coumarines		acide Caféique scopolétine, esculétine	Pomme, P. de terre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones		Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénes		Revératol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoides		Quercétine, kaempférom Cynidine, pélargonidine Catéchine, epicatéchine Naringénine Déidzéine	Fruits, legumes , fleur Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois

$(C_6-C_3)_2$	Lignanes		Pénorésinol	pin
(C_6-C_3)	Lignines		Entérodriol	Bois, Fruits A noyau
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés		Procyanidol	Raisin rouge, Kaki

III.2. Rôle et intérêt des composés phénoliques

- Chez les végétaux

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux; dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini [31].

- Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes . Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protèges nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères) [31]. Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme [31].

Polyphénols	Activités biologiques
Acide phenols	Antibactérienne ; antiulcéreuses, antiparasitaires, antifongiques , antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires , antiinflammatoires , antiparasitaires analgésique , et anti oedémateuse
Flavonoides	Antitumorales ,antiparasitaires,antibactériennes,anticarcinogènes,antiinflammatoires,analgésiques ,hypotenseurs,antivirales,diurétiques, ostéogènes,antioxydantes,antiatherogéniques,antithrombotiques,antiallergiques
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux,antioxydants
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur la collagène,antioxydants ,antitumorales, antifongiques , anti inflammatoires
Tanins	Antioxydantes
Lignanes	Antiinflammatoires , analgésiques
Saponines	Antitumorales , anticancérigènes
Phytostérols	Agent de protection contre le cancer du colon chez l'homme

IV. Conclusion

Les principes actifs des plantes médicinales sont des substances contenues dans le végétal. Les médicaments puisent leur principe actif du végétal en l'isolant et en le synthétisant. La synergie des composés chimiques (molécules actives) donne à la plante toutes ses propriétés biologiques et thérapeutiques dont nous montrerons certains d'entre eux dans le chapitre suivant .

Références

- [1] Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 2010. 25 : 282-290.
- [2] Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern. *J. Food. Microbiol.* 2004 .94: 223-253.
- [3] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils. *Rev: Food. Chem. Toxicol.* 2008. 46: 446–475.
- [4] Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.* 2007. 1163: 2-24.
- [5] Croteau R, Kutshan TM, Lewis N G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchana B, Gruissem W, Jones R. (eds), *biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of plant Physiologists.* 2000.1408 : 1250-1268.
- [6] Bruneton J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 1999. P: 1120.
- [7] Bruneton J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 2008. P: 1188.
- [8] Zhiri A, Baudoux D. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg. 2005. P : 8.
- [9] Franchomme P, Pénéol D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 1990. P: 445.
- [10] Dastmalchi K, Damien Dorman H J, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis L.*) extract. *Food. Sci. tech LWT.* 2008. 41 (3).391-400.
- [11] Chaintreau A, Joulain D, Marin C, Schmidt C O, Vey M. Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *J Agric. Food. Chem.* 2003. 51 : 398-403.
- [12] Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, d'Acompara Zellner B, Costa R, Rubiolo P. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.* 2008.23 : 382-391.

- [13] Lawrencet Brian M. Essential oils: from agriculture to chemistry. *J.Aromatherapy*. 2000. 10: 82-98.
- [14] Adams R P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publ.Corp., Carol stream, IL. 2001. P: 445.
- [15] Lianga Y Z, Xieb P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B*. 2004. 812: 53-70.
- [16] Senatore F, Arnold N A, Piozzi F. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. Var. *simplicifolia* Boiss. Growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A*. 2004 .1052 : 237-240.
- [17] Daniel M. Medicinal Plants: chemistry and properties. .Ed: SCIENCE PUBLISHERS. 2006. P: 59,77.
- [18] Gee J M. et Johnson I T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 2001.8: 1-182.
- [19] El Gharas H. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* .2009. 44(12): 2512-2518.
- [20] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris.2003.
- [21] Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème édition.Tec&Doc. Paris .1999.
- [22] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris.2003.
- [23] Gert F et Stephan M. Metabolit engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001.12: 155-160.
- [24] Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2ème édition. Tec & Doc. Paris.1993.
- [25] Brouillard R, Figueiredo P, Elhabiri M et Dangles O. Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables. In phytochemistry of fruit and vegetables proceeding of phytochemical society of Europe. Oxford, UK. Clarendon Press. 1997. 30-49.
- [26] Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*. 1996. 59: 205-215.

- [27] Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* .1991. 30: 3875-3883.
- [28] Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.1999. 12(4): 564-582.
- [29] O’Kennedy R et Thornes R D. (ed) .Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y. 1997.
- [30] Crozier A, Clifford M N, Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.2006.
- [31] François Muanda Nsemi. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine – Metz .2010. Français. ⟨NNT : 2010METZ011S⟩.

Chapitre III

Généralités sur les activités biologiques

I. Activité anti-oxydante

Introduction

Au cours de ces dernières années, avec l'expansion d'une grande partie du commerce des produits alimentaires ont de plus en plus recours à l'ajout d'importants additifs aux aliments ; certains additifs sont devenus indésirables en industrie pour améliorer la conservation des aliments comme conservateurs et antioxydants [1].

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toute substance présente a concentration faible par rapport celle du substrat oxydable et qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologique [2]. Un antioxydant alimentaire idéal doit être soluble dans les graisses, efficace a faible dose et non toxique, n'entraînant ni coloration ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques et stable dans les produits fini [2].

Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies.

I.1. Activité anti-oxydante et leur mécanisme d'action

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. [3]. La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense.

Les espèces réactives de l'Oxygène réagissent avec de nombreuses molécules, ce qui entraîne certaines modifications de ces dernières. Elles perdent alors leur activité au sein de la cellule et cela a un impact sur le fonctionnement cellulaire physiologique.

L'oxydation d'un aliment est due à molécules appelées : **radicaux libres**. Ces radicaux libres sont en fait des **molécules instables** car elles ne répondent plus à la règle de l'octet. En effet, les forces initialement exercées ne sont plus les mêmes, par conséquent la stabilité de l'atome se trouve également modifiée. On a alors des radicaux libres qui vont chercher à respecter les règles de l'octet, pour se faire les radicaux libres vont chercher un électron sur la couche externe d'un autre atome ou d'une autre molécule. Qui conduit par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Selon Gazzani et son équipe, (1998) [4], un antioxydant peut être défini comme "toute substance qui est en petites quantités, capable d'empêcher ou de retarder l'oxydation de substrat et ces antioxydants sont à des concentrations plus basses que les matières oxydables à protéger ". Les antioxydants peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Ce dernier sont soit synthétisés par le processus du métabolisme dans le corps humain ou sont complétés par d'autres sources naturelles, et l'activité des antioxydants naturels dépend du mécanisme d'action et leurs propriétés physiques et chimiques [5].

Au bout des dernières années les antioxydants commerciaux utilisés étaient des Antioxydants synthétiques (figure 10) tels que le Butylhydroxyanisole (BHA), Butylhydroxytoluène (BHT), le Tertiobutylhydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG) car son stable et peu coûteux, mais en raison des risques toxicologiques potentiels de ces molécules antioxydantes, leurs utilisations sont remises en cause et des recherches d'alternatives naturelles sont effectuées [6].

De nombreux polyphénols d'origine végétale : vitamine E (d-tocophérol), flavonoïdes et flavones, caroténoïdes et vitamine C (acide L-ascorbique) sont des antioxydants naturels disponibles (Figure 11). Certains d'entre eux (β -carotène, lycopène...) sont utilisés comme colorants [7].

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [8].

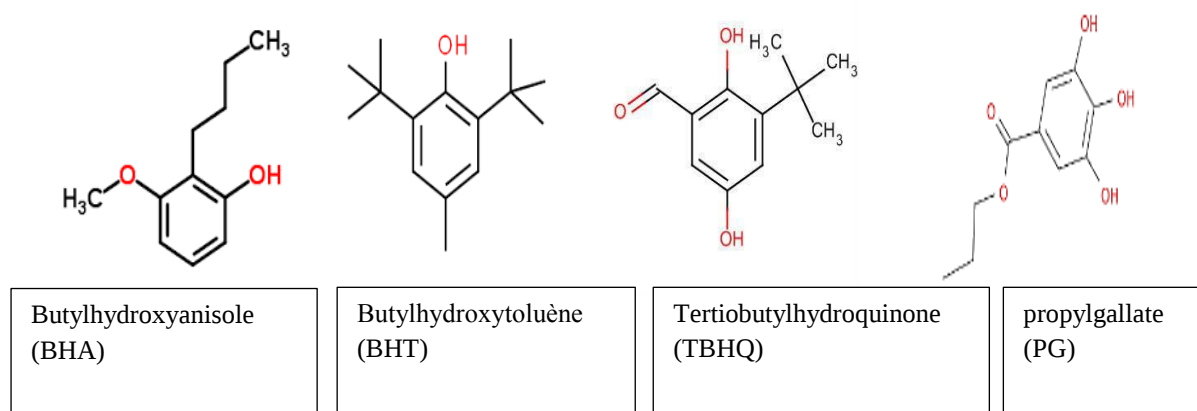


Figure 10: Structure de certains composés synthétiques.

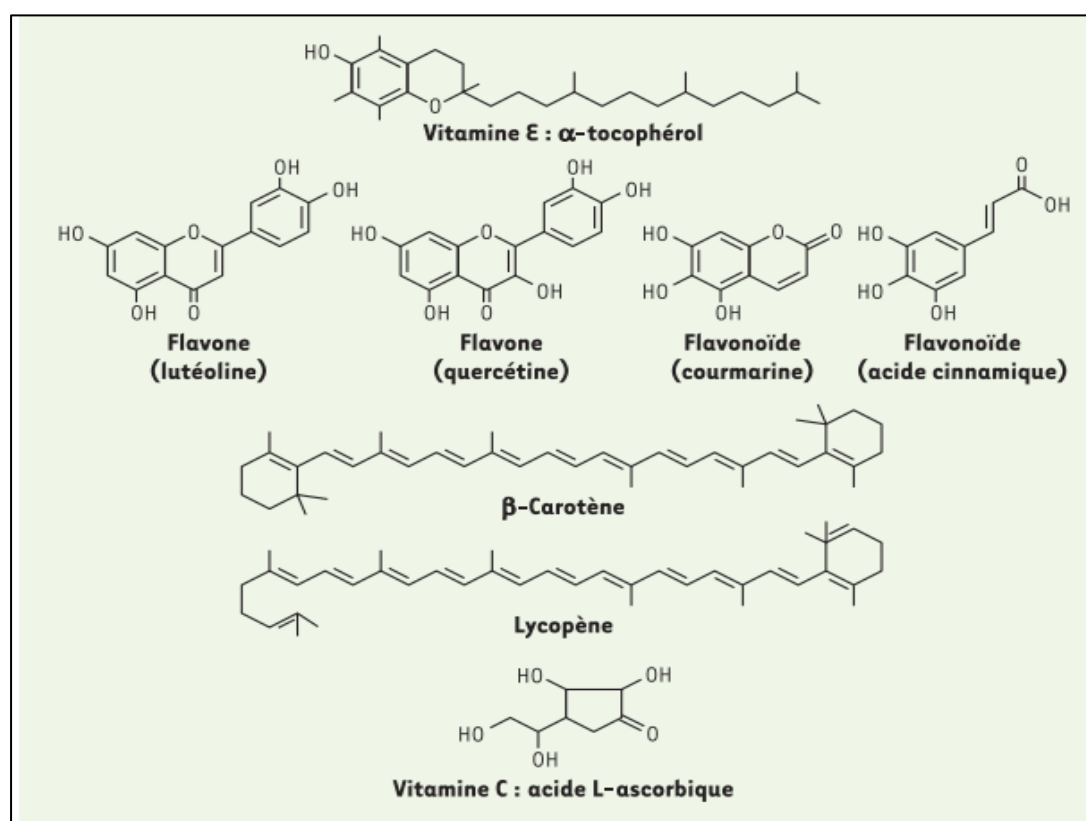


Figure 11 : Principaux composés naturels (ou synthétisés) possédant des propriétés antioxydantes [7].

Afin d'utiliser les HEs et les composés phénoliques en tant qu'antioxydants alimentaires, il convient d'évaluer leur efficacité antioxydante. dans ce contexte nous nous sommes donc intéressés a l'étude de l'activité antioxydante des extraits des trois plantes (*O.basilicum* ; *T.algeriensis* et *M.spicata*) par le test du radical libre DPPH, le

test du radical cation ABTS ,test du FRAP (Ferric reducing antioxidant power) et le test du phosphomolybdate.

I.2. Teste de DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre stable qui agit en se combinant avec d'autres radicaux libres. Ce composé a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité des composés. Il s'agit d'un test largement utilisé car il est simple et relativement reproductible [9]. Le DPPH présente une coloration violette sombre mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes sa couleur vire vers le jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire [10], ce test est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R₂-NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH• réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur (Figure 12). C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie [11].

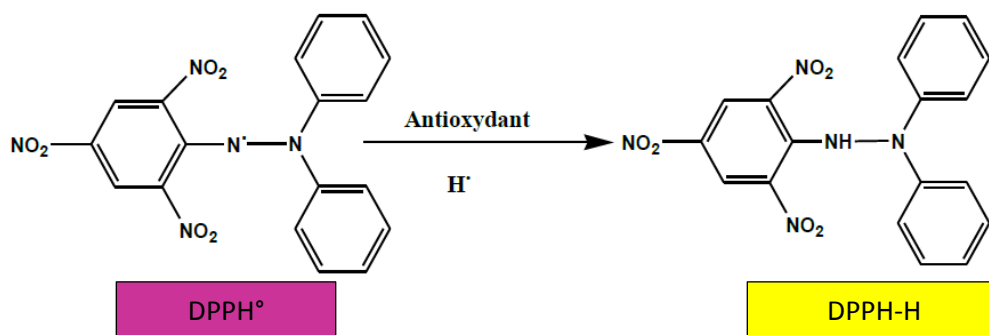


Figure 12 : Réduction du radical DPPH en présence d'antioxydant.

L'évaluation de l'activité antioxydante peut être exprimée ensuite par mesurer le paramètre EC 50% qui correspond la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH °. Plus la valeur EC₅₀% est petite plus la molécule est antioxydante.

Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu lors de la réaction, en particulier les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH•, type de solvant, pH).

Le test s'effectue à température ambiante afin d'éviter tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles [12].

I.3. Test d'ABTS

Le radical cation de l'acide 2,2-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre, de coloration bleu vert possédant une forte absorption dans l'intervalle 600-750 nm, ce qui permet un suivi relativement simple par spectrophotométrie.

Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. D'autres oxydants peuvent être utilisés, tels que le dioxyde de manganèse (MnO_2). Ce radical est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants classiques de Type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron [13].

L'ABTS absorbe à 734 nm et lors qu'il est réduit, il vire du vert foncé au vert clair. Le pouvoir antioxydant d'un échantillon sera proportionnel à la variation de la couleur du radical [14]. Le potentiel donneur d'hydrogène d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre $EC_{50\%}$ qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale d'ABTS °.

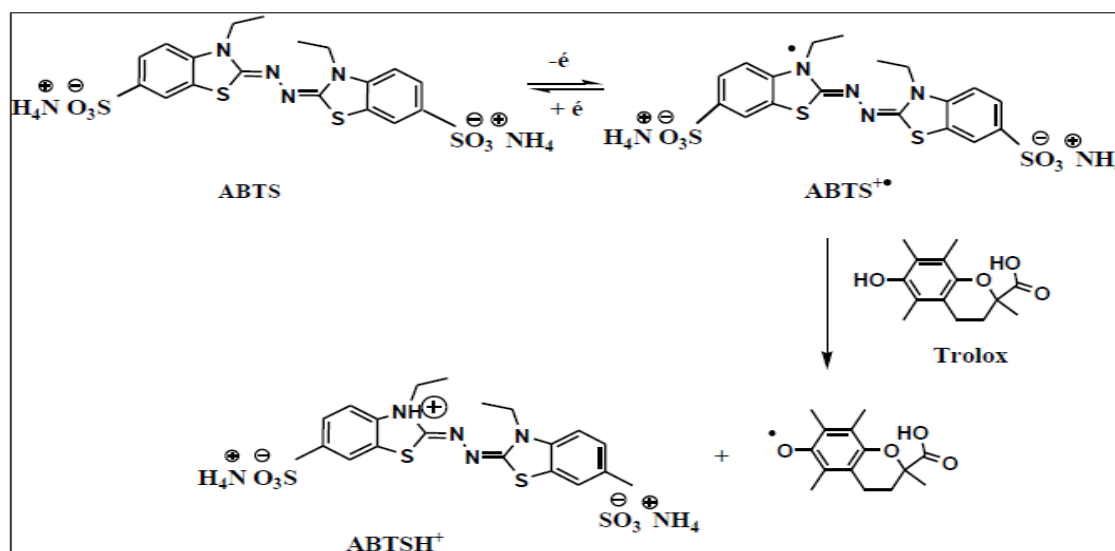


Figure 13 : Formation et piégeage du radical $ABTS^{+\bullet}$ par un antioxydant donneur de $H^\bullet$

I.4. Test du pouvoir réducteur (Ferric reducing antioxidant power)

Le pouvoir réducteur des échantillons a été déterminé selon le procédé d'Oyaizu, 1986 ; dont le principe de ce test est basé sur la réaction chimique suivante [15].



La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox [16] ; Le pouvoir antioxydant des extraits est comparé à la vitamine C comme antioxydante synthétique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [17].

I.5. Test de Phosphomolybdate

L'analyse de Molybdate Phosphate est un essai direct qui on emploi principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatique.

La méthode de Prieto et autres a été employée pour évaluer la capacité réductrice des extraits phénoliques et d'H.E des plantes [18]. Cette méthode est basée sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V) en présence de l'antioxydant. Cette réduction, se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre à un pH acide détectable dans le visible à 695 nm. Le potentiel antioxydant est exprimé en termes de capacité antioxydante équivalente d'acide ascorbique (AEAC).

II. Activité antibactérienne

Un microbe, ou micro-organisme, fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microbes sont indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments

ainsi que des composants pharmaceutiques et industriels. D'un autre cote, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Enfin les microbes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires [19].

Elles présentent de nombreuses formes : coques (diplocoques, amas, chaînette) bacilles (droits, incurvés spiralés). Ces formes sont dues à la structure de la paroi peptidoglycane et au mode de septation propre à chaque espèce bactérienne.

Les bactéries peuvent être groupées en deux catégories selon la méthode de coloration de Gram, méthode qui tient son nom du bactériologiste danois Hans Christian Gram. Le protocole consiste à utiliser une coloration au violet de gentiane puis une décoloration à l'alcool-acétone. En raison de leur épaisse paroi de peptidoglycane (Figure14), les bactéries Gram positif garde la coloration violette. Les bactéries Gram négatif, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. Elles seront révélées avec de la fuscine et apparaitront teintées en rose.

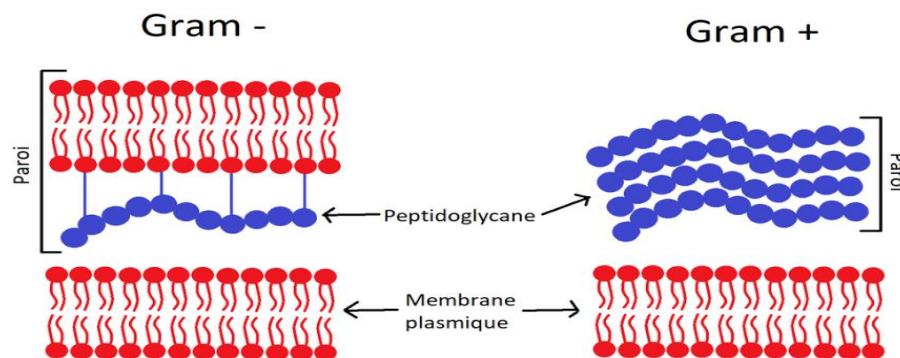


Figure 14 : Comparaison des parois des bactéries Gram - et Gram+

Actuellement, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe à cause d'une utilisation anarchique, inadéquate et abusive des antibiotiques en santé humaine et animale. L'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels pose un grave problème de santé publique. Ces agents infectieux multi résistants sont néfastes surtout chez les sujets vulnérables tels que les enfants, les vieillards et les personnes immunodéprimées. La problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques car il est important de trouver de nouveaux agents antimicrobiens

naturels en se référant aux plantes utilisées dans le traitement de maladies infectieuses en médecine traditionnelle [20].

II.1. Milieux de culture

Un milieu de culture est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc), d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance (sang, protéines, hémoglobine, vitamines). Ils sont de nature solide, semi-solide ou liquide.

Parmi les milieux de culture, on distingue :

- Les milieux d'isolement qui sont le plus souvent solides et de composition simples pour permettre le développement de plusieurs espèces bactériennes.
- Les milieux sélectifs qui favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres.
- Les milieux d'identification permettent de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d'une bactérie pour l'identifier.

II.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes [21].

II.3. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide [22].

- **L'effet bactériostatique**

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'y a plus des germes microbiens visibles [23].

- **L'effet bactéricide**

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture [23].

II.4. Méthodes d'étude *in vitro* de l'activité des antibiotiques

II.4.1. Méthode par diffusion en milieu gélosé et facteurs influençant la dimension de la zone d'inhibition

A partir d'une source quelconque (dépôt en surface ou dans un puits, disque de papier buvard préimprégné), un antibiotique diffuse dans un milieu de culture gélosé en réalisant un gradient de concentration. Après une phase de latence durant laquelle la diffusion de l'antibiotique progresse, la multiplication des bactéries va se produire. Une compétition s'installe alors entre la diffusion de l'antibiotique à partir de la source et la croissance des bactéries. La dimension de la zone d'inhibition sera déterminée par la distance que la concentration inhibitrice d'antibiotique pourra parcourir avant que soit atteinte une certaine densité microbienne. L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est un procédé largement répandu du fait de sa simplicité. Cependant, la qualité des résultats peut varier en fonction de plusieurs paramètres qu'il importe de maîtriser par une standardisation des méthodes. [24], [25].

II.4.2. Méthodes par dilution

Selon plusieurs auteurs [24-29].

Les méthodes par dilution permettent une meilleure estimation quantitative de l'activité antibiotique.

- *Dilution en milieu gélosé*

La méthode de dilution en milieu gélosé Mueller Hinton nécessite l'incorporation de chaque concentration d'antibiotique dans le milieu liquéfié de manière à avoir une dilution au dixième de l'antibiotique dans la gélose. Après solidification, 1 à 10 µl de l'inoculum correspondant à chaque bactérie testée, sont déposés en spot sur la surface de la gélose. La CMI est définie par la concentration minimale d'antibiotique ne laissant subsister aucune ou, au plus, une à trois colonies après 18 h d'incubation à 37°C [25].

- *Dilution en milieu liquide (bouillon)*

Les méthodes de dilution en milieu liquide (bouillon Mueller Hinton) sont réalisées dans des tubes (macro méthode) ou dans des plaques de micro titration (micro méthode) [25].

Les microméthodes sont plus adaptées à la pratique de l'antibiogramme, grâce à une automatisation possible de la préparation des dilutions d'antibiotiques et de la lecture des CMI.

- *E-test*

L'E-test tire profit des avantages du test par diffusion (rapidité et simplicité) et du test par dilution (obtention d'une valeur quantitative de la sensibilité). Des languettes contenant chacune un antibiotique spécifique sont disposées sur le milieu de culture.

Les languettes sont graduées afin d'indiquer la CMI de l'antibiotique pour la bactérie étudiée. [25].

III. Activité anti-cancéreuse

Le cancer représente un problème majeur de santé publique. Il constitue la première cause de mortalité dans le monde entier. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 13 millions de nouveaux cas de cancer, dont 8 millions de décès, sont enregistrés chaque année à l'échelle internationale. Par conséquent, elle estime que cette maladie fera 84 millions de morts entre 2005 et 2015 si aucune mesure n'est prise.

III.1. Cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome [30]. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses [30], [31].

Il est à noter qu'en Algérie la situation est alarmante, les adolescents et les jeunes adultes âgés entre 15 et 39 ans sont de plus en plus affectés par le cancer dont la consanguinité, l'alimentation et l'environnement sont les facteurs les plus incriminés.

Les localisations les plus importantes de ces cancers sont le nasopharynx, le sang, le côlon, le rectum et le sein chez la femme [32].

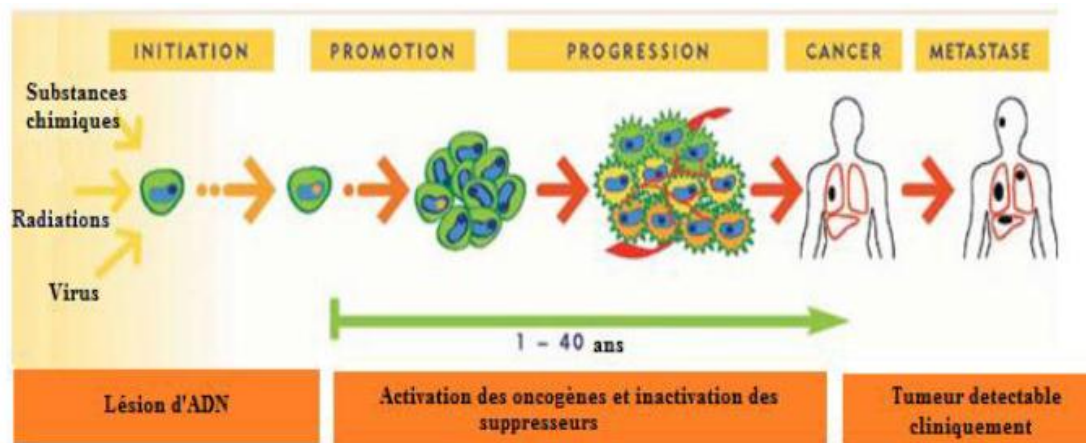


Figure 15 : Différentes étapes du cancer [33].

Les cancers diffèrent selon les caractéristiques des tumeurs: tumeur bénigne, maligne ou métastatique, et aussi selon leurs origines tissulaires. Selon le tissu touché, on peut subdiviser les cancers en 3 groupes [34].

III.2. La cellule cancéreuse

La cellule cancéreuse va au cours de son développement acquérir une série de capacités que ne possèdent pas les cellules normales. En 2000, R. Weinberg et D. Hanahan ont suggéré que l'apparition de cellules cancéreuses passe par l'acquisition d'au moins six propriétés [35].

- Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération : Normalement, les cellules ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus particulier mais dans les tumeurs, les cellules n'ont plus besoin de ce signal à cause de l'expression accrue et continue des gènes de la prolifération cellulaire.
- Insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération cellulaire.
- Abolition de l'apoptose ou mort cellulaire programmée. En cas de stress ou d'anomalie ne pouvant pas être éliminée, une cellule normale se suicide en utilisant l'apoptose. Les cellules tumorales ont inactivé tous ces mécanismes pour mieux survivre.
- Capacité proliférative illimitée : le nombre usuel de divisions cellulaires pour une cellule humaine est de 50 à 60, après quoi elle cesse de pouvoir se diviser. Les cellules tumorales continuent de se diviser sans limite visible grâce à l'activité de la

téломérase qui est fortement active dans toutes les cellules cancéreuses. Les cellules deviennent immortelles.

- Capacité de susciter l'angiogenèse. Les cellules tumorales (et la tumeur) ont un besoin important en oxygène et en nutriments pour survivre. Elles vont donc stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'alimenter la tumeur.
- Acquisition d'un pouvoir invasif. Les cellules tumorales sont capables de passer à l'intérieur d'un vaisseau sanguin afin d'être transportées dans un autre organe où elles vont générer une seconde tumeur.

De manière générale, les cancers résultent de mutations de l'ADN de certaines cellules, mais des facteurs génétiques et des agents extérieurs comme les cancérogènes physiques (UV et les rayonnements ionisants), chimiques et biologiques (virus du papillome humain, virus de l'immunodéficience humaine, schistosomiase, Hépatite C et Hépatite B) tendent à accroître de manière importante l'apparition des cancers. Le tabagisme, la consommation d'alcool, la consommation insuffisante de fruits et de légumes ainsi que le vieillissement ont une incidence directe avec l'apparition des cancers. De plus, on estime que 5 % à 10 % des mutations génétiques à l'origine d'un cancer sont héréditaires. Plus globalement, c'est la conjugaison de ces différents facteurs qui entraînent l'apparition de cancers.

III.3. Diagnostic et traitements

Aujourd'hui encore, la majorité des cancers sont diagnostiqués à un stade avancé et sont incurables, d'où la nécessité de développer de nouvelles techniques de plus en plus précises pour détecter les cancers le plus précocement possible. Les recherches actuelles s'orientent vers l'imagerie moléculaire avec le développement de sondes capables de détecter les stades précoces de la progression tumorale et de visualiser les métastases de taille inférieure au millimètre. Ces sondes reconnaissent des processus biologiques spécifiques des cancers et permettent de les imager au moyen de techniques d'imagerie médicale de plus en plus performantes [36].

Les principaux moyens de traiter un cancer sont : [37]

- la chirurgie : elle permet l'ablation d'une tumeur ou des tissus lésés. C'est le principal mode de traitement des tumeurs solides, localisées.

La radiothérapie : la tumeur est irradiée par des rayons X ou γ afin de détruire les cellules tumorales. Elle est souvent utilisée en association avec d'autres thérapies.

- Les traitements biologiques : ils utilisent des substances endogènes. Par exemple, l'immunothérapie renforce les défenses immunitaires contre les cellules tumorales.
- Les traitements hormonaux : ils agissent sur la vitesse à laquelle les cellules tumorales grossissent, se multiplient ou meurent. C'est une forme particulière de chimiothérapie qui agit sur le système endocrinien et qui est utilisée pour le traitement de cancers hormono-dépendants.
- Les greffes de la moelle osseuse : il ne s'agit pas d'un traitement direct mais elles sont parfois utilisées pour renforcer le système de production des cellules sanguines.
- La chimiothérapie : il s'agit de l'utilisation de substances pharmacologiques pour tuer les cellules tumorales. L'utilisation de la chimiothérapie anticancéreuse dépend du type de cancer à traiter. Plusieurs agents anticancéreux avec des mécanismes d'action différents sont généralement combinés pour augmenter l'efficacité du traitement, et éviter des phénomènes de résistance. L'inconvénient principal des composés utilisés est le manque de sélectivité qui entraîne de nombreux effets secondaires [38].

III.4. Phytothérapie

La phytothérapie consiste à utiliser des plantes comme médicaments pour rétablir et conserver le corps en bon état. Plus de 80 % de la population mondiale l'utilisent pour les divers problèmes de santé [39]. Plusieurs études scientifiques ont confirmés les bienfaits des plantes médicinales dans la guérison ou le soulagement de plusieurs maladies y compris le cancer. En effet, un nombre importants d'études *in vitro* ont montré que les extraits bruts, aqueux ou hydro-alcooliques, de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses [40-42].

III.4.1. Activité anticancéreuse des flavonoïdes

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse [43]. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Par exemple, les hépatocytes synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment des monooxygénases, telle que les cytochromes P450) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférases, sulfo transférases...). Ces enzymes convertissent leurs substrats en espèces hydrolysables

facilement excrétées hors des cellules. Ces enzymes sont stimulées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, et aussi sous l'action des isothiocyanates (dérivés des glucosinolates) [44]. Plusieurs études *in vitro* ont montré l'effet antiprolifératif et cytotoxique des flavonoïdes vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses ainsi qu'*in vivo* (Tableau 6). En plus, l'effet anticancéreux des flavonoïdes observé *in vitro* a été confirmé par plusieurs études épidémiologiques. Ainsi, il a été démontré que la consommation d flavonoïdes diminue le risque et l'incidence de plusieurs types de cancers à savoir le cancer du sein [45],[46] ; le cancer du poumon [47] , le cancer de la prostate [48] , le cancer de l'estomac [49] et le cancer du rectum [50] .Ces études ont montré que les composés polyphénoliques peuvent inhiber les différents stades du cancer (initiation, promotion et progression) en déclenchant la cascade proapoptotique par augmentation de l'expression de certains composants apoptotiques .

Tableau 6 : Propriétés anticancéreuses, *in vitro* et *in vivo* de quelques flavonoïdes.

Flavonoids	Cibles	Actions	Références
Quercétine Kaempférol Apigénine Lutéoline	Cellules Jurkat K, MDA-MB-231	-Mort par apoptose des cellules Jurkat T -Inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231 xénogreffées dans des souris et inhibition de la croissance des tumeurs	[51]
Quercétine	Cellules cancéreuses SK-Br3,MDA-MB 453 , HeLa .	Activité atiproliférative et arrêt de cycle cellulaire en phase G1	[52]
Quercétine Finétine Myricétine Naringine	Cellules cancéreuses HEP2 et CK2	Effet cytotoxique	[53]
rutine	Cellules leucémiques murines WHI-3	Inhibition de la croissance des cellules WEHI-3 a des souris BALBC	[54]
Kaempférol Kaempférol-3-O-D glucoside Naringénine	Cellules cancéreuses MCF-7	Activité atiproliférative	[55]

III.4.2. Activité anticancéreuse des huiles essentielles

L'action anti tumorale des HEs est liée à l'activation des cibles moléculaires menant à la mort de la cellule cancéreuse sans altérer les cellules normales. Un grand nombre d'études suggèrent que les constituants des HE, tels que le carvacrol, constituent une nouvelle classe de drogues anticancéreuses très frappantes dans la régression des tumeurs avec une toxicité limitée [56].

IV. Conclusion

Les huiles essentielles et les composés phénoliques jouent un rôle très important, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies liées au stress oxydatif ; expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments ; compte tenu de l'importance de ces composés, nous les avons extraits de la plante et étudions leurs propriétés, nous présentons la méthode utilisée dans la section suivante.

Références

- [1] Chemat F, Fabiano-Tixer A S, Hellal A, Boutekedjiret C, Femandez X. Activités chimiques et biologiques des HE, In Chemat F and Femandez X. (Eds), La chimie des huiles essentielles. Ed Vuibert .Paris.2012 . pp 212-213.
- [2] Ouis N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de Coriandre, de Fenouil et de Persil. These de doctorat.Université d'Oran 1.Algerie. 2015.
- [3] Beaudeux J L, Durand G. Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives (2e ed.). Médecine sciences publications / LAVOISIER, Année 9/2011.
- [4] Gazzani G, Papetti A, Daglia M , Berte F, & Gregotti C. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsome and the effect of thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998. 46(10), 4123-4127.
- [5] Misra K, Dhillon G S, Brar S K, & Verma M. Antioxidants. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. 2014. pp 117-138. Springer New York.
- [6] Amarowicz R, Naczek M, & Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 48(7) : 2755-2759.
- [7] Marc F, Davin A, Deglene-Benbrahim L, Ferrand C , Baccaunaud M , & Fritsch, P. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences*. 2004. 20(4) :458–463.
- [8] Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 2003 .108.
- [9] Brand-Williams W, Cuvelier M, and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* .1995 . 28(1) :25-30.
- [10] F Otmani. Étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*haloxylon scoparium* pomel de la région de Naâma.Mémoire de Master. Université Abou Bekr Bel kaid. Tlemcen. 2014.

- [11] Alger M. Polymer science dictionary. 1st ed. London: *Elsevier Applied Science*. 1989.
- [12] Salah N, Miller N, Paganga G, Tijburg L, Bolwell G and Riceevns C. Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995. 322(2) :339-346.
- [13] Nadal B. Synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les Rayonnements ionisants, Thèse de doctorat Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences, Spécialité Chimie Organique .Université Paris SUD XI. p.134-148.
- [14] D O Kim, S W Jeong, and C Y Lee. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*. 2003. 81 :321–326.
- [15] A Manallah. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Magister.Université Ferhat Abbas.Setif. 2012.
- [16] N Bougandoura, N Bendimerad. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie. B- Sci. Agron. Biol*. 2013. 9 : 14–19.
- [17] V L Singleton and J A Rossi. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. Jan 1965 . 16(3):144–158.
- [18] P Prieto, M Pineda, M Aguilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*.1999. 269 : 337-341.
- [19] Nicklin J, Graeme K-Cook, Paget R T, Killingtons R. Essentiel en microbiologique .Berti édition .paris. 2000. P : 3,75.
- [20] Saffiedine Karima. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Soutenue publiquement le 10/12/2015. Université de Sétif

- [21] Singh S B, Barrett J F. Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 2006.71: 1006-1015.
- [22] Haddouchi F, Lazouni H, Ahammer K A, Carson C F, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl. Microbiol.* 1999 .86:985-990.
- [23] Muanda F N. Identification de Polyphenols, Evaluation de leur Activité Antioxydante Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. 2010. P 239.
- [24] Vandepitte J, Engbaek K, Piot P. Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire. Genève : Organisation Mondiale de la Santé. 1994 :117.
- [25] Ducharme M P, Gimenez F, Decroix M O, Ferreira E, Martineau P, Massias L. Généralités sur les antibiotiques par voie systémique : classification, mécanismes d'action, spectre d'activité, prévention de l'iatropathologie. Dans : Association nationale des enseignants de Pharmacie clinique et thérapeutique, eds. Pharmacie clinique et thérapeutique. 2ème édition. Paris : Masson, 848-73.
- [26] Le Minor L, Veron M. Bactériologie médicale. 2ème édition. Paris : Flammarion. 1989. 298-306.
- [27] Alzoreky N S, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol* .2003. 80:223-30.
- [28] Zampini I C, Vattuone M A, Isla M I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. *J Ethnopharmacol* .2005 .102:450-6.
- [29] Berahou A , Auhmani A , Fdil N , Benharref A , Jana M , Gadhi C A. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *J Ethnopharmacol* 2007.112:426-9.
- [30] Macdonald F , Ford C.H.J , Casson, A G , Molecular biology of cancer. BIOS Scientific Publishers (Oxford). 2003.p 277
- [31] Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological Reviews*. 2003. 83 :337-376.
- [32] Hamdi Cherif M, Mahnane A , Laoumri S , Zaidi Z , Boukharouba H , Cherka D , Rakeb M , Kara L , Ayat A. Le cancer à Sétif 1986-2010, Algérie: Incidences, tendances et survie. Registre de cancer de Sétif.2013. <http://www.registre-cancer-setif.com/images/frf2.pdf>

- [33] Béliveau R, Gingras D. Green tea: Prevention and treatment of cancer by nutraceuticals. *Lancet* 364, 1021-1022. Types de cancers. 2004.
- [34] Aimé-Genty N. La cellule. Dictionnaire encyclopédique. Edition Vuibert (Paris).1997. 231p.
- [35] Lopez-Lazaro M , Willmore E A , Austin C. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutation Research*. 2010.696:41-47.
- [36] Madonna S. Innovation moléculaire à visée thérapeutique : conception, synthèse et évaluation des propriétés anticancéreuses de nouveaux dérivés du (N-(5-méthyl)-quinoléin-8- ol) amine N-substitués. Thèse de Doctorat: Chimie Organique. Marseille : Université de la Méditerranée Aix-Marseille II. France. 2010. p201.
- [37] Dufort S. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers. Thèse de Doctorat : Biologie cellulaire. Grenoble. Université de Grenoble. France. 2010. p150.
- [38] Pottier A. Conception, synthèse et évaluation pharmacologique de pyrrolo [3,4-b] Quinoleines condensées, ligands potentiels de l'ADN. Thèse de Doctorat Pharmacochimie. Lille .Université de Lille. France. 2003.p 238.
- [39] Farnsworth N K, Kass C J. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. *Bulletin de l'OMS* .1986. 66 :159.
- [40] Jo K J , Cha M R , Lee M R , Yoon M Y , Park H R. Methanolic extracts of *Uncaria rhynchophylla* induce cytotoxicity and apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. *Plant Foods for Human Nutrition* 2008 .63 : 77-82.
- [41] Ray R B, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P, Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Cell Cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis. *Cancer Research*. 2010 .70 : 1925-1931.
- [42] Rakhi S, Daman S, Dwarakanath B S, Madhu C. Inhibition of Human Cervical Cancer Cell Growth by Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2011.1-13.
- [43] Galleano M, Calabro V, Prince P D, Litterio M C, Piotrkowski B, Vazquez-Prieto M A, Miatello R M, Oteiza and Fraga P I. Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012. 1259: 87–94.

- [44] Ames B N, Gold L S and Willett W C. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 1995.92: 5258–5265.
- [45] Bosetti C, Spertini L, Parpinel M, Gnagnarella P, Lagiou P, Negri E, Franceschi S, Montella M, Peterson J, Dwyer J, Giacosa A, La Vecchia C. Flavonoïds and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005.14 :805-808.
- [46] Fink B N , Steck S E , Wolff M S , Britton J A , Kabat G C , Gaudet M M , Abrahamson P E , Bell P , Schroeder J C, Teitelbaum S L , Neugut A I , Gammon M D . Dietary flavonoïd intake and breast cancer survival among women .2007.
- [47] Le Marchand L, Murphy S P, Hankin J H, Wilkens L R, Kolonel L N. Intake of flavonoïds and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* .2000.9 : 154-160.
- [48] Knekt P , Kumpulainen J , Jarvinen R , Rissanen H , Heliovaara M, Reunanen A , Hakulinen T , Aromaa A. Flavonoïds intake and the risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002.76, 560-568.
- [49] Garcia-Closas R , Gonzalez C A , Agudo A , Riboli E . Intake of specific carotenoïds and flavonoïds and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* .1999 .10 : 71-75.
- [50] Arts I C , Hollman P C , Feskens E J . Cathechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001 :74, 227-232.
- [51] Chen D, Dou Q P. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* .2008.9 :1196-1206.
- [52] Jeong J H, An J Y, Kwon Y T , Rhee J G , Lee Y J . Effects of low dose quercetin: cancer cellspecific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry* .2009 :106, 73-82.
- [53] Durgo K , Vuković L , Rusak G , Osmak M , Franekić Čolić J. Effects of Flavonoïds on Glutathione Level, Lipid Peroxidation and Cytochrome P450 CYP1A1 Expression in Human Laryngeal Carcinoma Cell Lines. *Food Technology & Biotechnology* .2007.45 : 69-79.

- [54] Lin J P , Yang J S , Lu C C , Chiang J H , Wu C L , Lin J J , Lin H L , Yang M D , Liu K C , Chiu T H , Chung J G. Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response *in vivo*. *Leukemia Research* .2009. 33 : 823-828.
- [55] Susanti D , Sirat H M , Ahmad F , Ali R M , Aimi N , Kitajima M. Antioxidant and cytotoxic flavonoïds from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. *Food Chemistry* . 2007. 103 : 710-716.
- [56] Bouyahya A , Abrini J , Bakri Y , & Dakka N. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*. 2016.

Partie

Expérimentale

Chapitre IV

Extraction , quantification
des composés phénoliques
et propriétés des huiles
essentielles

I. HUILES ESSENTIELLES

I.1. Isolation des huiles essentielles

L'expérience d'extraction d'huiles essentielles a été réalisée au Laboratoire de génie des procédés de l'Université Ammar Telidji à Laghouat par la méthode d'hydrodistillation. Cette méthode est assurée grâce à un appareil de type Clevenger (Figure 16 et 17), où 100 g de matière végétale sont introduites avec 3 L d'eau dans un ballon de 2 L. Après installation et fermeture du montage, la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur. La durée totale de l'extraction est estimée à 4 h (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'HE). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. On la sépare de celui-ci par décantation. Elle est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée dans des vials de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière.

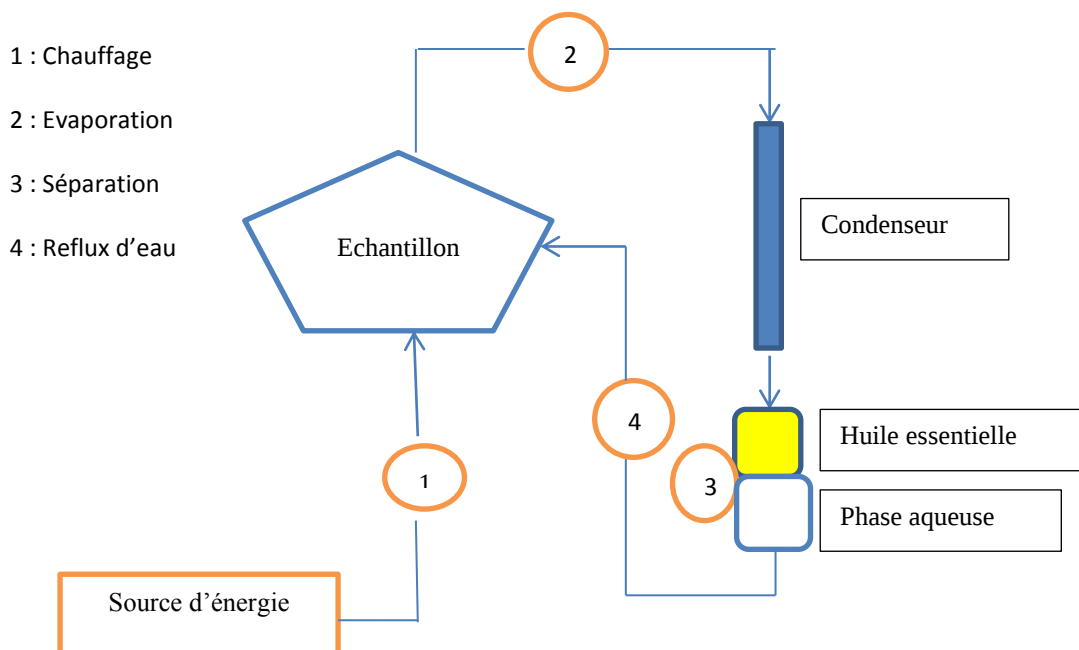


Figure 16 : Schéma du montage d'hydrodistillation Clevenger.



Figure 17: Photo du montage expérimental clevenger.

I.2. Détermination des constantes physico-chimique des HEs extraites

La sécurité d'emploi des produits cosmétiques contenant des HE est en grande partie liée à la qualité des matières premières mises en œuvre et à la formulation du produit fini.

Pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, présenter des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon satisfaisante.

Les HEs sont caractérisées par leurs propriétés physiques (densité, indice de réfraction) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide,) permettant d'évaluer la nature des composés organiques présents dans l'essence.

Nous avons évalué les propriétés physico-chimiques des HEs de *O. basilicum*, *T. algeriensis*, *M. spicata* suivant la pharmacopée européenne [1] et la commission française de normalisation [2]. Les essais sont répétés trois fois.

I.2.1. Propriétés physiques

a. Rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pourcentage (%).

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} = \frac{M_{\text{HE}}}{\text{MVS}} \times 100$$

Où :

Rdt_{HE} : Rendement en huile essentielle (%) ;

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g) ;

MVS : Masse de la matière végétale sèche (g).

b. La densité relative à 20 °C (d_{20}^{20})

La densité relative à 20°C est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. La densité relative à est calculé par la relation suivante :

$$d_{20}^{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - M_0)$$

d_{20}^{20} : Densité relative à 20 °C

m_0 : Masse de densimètre vide en g

m_1 : Masse de densimètre rempli d'eau en g

m_2 : Masse de densimètre rempli d'huile essentielle en g

c. L'indice de réfraction à 20 °C (n_D^{20})

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'H.E maintenue à une température constante , Cet indice est mesuré a 20°C et rapporté a la raie D du sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$).

$$n_D^{20} = n_D^T + 0,0004 \times (T - 20)$$

n_D^{20} : Indice de réfraction à 20 °C

n_D^T : Indice de réfraction obtenue à la température de laboratoire

T : Température de laboratoire

0,0004 : Coefficient de correction

I.2.2. propriétés chimiques

a. Indice d'acide I_a

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

0,1 g d'H.E solubilisé dans 20 ml d'éthanol le mélange est dosée par une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium KOH/EtOH (0,005 M) en présence de l'indicateur coloré la phénolphthaléine jusqu'à la solution vire au rose. L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$I_a = 56,11 (V \times C_{\text{KOH}}) / m$$

I_a : Indice d'acide.

56,11 : Masse molaire de KOH en g/mol.

V : Volume de la solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium en ml.

C_{KOH} : Concentration de la solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium en M.

m : Masse d'huile essentielle prise en g .

II. COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. Extraction des composés phénolique

Cette parie est réalisé dans le laboratoire de métabolites secondaires de de l'université de Pamukkale en Turquie .

Cette étape consiste à extraire le maximum des substances actives contenues dans les plantes en utilisant l'éthanol comme solvant organique. Les parties aériennes (feuilles) des plantes séchées ont été pulvérisées. Chaque 15 g d'échantillon broyé a été placé dans un Erlenmeyer séparé. Ensuite, 100 ml d'éthanol ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés dans un bain-marie à 55 ° C pendant 6 h. La séparation du

mélange d'extraction du résidu a été réalisée par filtration à travers du papier filtre Whatman n ° 1.

Chaque résidu de plante a été extrait de nouveau en triple avec de l'éthanol. Après filtration, les portions ont été mélangées. Le solvant résiduel dans les extraits éthanoliques a été éliminé sous pression réduite à 48–49 ° C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor IKA VB 10, Allemagne). L'eau dans les extraits a été lyophilisée en utilisant un lyophilisateur (Thermo Savant Modulyo D, USA) pendant 8 h à - 50 ° C et 0,040 mbar ; les résidus secs (figure 18) sont pesés puis repris dans l'Ethanol ou dans le DMSO 1% pour le test antibactérien.



Figure 18 : Les résidus secs

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma ci-dessous (Figure 19)

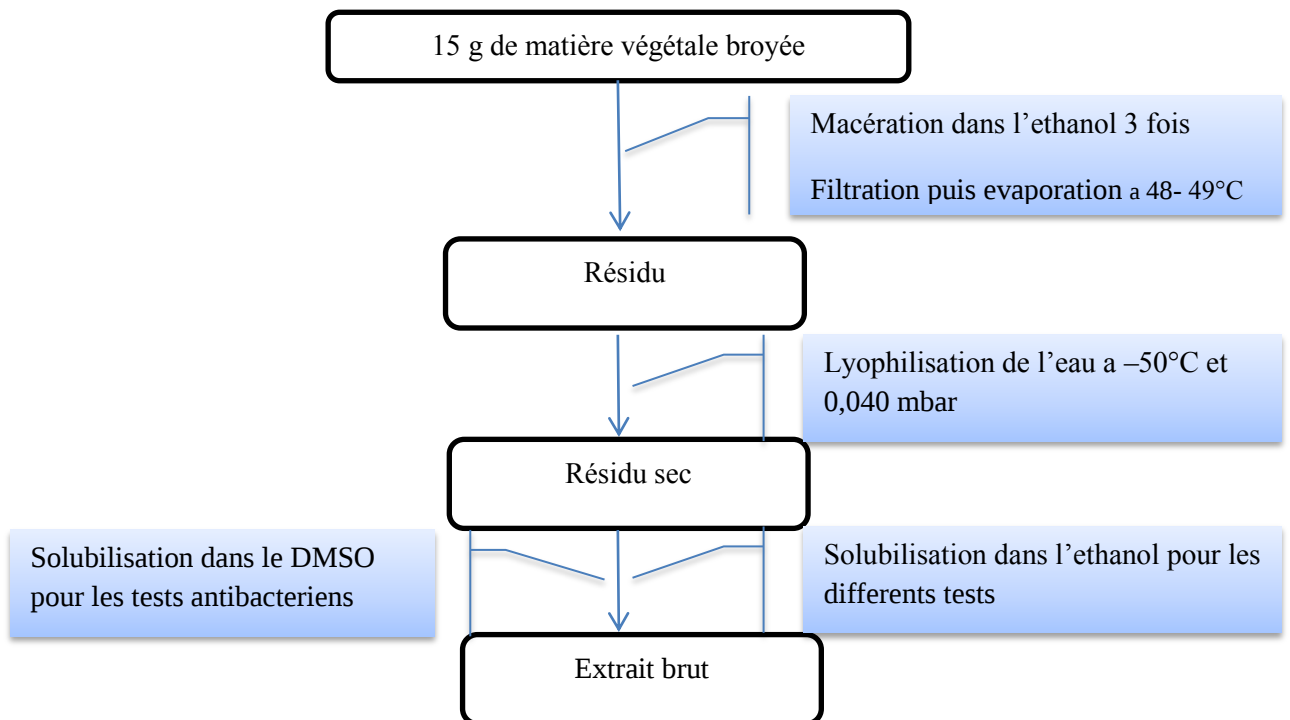


Figure 19 : Schéma illustrant l'extraction éthanolique.

II.2. Rendement d'extraction et dosage des composés phénoliques

✓ Calcul de rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut.

PA : poids de la plante sèche en poudre.

✓ Dosage des phénols totaux

• Principe

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur

jaune constitué d'un mélange de deux acides: acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire, réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 20). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche en poudre d'extrait (mg EAG/g extrait).

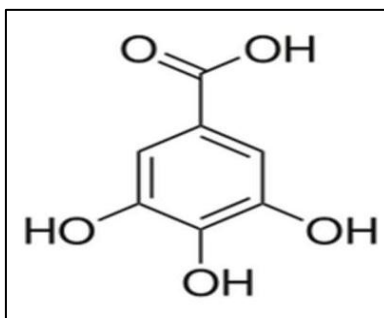


Figure 20 : Structure de l'acide gallique.

- **Protocol expérimentale**

La teneur phénolique totale a été déterminée avec le réactif Folin-Ciocalteu en utilisant la méthode décrite par Singleton et al. [3].

En bref, à 200 μ l de chaque échantillon (trois répétitions), 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu à 10% (v / v) et 800 μ l de Na_2CO_3 (7,5%, p / v) ont été ajoutés et incubés à 25 °C pendant 30 min. L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN 2120 UV). Une solution éthanolique d'acide gallique a été testée en parallèle pour obtenir une courbe d'étalonnage.

La teneur en composés phénoliques des échantillons analysés est calculée par la formule suivante:

$$TCP = C. V / m$$

C: Concentration de l'extrait ;

V: Volume de solvant utilisé pour l'extraction ;

m: Masse en grammes de la prise d'essai.

Les essais sont répétés trois fois.

- **Courbe d'étalonnage**

A partir d'une solution mère de l'acide gallique de 0,1 mg/ml, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 0,01 à 0,1 mg/ml. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure ci dessous :

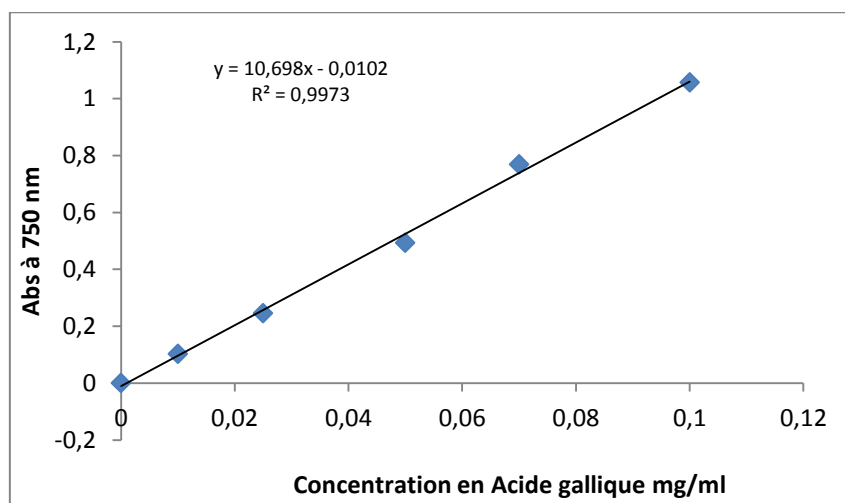


Figure 21 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

✓ **Dosage des flavonoïdes totaux :**

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl_3 avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, AlCl_3 peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes [4].

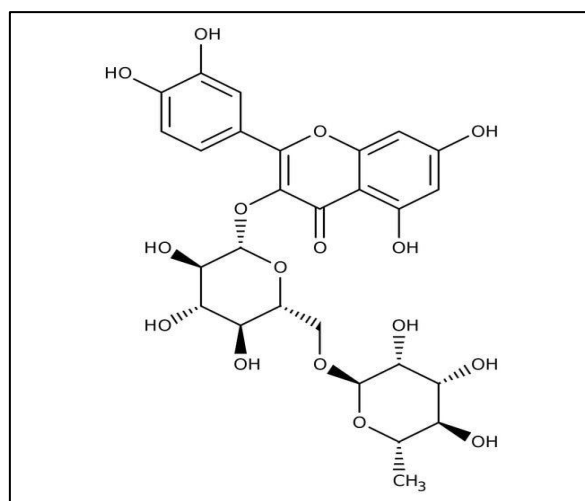


Figure 22 : structure de la rutine.

- **Protocole**

La teneur totale en flavonoïdes a été estimée en utilisant la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium [5].

En bref, 1 ml d'extrait dilué a été mélangé avec 1 ml d'une solution de méthanol à 2% d'AlCl₃. Après incubation à température ambiante pendant 15 min, l'absorbance a été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN 2120 UV). La teneur totale en flavonoïdes a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine et exprimée en milligrammes d'équivalents de rutine par gramme de poids sec (mg RE / g de poids sec). Les essais sont répétés trois fois.

- **Courbe d'étalonnage**

A partir d'une solution mère de la rutine de 0,1 mg/ml, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 0,01 à 0,1 mg/ml. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

La courbe d'étalonnage de la rutine est représentée dans la figure ci dessous :

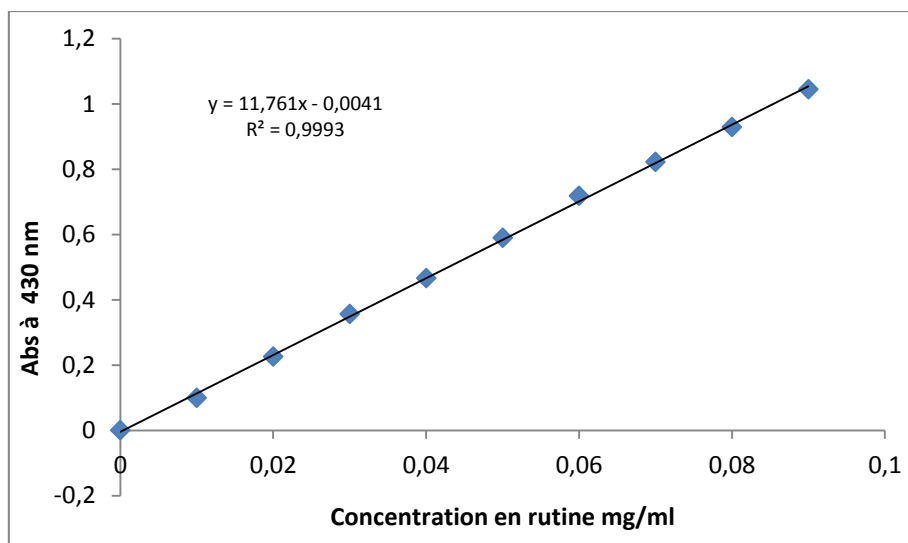


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonoides totaux.

III. Conclusion

La connaissance du mode d'extraction et propriétés physico-chimiques des HEs pour répondre aux normes internationales de caractérisation et de contrôles de la qualité des HEs. Les tests phytochimiques des composés phénoliques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les méthodes d'identification des constituants de nos extraits seront traitées dans le chapitre suivant.

Références

- [1] Pharmacopée européenne. 3^{ème} édition .1997 .Tome .1 : 57-62 .
- [2] Didier D. <Huiles essentielles >. Monographie relative aux huiles essentielles (A a G). 6^{ème} Ed. AFNOR 2000. Tome 2. 1:180-219.
- [3] Vernon L S, Orthofer R, Lamuela-Raventós R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999.299:152–78
- [4] Chang C , Yang M, Wen H. et Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food Drug Analysis.* 2002.10: 178-182.
- [5] Boulanouar B, et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind Crop Prod.* 2013.46:85–96.

Chapitre V

Techniques d'analyse des polyphénols et des huiles essentielles

I. Introduction

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par une analyse GC-MS à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Cette analyse est réalisée dans le laboratoire de département de pharmacie à l'université de Pisa en Italie. Pour déterminer le profil chimique des polyphénols, nous avons effectué une analyse HPLC dans le laboratoire des métabolites secondaires de l'université de Pamukkale en Turquie. Dans cette partie, nous présenterons les deux méthodes analytiques.

II. Conditions opératoires de l'analyse GC/MS

Les analyses GC-EIMS des trois huiles essentielles ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse Varian CP-3800 équipé d'une colonne capillaire DB-5. et un détecteur de masse à piège à ions Varian Saturn 2000. Les conditions opératoires sont regroupées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Conditions opératoires de l'analyse GC/MS

Paramètres	
Colonne capillaire	DB-5
Phase stationnaire	5% Phényle-diméthylpolysiloxane
Longueur	30 m
Diamètre interne	0.25 mm
Epaisseur de phase	0,25 µm
Température d'injection	Transfert respectif 220°C et 240°C
Température de détecteur	300 ° C
Gaz vecteur	He
Débit	1 ml / min
Programmation de la température du four	3°C/min de 60°C à 240°C
Volume injecté	0,2 µl
Mode d'injection	Split 1 :30
Détecteur de masse	Piège à ions Varian saturn 2000

II.1. Identification des composés

Pour l'identification de chaque composé, une comparaison des temps de rétention avec le temps de rétention des standards a été effectuée. De plus, nous avons évalué les indices de rétention linéaires en fonction des temps de rétention d'une série de n hydrocarbures et utilisé l'appariement assisté par ordinateur avec les spectres de masse et les spectres de masse disponibles dans le commerce contenus dans la bibliothèque interne.

III. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) pour l'analyse des composés phénoliques

III.1. Conditions opératoires de l'analyse HPLC

La procédure HPLC décrite par Caponio et al. [1] a été adoptée pour l'analyse du contenu phénolique. Les conditions utilisées sont regroupées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Conditions opératoires de l'analyse HPLC

Paramètres	
Colonne	C-18 (CTO-10ASVp, 4,6 mm x 250 mm, 5 µM).
phase mobile	solvant A (3% d'acide formique dans de l'eau distillée) et solvant B (100% acétonitrile)
Elution	en gradient de 15 à 100% de B sur une durée de 45 minutes à un débit de 1 ml / min
Quantité injectée	20 µl
Détecteur	UV à barrette de diodes (DAD)

Les chromatogrammes ont été tracés sur la base d'une détection à 280 nm avec le détecteur UV-Vis. Les temps de rétention et les spectres d'absorption UV des composés phénoliques ont été comparés à ceux des standards purs.

L'acide gallique, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide caféique,

l'acide p-coumarique, l'acide férulique, la rutine, l'acide ellagique, la naringine et la quercétine ont été utilisés comme étalons.

Les pics ont été identifiés en faisant correspondre les temps de rétention et les spectres UV avec ceux des standards. La quantité de chaque composé phénolique a été rapportée en µg par gramme d'extrait.

IV. Conclusion

Le but visé est en plus de l'identification des constituants des extraits recueillis, de faire une étude comparative de la composition chimique des trois plantes choisies. La mise en évidence des activités biologiques de nos extraits fera l'objet du chapitre suivant.

Références

[1] Caponio F, Alloggio V, Gomesb T. Phenolic compounds of virgin olive oil; influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* 1999.64:203–9.

Chapitre VI

Activités biologiques

I. Introduction

Afin de valider l'utilisation des plantes de la famille *lamiacées* en médecine traditionnelle, nous nous sommes proposés d'évaluer *in vitro* le pouvoir antioxydant, antibactérien et anticancéreux des trois plantes *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis* et *Mentha spicata* en vue d'effectuer une étude comparative.

II. Activité anti-oxydante

Afin d'évaluer la capacité antioxydante de l'extrait *in vitro*, quatre méthodes sont utilisées:

- Test du radical libre DPPH
- Test du radical cation ABTS
- Test Pouvoir antioxydant réducteur du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).
- Test Pouvoir antioxydant réducteur du phosphomolybdate.

Les essais sont répétés trois fois.

II.1. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits éthanoliques des trois plantes par le test au DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le test au DPPH suivant la méthode [1].

Les HEs obtenus par hydrodistillation à partir des feuilles d'*O.basilicum*, *T.Algeriensis* et *M.Spicata* ont été soumis à des dilutions en série dans le méthanol à différentes concentrations ; pour les extraits phénoliques.

Dans cette étude, 1 ml d'extrait éthanolique ou d'huile essentielle a été ajouté à 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH 60 µM, et le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min avant que l'absorbance ne soit enregistrée à 517 nm. L'équation suivante était utilisée pour estimer l'activité d'inhibition du radical DPPH :

$$I (\%) = [100 * (A_c - A_s / A_c)]$$

où A_c est l'absorbance de l'échantillon contrôle (solution DPPH sans extrait)

et As est l'absorbance de l'échantillon d'essai (solution DPPH après la réaction avec l'extrait) .

la capacité de chaque extrait a été comparée au standard acide ascorbique et BHA en utilisant la même méthode pour différentes concentrations.

II.2. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits ethanoliques des trois plantes par le teste ABTS

Le procédé utilisé était tel que décrit par Re et al. (1999) [2]. avec des modifications mineures. Basé sur la capacité d'un échantillon à inhiber le radical cationique ABTS^{•+} par rapport à un antioxydant de référence (Trolox). Le radical cationique ABTS^{•+} est généré par une réaction chimique avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) [3].

Pour pouvoir générer le radical cationique ABTS^{•+} nous avons préparé une solution aqueuse de persulfate de potassium K₂S₂O₈ (2,45 mM) et à partir de cette solution on prépare la solution ABTS (7 mM) qui présente une coloration bleu-vert correspondant à la formation du radical cationique ABTS^{•+}.

Ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant 12 à 16 heures. La solution obtenue est diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,700.

1450 µl de la solution ABTS préparé est ajouté a 50 µl de l'échantillon d'essai ou du standard Trolox, après l'incubation du mélange pendant 6 min, L'absorbance a été lue à 734 nm a l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour chaque échantillon d'essai, le pourcentage d'inhibition de l'ABTS ^{•+} a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$(\% \text{ d'inhibition}) = [100 * (Ac - As / Ac)]$$

où

Ac est l'absorbance de l'échantillon témoin (solution ABTS) et As est l'absorbance de l'échantillon d'essai .

La concentration d'huile ou d'extrait qui pourrait piéger 50% des radicaux ABTS (IC₅₀) a été calculée. Trolox a été utilisé comme composé de référence.

II.3. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits ethanoliques des trois plantes par le test FRAP

La méthode d'Oyaizu 1986 a été adoptée pour déterminer le pouvoir réducteur des EE et HE examinés [4] La solution d'extrait (0,1 ml), le tampon phosphate (2 ml,

0,2 M, pH 6,6) et le ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (2 ml, 1%) ont été mélangés puis incubés à 50 ° C pendant 20 min.

Ensuite, 2 ml d'acide trichloroacétique (10%) ont été ajoutés à la solution pour terminer la réaction. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 tr / min pendant 10 min, et la phase supérieure de la solution (2 ml) a été recueillie.

La phase collectée a été mélangée avec de l'eau distillée (2,5 ml) et du $FeCl_3$ (0,5 ml, 0,1%) avant de mesurer l'absorbance à 700 nm. Un plus grand pouvoir réducteur a été associé avec une absorbance accrue du mélange réactionnel.

Les résultats sont exprimés en termes de capacité antioxydante équivalente d'acide ascorbique (AEAC).

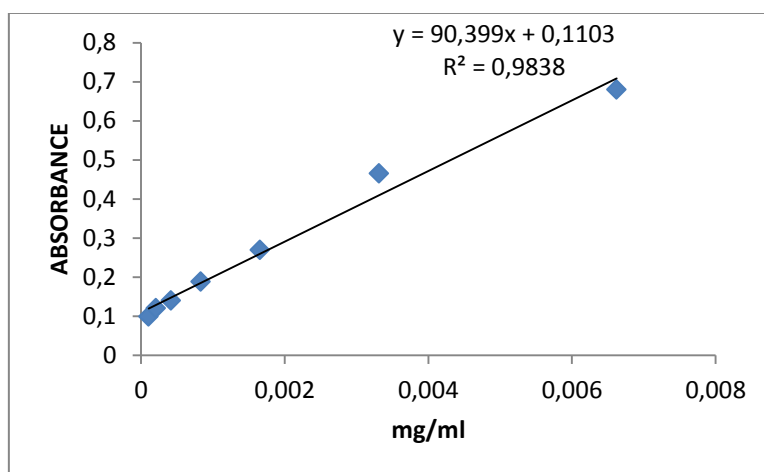


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (test FRAP).

II.4. Détermination de l'activité antioxydante des HEs et des extraits ethanoliques par le Phosphomolybdate

La méthode de Prieto et al. a été adoptée pour évaluer la capacité de réduction des EE et des HE des trois plantes évaluées [5]. En résumé, 0,3 ml de chaque extrait dilué a été ajouté à 3 ml d'un réactif phosphomolybdique solution contenant du molybdate d'ammonium (4 M), du phosphate de sodium (28 mM) et de l'acide sulfurique (0,6 M).

Le mélange a été placé dans un bain-marie à une température de 95 ° C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre une solution à blanc contenant 0,3 ml d'éthanol mélangé à 3 ml de réactif phosphomolybdique. Les résultats sont exprimés en termes de capacité antioxydante équivalente d'acide ascorbique (AEAC).

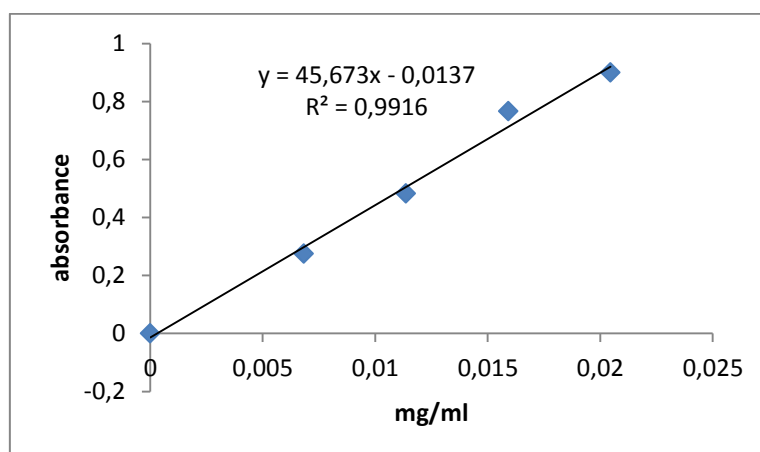


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (test phosphomolybdate).

III. Activité antibactérienne

Microorganismes

Huit espèces bactériennes et deux fongiques ont été acquies au Centre de collecte de cultures microbiennes de la faculté de médecine de l'Université de Jordanie. Les espèces utilisées étaient :

Tableau 9 : Micro-organismes utilisés pour l'activité antibactérienne.

Microorganismes	Code	Grame
Staphylococcus epidermidis	ATCC12228	Positive
Staphylococcus aureus	ATCC25923	positive
Bacillus subtilis	ATCC11562	positive
Escherichia coli	ATCC29425	négative
Pseudomonas aeruginosa	ATCC15442	négative
Klebsiella pneumoniae	ATCC43816	négative
Candida glabrata	ATCC22553	Champignon
Candida albicans	ATCC10231	Champignon

Les huit micro-organismes représentent des agents pathogènes alimentaires prédominants qui sont fréquemment rencontrés [6].[7].

Détermination de la CMI

La mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), définie comme la concentration minimale à laquelle plus de 80% de la croissance microbienne est restreinte, ont été effectuées dans 96 plaques de microtitration à fond plat (TPP,

Suisse) conformément à la méthode de microdilution, comme précédemment rapporté par Bardaweel et al [6].

Un volume d'inoculum de 1×10^5 CFU mL⁻¹ pour chaque micro-organisme a été utilisé dans chaque puits de microplaque. 20 µL d'huile ou d'extrait phénolique dilué dans le DMSO 0,1% sont placés sur les plaques inoculées. L'ampicilline et l'amphotéricine B (témoins positifs), ainsi que les milieux (témoin négatif), ont été utilisés dans des conditions expérimentales comparables. Les plaques contenant des bactéries ont été placées dans un incubateur à secousses pendant 48 h à 37 °C, tandis que les plaques contenant *Candida* ont été incubées dans les secoueurs pendant 48 h à 33 °C. Pour évaluer la croissance microbienne, les densités optiques ont été lues à 600 nm (OD600) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Palo Alto, CA, USA) .

IV. Activité anticancéreuse

IV.1. Conditions de la culture cellulaire

Afin d'évaluer l'activité anticancéreuse des extraits, 7 lignées de cellules tumorales sont utilisées :

- MCF-7, lignée cellulaire du cancer du sein (human breast cancer cells).
- MDA-MB 231 , lignées cellulaires de cancer du sein
- HeLa, lignée cellulaire du carcinome épithéloïde du col de l'utérus humain (human cervix epitheloid carcinoma cell line).
- PC3 , lignée cellulaire du cancer de la prostate humain
- K562 , , lignée cellulaire du leucémie humaine
- HCT-116 , lignée cellulaire du cancer du colon
- T47D , lignée cellulaire de cancer du sein humain

Bien que les trois lignées cellulaires MCF-7 , MDA-MB 231 et T47D sont des lignées cellulaires de cancer du sein ; ils diffèrent par la sensibilité au médicament .

Ces cellules se développent régulièrement dans une atmosphère saturée en humidité contenant 95% O₂ et 5 % de CO₂ à 37°C et dans un milieu de culture modifié DMEM, Le milieu de culture utilisé pour le développement des cellules doit contenir 10 % du FBS , 100 U/ml penicilline et 100 µg /ml du streptomycin.

Congélation/Décongélation des lignées cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont conservées dans un milieu qui contient 1 ml de la suspension cellulaire. Le milieu de conservation est composé de 40 % (V/V) de milieu de culture complet, 50 % (V/V) de FBS et 10 % de DMSO (V/V), utilisé pour son effet cryoprotecteur. Ensuite, l'ampoule est conservée à - 80°C pendant 48 heures, puis dans l'azote liquide à - 196°C. La décongélation des cellules cancéreuses commence par l'incubation de l'ampoule dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide car la décongélation lente provoquera un contact lent avec le DMSO qui est cytotoxique à température ambiante. Ensuite, le contenu de l'ampoule est transféré vers un tube de 15 ml contenant 7 ml de milieu de culture complet froid et est homogénéisé délicatement. Puis, une centrifugation est pratiquée pendant 5 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans 5 ml du milieu de culture complet. Un léger tapotage du fond du tube est effectué pour remettre en suspension le culot, et incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂.



Figure 26 : Décongélation des lignées cancéreuses .

Passage des lignées cancéreuses

Après 24 heures de culture des cellules, un contrôle quotidien de leur état est nécessaire afin de s'assurer que la culture n'a pas été contaminée durant le processus de congélation/décongélation, ainsi que pour vérifier leur confluence et leur viabilité.

Si leur confluence est adéquate un passage des cellules est réalisé avec une fréquence de 48 / 72 heures. Le passage des cellules doit se faire sous la hôte (figure 29) et il consiste à l'aspiration de l'ancien milieu de culture et lavage des cellules par du PBS. Puis, 0,5 ml de la trypsine EDTA sont additionnés et les cellules sont incubées pendant 2 à 3 minutes à 37°C. Après détachement des cellules de la surface de la boîte de culture, un volume de 2,5 ml du milieu de culture est ajouté et une homogénéisation est pratiquée pour bien séparer les cellules encore en agrégats. Après comptage et dilution convenable, les cellules sont transférées dans un nouveau flacon. Une homogénéisation est pratiquée pour répartir uniformément les cellules. Le reste des cellules est centrifugé, le milieu est éliminé, puis 1 ml du milieu de congélation est ajouté. Ensuite, les ampoules sont congelées rapidement à - 80°C pendant 48 heures puis dans l'azote liquide à - 196°C. Les cellules cancéreuses doivent subir 2 passages avant d'être utilisées dans les expérimentations.



Figure 27: Le passage des cellules.

Comptage des cellules

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède chaque expérience. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour faire le dénombrement des cellules cancéreuses. Cette méthode permet de distinguer entre les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu, et les cellules mortes qui apparaissent totalement bleues. Pratiquement, un volume de 10 μ l de la suspension cellulaire est mélangé avec 10 μ l de la solution du bleu de trypan 0,4 %. La solution obtenue est incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Puis, les 2 chambres de l'hémocytomètre sont remplies et les cellules sont comptées à l'aide d'un

microscope à phase inverse sous un objectif X10. Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Concentration cellulaire par ml} = \text{nombre de cellules par carré} \times \text{facteur de dilution} \times 10^4$$

IV.2. MTT assay

Le test colorimétrique MTT est une méthode établie de détermination du nombre de cellules viables dans les études de prolifération et de cytotoxicité. Ce test est basé sur le clivage du sel de tétrazolium jaune, le MTT, pour former un produit de formazan bleu soluble par les enzymes mitochondriales, et la quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes, et non mortes, présentes lors de l'exposition au MTT. Étant donné que le test MTT est rapide, pratique et économique, il est devenu une technique très populaire pour la quantification des cellules viables en culture [8].

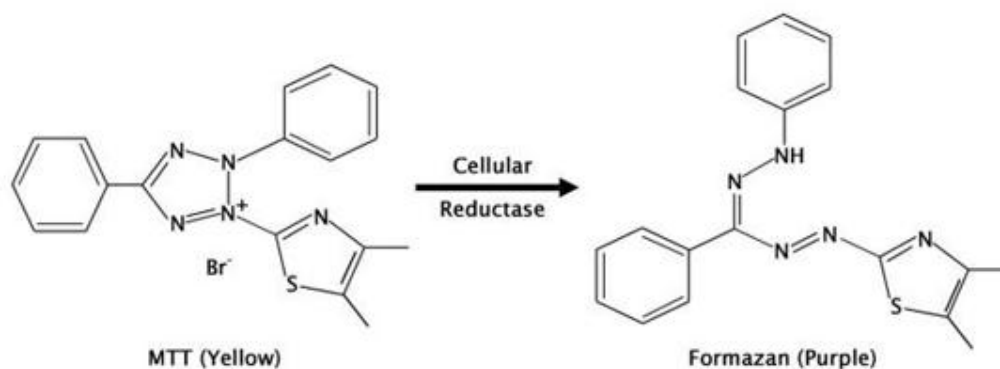


Figure 28 : Structures chimiques du MTT jaune et du formazan violet dans les cellules vivantes.

Protocol :

L'activité anticancéreuse des extraits phénoliques et des huiles essentielles a été étudiée dans des microplaques à fond rond à 96 puits en utilisant le test MTT (3-[4, 5-diméthylthiazole-2-yl] -2, 5-diphényl-tétrazolium bromure) (Sigma -Aldrich, USA) comme décrit précédemment par Bouziane et al. [7]. En résumé, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à une densité cellulaire de 1×10^4 cellules / ml et incubées pendant 24 h pour permettre la fixation. Les échantillons d'essai ont été préparés en dissolvant l'extrait éthanolique ou l'huile essentielle dans du DMSO, puis en diluant davantage avec du milieu DMEM pour atteindre la

concentration finale souhaitée. la concentration finale de DMSO dans le test a été maintenue à 0,1% .

0,1% de DMSO dans les milieux DMEM comme contrôle négative.

Chaque puits a été traité avec différentes concentrations des extraits préparés en triple et incubés pendant 48 h. Par la suite, 10 µL de 0,5 mg / mL de MTT ont été ajoutés à chaque puits et incubé encore pendant 4 h avant de mesurer l'absorbance à 570 nm. L'inhibition de la croissance a été déterminée sur la base de l'équation suivante:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{100 - [\text{abs teste} - \text{abs controle } (-)]}{\text{abs controle } (+) - \text{abs controle } (-)} * 100$$

Le logiciel Graph Pad Prism 7 (Graph-Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) a été utilisé pour l'analyse des données afin de déterminer le pourcentage d'inhibition et les résultats sont présentés comme la valeur LD₅₀, décrite comme la concentration qui produit une suppression de croissance de 50%. La doxorubicine témoin positif a été utilisée dans les mêmes conditions expérimentales.

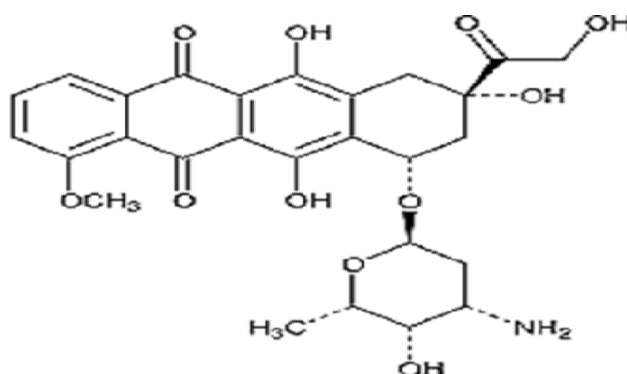


Figure 29 : Structure chimique de la doxorubicine.

V. Conclusion

L'étude des activités biologiques des plantes médicinales par des méthodes *in vitro* nous donne une idée de la possibilité de leur utilisation dans le domaine de la pharmacie, de la nutrition et de la médecine. Nous présenterons les résultats obtenus dans la section des résultats et discussion.

Références

- [1] Boulanouar B, et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind Crop Prod*. 2013.46:85–96.
- [2] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 .26(9–10):1231–7.
- [3] A Zulueta, M J. Esteve, and A Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chem*. 2009. Vol. 114. no. 1, pp. 310–316.
- [4] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. *Japanese J Nutr Diet*. 1986.44(6):307–15.
- [5] Prieto P, Pineda M, Anguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999.269:337–41.
- [6] Bardaweel S K, Hudaib M M, Tawaha K A, Bashatwah R M. Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015.2015:790-838.
- [7] Bouziane A, Bakchiche B, Dias M, Barros L, Ferreira I, AlSalamat H, Bardaweel S. Phenolic compounds and bioactivity of *Cytisus villosus* Pourr. *Mol*. 2018.23:1994–2006.
- [8] Sylvester P W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Design and Discovery* . 2011.157–168.

Partie

Résultats et discussion

Chapitre VII

Propriétés physico-
chimiques des HEs et
quantification des composés
phénoliques

I. HUILES ESSENTIELLES

I.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pourcentage (%).

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} = \frac{M_{\text{HE}}}{\text{MVS}} \times 100$$

Où :

Rdt_{HE} : Rendement en huile essentielle (%) ; M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g) ;
MVS : Masse de la matière végétale sèche (g).

L'extraction des HEs à partir des trois plantes étudiées durant les 4 h a permis d'obtenir des rendements différents consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Rendements des HEs obtenues par hydrodistillation.

	<i>O. basilicum</i>	<i>T. algeriensis</i>	<i>M. spicata</i>
Rdt_{HE} (%)	1.05	0.51	1.04

L'ensemble des échantillons des trois espèces a donné des rendements allant de 0,51% à 1,05 %, pour la technique conventionnelle (hydrodistillation).

Le rendement obtenu par hydrodistillation avec l'échantillon de *T.algeriensis* est largement plus important que celui trouvé par Benabed HK et al qui est de 0,27% région d'Aflou laghouat [1]. et il est moins important que celui trouvé par Dob et al ,qui est de 1,13% région de Médéa [2].

Dans une étude sur le genre *M. spicata* du Brésil, De Sousa Barros et al ont constaté que le rendement moyen en huiles essentielles des différents échantillons de *M. spicata* peut varier de 0,02 à 0,17% [3], et c'est un faible pourcentage par rapport à notre résultat.

Une étude réalisée par sur l'huile essentielle d'*O. basilicum* , collectée en Egypt [4] , a montré que le rendement d'extraction est de 1,7% ; Cette valeur est nettement supérieure au rendement de notre échantillon obtenu par le même procédé.

En général, les techniques d'extractions sont influencées par la durée de la distillation, la température, la pression et surtout le type et la qualité des matières

premières végétales [5]. Ceci pourrait être en partie, l'un des facteurs influençant le rendement en huiles essentielles de certaines plantes aromatiques.

De même, ces différences de rendements en huiles essentielles pourrait être expliquées par plusieurs facteurs notamment, l'origine de récolte, les facteurs génétiques, la position géographique, la nature du sol, les conditions climatiques, le temps et l'appareillage d'extraction [6-9].

I.2. caractéristiques organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'essence de feuilles de *O. basilicum* ; *T. algeriensis* et *M. spicata* sont regroupées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristique organoleptiques des essences étudiées.

HE	Aspect	Couleur	Odeur
<i>O. basilicum</i>	Liquide huileux	Jaune pale	frais, épicé et légèrement anisé.
<i>T. algeriensis</i>	Liquide huileux	Jaune orange	odeur forte, aromatisante très agréable
<i>M. spicata</i>	Liquide huileux	Jaune	Forte, Caractéristique de la plante <i>M. spicata</i>

I.3. Propriétés physicochimique des huiles essentielles

Les HEs présentent une forte instabilité vis-à-vis de divers facteurs extrinsèques et intrinsèques . L'éventuelle dégradation des HEs peut être facilement révélée par la mesure des indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide, etc.), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité, etc.) et par l'analyse chromatographique [10].

Les différentes constantes caractéristiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide) de l'essence de feuilles de *O. basilicum* ; *T. algeriensis* et *M. spicata* ont été déterminées ; les résultats sont regroupées dans le tableau 12 .

Tableau 12 : Densité, indice de réfraction, indice d'acide des HEs d'*O. basilicum* ; *T. algeriensis* et *M. spicata*

HE	Densité d_{20}^{20}	Indice de réfraction n_D^{20}	Indice d'acide I_a
<i>O. basilicum</i>	0,842	1,45	0,7855
<i>T. algeriensis</i>	1,090	1,47	1,403
<i>M. spicata</i>	0,879	1,48	1,309

A titre indicatif, nous avons reporté sur le tableau 13, les propriétés physicochimiques des HEs trouvés dans la littérature.

Tableau 13: les propriétés physicochimiques des HEs trouvés dans la littérature.

HE	Densité d	Indice de réfraction n_D	Couleur
<i>O. basilicum</i>	0,894 (a 28 °C) [11]	1,394 (a 25 °C) [11]	Jaune-clair [11]
<i>T. algeriensis</i>	0.915–0.935 [12]	1.495–1.505 (20 °C) [12]	Jaune rougeâtre [12]
<i>M. spicata</i>	0.880 -0.910 (20 C°) [13]	1.458 - 1.470 (20 C°) [13]	Jaune [13]

L'analyse des données de ce tableau montre que les propriétés physico-chimiques des HEs des plantes étudiées sont comparables à ceux relevés dans la littérature

Le résultat obtenu pour l'indice de réfraction de l'huile essentielle était dans la norme, ce qui nous indique que l'huile est sensiblement pure [14].

Les valeurs de gravité spécifique des huiles sont inférieures à 1 pour la plupart des huiles, sauf quelques-unes (*thymus algeriensis*) contenant des composés aromatiques oxygénés. Les huiles à faible valeur en acides gras libres ont une utilisation et une comestibilité plus importantes [14].

II. EXTRAIS ETHANOLIQUES

II.1. Rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux des extraits bruts

Les composés phénoliques sont les principales classes d'antioxydants naturels présents dans les plantes et sont généralement quantifié à l'aide de la méthode de Folin–Ciocalteu. C'est une méthode qui offre de nombreux avantages: en particulier, elle est rapide, facile à réaliser et ne nécessite pas de réactifs coûteux ou de dispositifs instrumentaux sophistiqués [15].

Les plantes étudiées dans ce travail ont été macérées trois fois dans l'éthanol pendant 24h. Les rendements de leurs extraits bruts sont mentionnés dans le tableau ci-après.

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits ethanoliques a été réalisée en adaptant la même procédure utilisée pour effectuer la courbe d'étalonnage, en remplaçant l'acide gallique par l'extrait dilué.

La teneur des flavonoïdes totaux dans nos échantillons a été mesurée par la méthode $AlCl_3$ et déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de la rutine.

La quantité des phénols totaux dans nos échantillons est exprimée en milligrammes par un gramme d'extrait équivalent en acide gallique (mg EAG/g).

Et pour l'estimation des flavonoides dans nos extraits, les resultats sont exprimées en milligrammes par gramme d'extrait en équivalent de la rutine . Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Rendement d'extraction, teneurs des phénols totaux et des flavonoids totaux dans les extraits ethanologiques des trois plantes étudiées.

Plante	Rendement (%)	Phénols Totaux (mg EAG /g extrait)	Flavonoids Totaux (mg ER /g extrait)
<i>O.Basilicum</i>	20,16	226±2	213±3
<i>T.Algeriensis</i>	15,78	125±1	118±1
<i>M.Spicata</i>	22,00	356±2	115±2

Pour les trois plantes étudiées nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux. La teneur la plus élevée est constatée dans les feuilles de *M.Spicata*, elle est de l'ordre de 356 ± 2 mg EAG /g suivi par *O.Basilicum* avec une teneur de 226 ± 2 mg EAG /g. La teneur la plus faible a été enregistrée dans l'extrait *T.Algeriensis* (125 ± 1 mg EAG/g). Ces variations de teneurs peuvent être dues à la nature et à la structure des molécules présentes dans la plante étudiée.

L'ensemble de ces résultats reflètent les données trouvées avec le rendement d'extraction où nous avons enregistré des rendements élevés des extraits ce qui prouve la richesse de cette plantes en polyphénols totaux.

Néanmoins, l'estimation des phénols totaux par un tel test nous donne des résultats globaux et approximatifs.

D'après la synthèse des différents résultats de dosage des composés phénoliques, nous pouvons constater que la teneur en polyphénols dépend de différents facteurs tels que (la nature de plante, conditions physiologiques ainsi que le type d'extraction : nature de solvant, le temps, agitation ou non, le mode d'extraction « à froid, à chaud » ...) [16], Cela est prouvé par des travaux antérieurs.

Beaucoup de données bibliographiques concernant la teneur en composés phénoliques des plantes choisies sont disponibles. Dans un travail précédent de Noor, Z.I. [17] ont trouvé des teneurs en phénols totaux de la fraction hydroéthanolique (80 :20) de $374,45 \mu\text{g EAG/g}$ d'extrait ; Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux que nous avons trouvés. Dans une autre étude l'extrait éthanolique de toutes les

espèces d'*Ocimum* semble avoir une teneur de (0,08-0,037 mg EAG/g) des composés phénoliques lorsqu'il est cultivé à l'ombre [18].

Selon Bhuvaneshwari, K et al ; Les valeurs de la teneur en phénols se situaient entre 4 et 165 mg GAE / g de matière sèche pour les feuille cultivée en champ, les feuille in vitro et l'inflorescence cultivée en plein champ [19].

En mettant en valeur la quantification des polyphénols de *T.Algeriensis*, On trouve parmi les articles précédemment publiés, que cette plante qui pousse en Tunisie et récoltée en janvier 2013, est riche en phénols; et elle dépasse la valeur des phénols obtenue dans notre étude (248,8 mg EAG/g de matière sèche) [20].

De plus, la quantité de composés phénoliques trouvés dans les espèces de *Thymus* est largement supérieure à celle trouvée dans d'autres plantes médicinales *lamiacées* [20].

Notre recherche et celle rapportée par A. Salhi et al , (qui ont montré que la teneur en polyphénols d'extrait aqueux de *T. algeriensis* égal a 117.50 mg EAG/g de matière sèche) sont assez similaires [21] .

Le travail mené par Biswas, A. et son équipe sur la menthe obtenue d'un supermarché local on Inde, montre que l'extrait ethanologique avait la plus forte part des composés phénoliques totaux, par rapport à l'extrait aqueux de feuille et l'extrait éthanol: eau (1: 1) des feuilles [22].

Dorman et al ont rapporté que la teneur totale en phénols dans différentes variétés de *Mentha* est d'environ 128 à 230 mg / g d'extrait en équivalent d'acide gallique [23]. Cependant, la quantité de composés phénoliques trouvés dans notre travail est supérieure à ce domaine limité.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait d'*O.Basilicum* est le plus riche en flavonoïdes avec (213±3 mg ER/g), suivi par l'extrait de *T.Algeriensis* qui a été marqué par des teneurs flavonoides /polyphénols relativement voisines (118±1 mg ER/g et 125±1 mg EAG/g). En revanche, l'extrait du *M.Spicata* a donné la plus faible valeur (115±2 mg ER/g).

La comparaison entre la teneur des flavonoïdes et phénols totaux dans chaque extrait, nous a permis de dire que la variation des quantités des flavonoïdes est relative à celle des phénols totaux c'est-à-dire elles varient dans le même sens, cela

peut être expliqué par la composition de chaque extrait de même types de polyphénols mais avec des quantités différentes. Si on parle des pourcentages des flavonoïdes par rapport aux teneurs en phénols totaux, ces pourcentages ne varient pas dans le même sens avec la teneur en flavonoïdes. Par conséquent, on peut conclure que la quantité de différents composés phénoliques est un caractère spécifique pour chaque plante, Elle est aussi influencée par la capacité du solvant d'extraire le maximum de ces composés selon leur polarité.

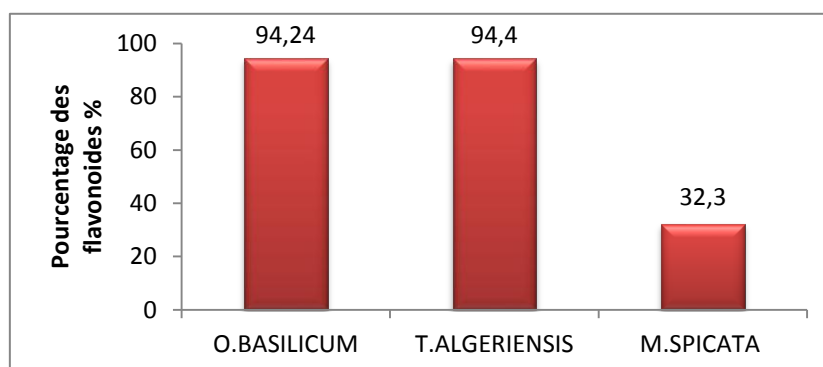


Figure 30 : Pourcentage des flavonoïdes dans les trois plantes étudiées.

À la lumière de ces résultats, on peut dire que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols pour *O.Basilicum* et *T.Algeriensis*.

III. Conclusion

Par ailleurs, l'évaluation des propriétés physico-chimiques des trois HEs, critères de pureté et de qualité conduit à des résultats conformes à ceux de la littérature.

A la fin on peut dire que notre étude présente également ces plantes comme source potentielle de composés phénoliques et les suggèrent comme candidats appropriés pour les études liées aux antioxydants naturels et à leur utilisation dans la prévention des maladies et la promotion de la santé.

Références

- [1] Benabed H K, Gourine N, Ouinten M, Bombarda I, Yousfi M. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian Lamiaceae Species. *Current Nutrition & Food Science*. 2017. 13: 97-109.
- [2] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, & Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss et Reut. *International Journal of Aromatherapy*. 2006. 16(2) : 95-100
- [3] De Sousa Barros A, De Moraes S M, Ferreira P A T, Vieira Í G P, Craveiro A A , De Santos Fontenelle R O , De Menezes J E S A , Da Silva F W F , De Sousa H A. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Ind. Crops Prod*. 2015. 76 : 557–564.
- [4] Ismail M. Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum* essential oil. *Pharm Biol*. 2006. 44: 619–626.
- [5] Li Y, Fabiano-Tixier A S , & Chemat F. Essential oils: from conventional to green extraction. In *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. 2014. (pp. 9-20). Springer International Publishing.
- [6] Merghache S, Hamza M, & Tabti B. Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L de Tlemcen, Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*. 2009. 5(1).
- [7] Karousou R , Koureas D N , & Kokkini S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*. 2005. 66(22) : 2668-2673.
- [8] Kutta G , & Sz S. Yield and composition of supercritical fluid extracts of different Lamiaceae herbs. *International Journal of Horticultural Science*. 2007. 13(2) : 79-82.
- [9] Amarti F , Satrani B , Ghanmi M , Farah A , Aafi A , Aarab L, & Chaouch A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss & Reut et *Thymus ciliatus* (Desf.) Bent du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 2010. 14(1) : 141.

- [10] Turek C, Stintzing F C. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2013. 12(1) :40– 53.
- [11] Saliou NGOM, Fatou Dieng FAYE, Moussoukhoye DIOP, Jean Michel KORNPORST & Abdoulaye SAMB . «Composition chimique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et d'*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. récoltés dans la région de Dakar au Sénégal», *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* . Année 2012 .Volume 81 : 166 – 175.
- [12] Stahl-Biskup E , & Venskutonis R P. Thyme. *Handbook of Herbs and Spices*. 2012 .499–525.
- [13] Taneja S C, & Chandra S. Mint. *Handbook of Herbs and Spices*. 2012 .366–387.
- [14] Alexander Edah, & Victor Stanley,& John Samuel & Ede Richard. Physicochemical Properties and Antimicrobial activities of Essential oil extracted from *Eucalyptus globulus* leaves. *International Journal of Chemical Sciences*. 2019. 3 : 01-04.
- [15] Musci M, & Yao S. Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2017. 68(8) :913-918.
- [16] Boussoussa Hadjer. Étude phytochimique et activités biochimiques des extraits phénoliques de l'espèce *Rhanterium adpressum* . Thèse de Doctorat .L'école normale supérieure de Kouba-Alger, Département de biologie. 2017.
- [17] Noor Z I , Ahmed D , Rehman H M , Qamar M T , Froeyen M , Ahmad S , & Mirza M U . In Vitro Antidiabetic, Anti-Obesity and Antioxidant Analysis of *Ocimum basilicum* Aerial Biomass and in Silico Molecular Docking Simulations with Alpha-Amylase and Lipase Enzymes. *Biology*. 2019. 8(4) :92.
- [18] Falguni Patel and Nainesh R Modi . Estimation of total phenolic content in selected varieties of *Ocimum* species grown in different environmental condition *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* .2018.7(5): 144-148
- [19] Bhuvaneshwari K , Gokulanathan A , Jayanthi M , Govindasamy V , Milella L , Lee S , Girija S. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. in vitro

culture be a potential source of secondary metabolites? *Food Chemistry*. 2016.194 : 55–60.

[20] Megdiche-Ksouri, W , Saada M , Soumaya B , Snoussi M , Zaouali Y , Ksouri, R , Potential use of wild *Thymus algeriensis* and *Thymus capitatus* as source of antioxidant and antimicrobial agents. 2015. *JNS* 23, 1046e1056.

[21] Salhi A , Bouyanzer A , Chetouani A , Hamdani I , El Ouariachi E , Chahboun N , Hammouti B , Desjobert J.M , Costa J. Chemical composition, antioxidant and anticorrosive activities of *Thymus Algeriensis*. *J. Mater. Environ. Sci*. 2016. 7 : 3949.

[22] Biswas A. K, Chatli M K, & Sahoo J. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*. 2012. 133(2) : 467–472.

[23] Dorman H.J.D ,Kosar M ,Kahlos K , Holm Y , Hiltunen R .Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 51:4563–4569.

Chapitre VIII

Analyse GC-MS &HPLC

I. Composition chimique des HE des trois plantes étudiées

La composition chimique de l'huile essentielle d' *O.basilicum* ; *T.algeriensis* et *M.spicata* a été déterminée par une analyse chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrométrie de masse (GC/MS). En utilisant la colonne capillaire apolaire DB-5 (Voir l'annexe) . Les conditions opératoires ont été détaillées dans la partie "matériel et méthodes".

Les pourcentages relatifs des différents composés volatils des différents échantillons d'HE sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles de *O. basilicum* et *T. algeriensis* et *M.spicata* .

Concentration (% total area)					
Constituants	I.r.i.	Ocimum basilicum	Thymus algeriensis	Mentha spicata	Methode d'identification
α-pinene	941	0,3	6,8	0,7	MS; LRI; RC
Camphene	955		0,8		MS; LRI; RC
Sabinene	977	0,4	0,7	0,6	MS; LRI; RC
β-pinene	982	0,6	1,2	1,1	MS; LRI; RC
Myrcene	993	1,3	1,2	0,8	MS; LRI; RC
3-octanol	994			0,3	MS; LRI; RC
α-terpinene	1020			0,3	MS; LRI; RC
p-cymene	1028		0,3	0,2	MS; LRI; RC
Limonene	1032		2,7	16,1	MS; LRI; RC
1,8-cineole	1034	9,2	4,1	8,7	MS; LRI; RC
(Z)-β-ocimene	1042	0,7		0,3	MS; LRI; RC
(E)-β-ocimene	1052	0,5	1,5	0,1	MS; LRI; RC
γ-terpinene	1063			0,4	MS; LRI; RC
cis-sabinene hydrate	1070			0,8	MS; LRI; RC
Terpinolene	1090	0,2	0,4	0,2	MS; LRI; RC
Linalool	1101	52,1	1,2	0,2	MS; LRI; RC
Nonanal	1104			0,1	MS; LRI; RC
pentyl isovalerate	1108	0,1			MS; LRI
1-octen-3-yl acetate	1111	0,1	0,4		MS; LRI; RC

A suivre ...

Chapitre VIII : Analyse GC-MS & HPLC

<i>cis-p-menth-2-en-1-ol</i>	1123			0,2	MS; LRI
<i>3-octyl acetate</i>	1126	0,2			MS; LRI; RC
<i>α-campholenal</i>	1127		0,5		MS; LRI
<i>camphor</i>	1145		1,1		MS; LRI; RC
<i>trans-verbenol</i>	1147		0,5		MS; LRI; RC
<i>δ-terpineol</i>	1172	0,2		0,5	MS; LRI
<i>4-terpineol</i>	1179	0,1	0,5	1,5	MS; LRI; RC
<i>α-terpineol</i>	1191	5,7	4,9	0,3	MS; LRI; RC
<i>cis-dihydrocarvone</i>	1195			3,9	MS; LRI; RC
<i>trans-carveol</i>	1219		0,4	0,2	MS; LRI; RC
<i>(Z)-3-hexenyl isovalerate</i>	1238			0,9	MS; LRI; RC
<i>pulegone</i>	1239	0,2		0,5	MS; LRI; RC
<i>neral</i>	1242		0,2		MS; LRI; RC
<i>carvone</i>	1244		0,3	49,5	MS; LRI; RC
<i>linalyl acetate</i>	1259	19,1			MS; LRI; RC
<i>bornyl acetate</i>	1287		3,1		MS; LRI; RC
<i>dihydroedulan IA</i>	1292			0,1	MS; LRI
<i>isodihydrocarvyl acetate</i>	1329			0,6	MS; LRI
<i>α-terpinyl acetate</i>	1352		47,4		MS; LRI; RC
<i>cis-carvyl acetate</i>	1364			0,3	MS; LRI; RC
<i>neryl acetate</i>	1365	1,8	9,6		MS; LRI; RC
<i>geranyl acetate</i>	1383	3,6	0,9		MS; LRI; RC
<i>β-elemene</i>	1392			0,3	MS; LRI
<i>(Z)-jasmone</i>	1395			0,3	MS; LRI; RC
<i>β-caryophyllene</i>	1419	1,0	0,6	2,7	MS; LRI; RC
<i>β-copaene</i>	1430			0,2	MS; LRI
<i>Aromadendrene</i>	1440			0,1	MS; LRI; RC
<i>α-humulene</i>	1455	0,1		0,2	MS; LRI; RC
<i>(E)-β-farnesene</i>	1458	0,1			MS; LRI; RC
<i>cis-muurolo-4(14), 5-diene</i>	1463	0,1		0,3	MS; LRI

A suivre ...

Chapitre VIII : Analyse GC-MS & HPLC

germacrene D	1482		0,6	2,1	MS; LRI
bicyclogermacrene	1496			0,7	MS; LRI
germacrene A	1505			0,7	MS; LRI
δ-cadinene	1524			0,2	MS; LRI
(E)-α-bisabolene	1542		0,2		MS; LRI
(E)-nerolidol	1564		3,5		MS; LRI
Spathulenol	1577			0,2	MS; LRI
caryophyllene oxide	1582	0,1	0,9	0,3	MS; LRI; RC
Viridiflorol	1591	0,4			MS; LRI
1,10-di-epi-cubenol	1615	0,1		0,2	MS; LRI
T-cadinol	1641			0,3	MS; LRI
T-muurolol	1642			0,2	MS; LRI
Monoterpene hydrocarbons		4,0	15,6	20,8	
Oxygenated monoterpenes		92,0	74,7	67,2	
Sesquiterpene hydrocarbons		1,3	1,4	7,5	
Oxygenated sesquiterpenes		0,6	4,4	1,2	
Apocarotenes		0,0	0,0	0,1	
Non-terpene derivatives		0,4	0,4	1,6	
Total identified		98,3	96,5	98,4	

MS : spectre de masse, LRI : indice de rétention linéaire, RC : Composé de référence .

Les huiles essentielles isolée a partir des feuilles *d'ocimum basilicum* ; *thymus algeriensis* et *mentha spicata* contient différent composés dominants . 61 constituants ont été identifiés représentants 98,3 et 96,5 et 98,4 % de la composition chimique totale des HE d'*ocimum basilicum* ; *thymus algeriensis* et *mentha spicata* respectivement. Des monoterpènes, des sesquitérpènes, des apocarotenes et non terpènes dérivatives ont été identifiés.

L'étude comparative des résultats obtenus de la composition chimique des trois huiles essentielles montré des quantités légèrement faibles des monoterpènes hydrocarbures (4,0% ; 15,6% et 20,8%) et de plus grandes quantités des monoterpènes oxygénés (92,0% ; 74,7% et 67,2%).

Dans l'huile essentielle d'*O. Basilicum*, 26 composés ont été identifiés, représentant 98,3% de l'huile. Il est intéressant de noter que la teneur en monoterpènes oxygénés (92,0%) était 23 fois supérieure à celle en hydrocarbures monoterpéniques (4,0%). Le linalol (52,1%), l'acétate de linalyle (19,1%) et 1,8-cinéole (9,2%), ont été détectés comme composés principaux dans l'huile. La composition de l'huile essentielle de *O. basilicum* est extrêmement variable en raison de l'existence de plusieurs chimiotypes, par exemple le linalool, méthyl chavicol, eugenol, méthyl eugenol et neral [1].

Dans l'huile essentielle de *T. algeriensis*, 29 composés ont été identifiés, dont 74,7% de monoterpènes oxygénés et 15,6% d'hydrocarbures monoterpéniques. Parmi les composés mineurs, le sesquiterpène oxygéné (4,4%) ont été caractérisés. Les principaux composés de *T. algeriensis* étaient l'acétate d' α -terpinyle (47,4%), l'acétate de néryle (9,6%) et l' α -pinène (6,8%).

44 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *M. Spicata* ; notre huile essentielle est très riche en monoterpènes oxygénés 67,2% et d'hydrocarbures monoterpéniques 20,8% ; et Parmi les composés chimiques prédominants dans la composition, on trouve le carvone 49,5 % , le limonene 16,1 % , 1,8-cineole 8,7% et qui appartiennent à ces deux familles.

I.1. Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles extraite avec les essences étrangères

D'après la littérature, plusieurs études menées sur la composition des huiles essentielles ont révélé l'existence d'un nombre important de chémotypes dans différentes régions du monde avec une grande diversité dans les principaux constituants. Afin de classer les huiles essentielles des parties aériennes des plantes étudiées par rapport aux essences étrangères et pour déduire à quel chémotype elle appartient , nous avons comparé sa composition chimique à celle des HEs provenant de différents pays , les principaux constituants identifiés dans les essences des plantes étrangères , ainsi que leur pourcentage relatif sont consignés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Composés majoritaires présents dans l'HEs des trois plantes étudiées de différents pays.

Plante	Pays	Partie utilisée	Composés majoritaires	Références
Ocimum basilicum	Brésil	Feuilles sèche	Linalol(72,14),géraniol(12,95), 1,8-cinéole(7,90)	[2]
	Algerie Khemis Miliana	Feuilles séches	Linalool (32,83%), linalyl acetate (16%), elemol (7,44%), geranyl acetate (6,18%), myrcene (6,12%), allo-ocimene (5,02%), α -terpineol (4,9%), (E)- β -ocimene (3,68%) and neryl acetate (3,45%)	[3]
	Maroc	Partie aérienne fraiche	Linalol (54%), trans-cinnamat de méthyle(15,3%),1,8-cinéole (9,33%),farnesol(4,56%),cis-caryophyllène (3,43%)	[4]
	Italie	Partie aérienne fraiche	Linalol (41,17-76,20%),méthyl charvicol(18,01-41,40%),eugénol(1,16- 3,89%), 1,8-cinéole(0,94-12,91%)	[5]
	Madagascar	plante	Méthyl charvicol(74,87%), 1,8- cinéole(2,55-4,43%),Linalol(0,97- 2,72%),Méthyleugénol(0,-4,16%)	[6]
	Roumanie	Plante sèche	Linalol(46,95%), β -élémente (7,84%),farnesène(6,86%), épi-bicyclosesquiphellandréne (5,92%), α -guaiéne (5,26%)	[7]
Thymus algeriensis	Tunisie	Plante	1,8-cineole (4,3 – 24,1%), a-pinene (2,4–25,2%), camphor (0,2– 14%), linalool (0,2–22,4%), borneol (<0,01 –24,3%), caryophyllene oxide (<0,01 – 18,8%), thymol (<0,01 – 54,9%)	[8]
	Libye	Plante sèche	thymol (38.5%) p-cymene, terpinene, bornyl acetate and borneol (8.9%, 7.1%, 7.0% et 6.0%	[9]
	Algerie 800 m altitude de Chrea National Park	Partie arienne fraiche	thymol (29.5%) , terpinyl acetate (18.0%), nerolidol (12.6%), a-pinene (11.1%), borneol (9.0%) bornyl acetate (7.7%)	[10]

	Maroc	Partie arienne	borneol (18.3%) camphene (11.8%), camphre (10.0%) et myrcene (8.6%).	[11]
	Tunisie	Feuilles sèches	Camphor 16.7% , 1,8 cineol (13.9%) et α -pinene (13.6%)	[12].
	Algerie Hamam Alwan	Feuilles seches	Thymol(71,45%) , linalool(7,89%), carvacrol (3,98%) , P-cymene (3,00%)	[13]
<i>Mentha spicata</i>	La chine	Parties aérienne sèches	Carvone (46,7- 65,4), linalool (0,3-6,9) , menthone (1,5-6,9%) , menthole(2-8,7%) , pulégone(1,4-7,9%) ,pipéritéone oxyde (0,3%)	[14]
	Turquie	Plante sèche	Pulegone (26,71-29,56%) , pipéritone (22,17-28,16%)	[15]
	Algérie (Setif)	Plante sèche	Carvone (59,4%), limonène (6,12%), 1,8- cinéol, germacrène-D (04,66%), β -caryophyllène (2,969%) , β -bourbonène (2,796%) , α -terpinéol (1,986%), Terpinène-4-ol (1,120%)	[16]
	Italie	Feuilles	Carvone (62,9%) , limonène (8,5%), 1,8- cinéol (7,1%)	[17]
	La Grèce	Plante sèche	Linalool (85,0-93,9%), germacrene D (1,0%- 4,2%), β caryophyllene (0-2,6%), 1,8-cineole (0,4 -2,1%), β -elemene (0,5- 1,2%), neodihydrocarveol (0,4-1,2%) ,myrcene (0,3-1,1%)	[18]
	Algérie (Bejaia)	Feuilles sèches	Carvone(48,5%) , limonène(20,7%) , 1,8-cinéol (5,4%)	[19].

Dans l'HE des feuilles de basilic du Brésil, le Linalol, géraniol ,1,8-cinéole sont les principaux composés . en Italie, les composés majoritaires : Linalol et méthyl charvicol ont été révélé dans l'HE de basilic, il a été également rapporté que les composés majoritaires : Linalol , trans-cinnamat de méthyle,1,8-cinéole caractérisent le basilic du Maroc .

L'isolement de linalol a été signalé comme étant le seul composé majoritaire dans l'HE de la Roumanie. En outre le basilic de Madagascar est riche en méthylcharvicol

Par ailleurs, en algérie « khemis miliana », les principaux composés de l'HE extraite des feuilles du basilic qui ont été signalés : Linalool et linalyl acetate, ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans notre étude

Pour l'HE de *Thymus algeriensis*, les résultats révèlent que la composition est en effet très différente et dérive d'un chémotype différent de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Présents en Algérie et de ceux déjà étudiés par Ouariachi et al sur échantillons marocains. Ce dernier a constaté que l'huile essentielle se caractérise par une teneur riche en borneol (18,3%) et camphène (11,8%). Megdiche-Ksouri et al a trouvé une composition différente dans son étude sur le tunisien *Thymus algeriensis* Boiss & Reut Avec Camphor (16,7%), 1,8 cineol (13,9%) and α -pinène (13,6%). Ce résultat était attendu étant donné que la littérature avait déjà mentionné que les échantillons algériens de *Thymus algeriensis* présentaient des différences significatives au sein et entre les échantillons d'huiles essentielles selon les régions géographiques [10],[20].

L'huile extraite de menthe verte est riche en carvone (49,5%) et en Limonène (16,1%) Sa composition est globalement proche de celle rapportée par Brahmi, F et al dans la région de Béjaïa avec 48,5 % de carvone et celle rapportées par H. Boukhebt et al de Sétif avec 59,4% de carvone et 6,12% de limonène. Piras, A et al a obtenu 62,9% de carvone et 8,5 % de limonène dans l'Italie. Ces huiles originaires méditerranéennes sont des chémotypes à Carvone et Limonène différents de ceux analysés par G. Kofidis et al de la Grèce et par I. Telci et al de la Turquie qui ont été signalés que linalool (85-93,9%) et la Pulegone (26,71-29,56%) sont les principaux composants respectivement.

- **Conclusion**

Les données sur les chémotypes du basilic puisées dans la littérature nous ont permis de confirmer que l'HE d'*Ocimum basilicum* que nous avons étudiée, appartient bien au chémotype européen riche en linalol.

Les principaux composés de l'huile essentielle de *T. algeriensis* de différentes zones géographiques ont été fréquemment signalés comme incluant du camphre et / ou des α -le pinène, tandis que le thymol et le linalol ont parfois été signalés comme les principaux composés. Fait intéressant, La composition chimique de l'huile essentielle de *T. algeriensis* rapportée dans cette étude semble unique, car l'acétate d' α -terpinyle et l'acétate de néryle ont été détectés comme les principaux composés de l'huile mais le thymol n'a pas été détecté du tout.

Fait intéressant, l'huile essentielle de *M. Spicata* dans cette étude semble être plus riche en certains composants clés tels que le 1,8-cinéole et les monoterpènes oxygénés. la littérature disponible sur ce sujet révèle que de nombreuses études ont déjà été publiées sur la composition chimique des huiles essentielles de *M. spicata*, néanmoins il n'y a aucun rapport sur la composition de *M. spicata* de la région de l'Atlas saharien algérien.

Par ailleurs, les variations observées dans la structure et les pourcentages des différents composant dans les essences des différents pays , que nous avons exposées , sont dues a plusieurs sources ,entre autres , l'origine géographique , la nature du sol, le mode d'extraction, le matériel végétal frais ou sec ,l'organe de la plante a partir duquel est retiré l'essence (plante entière ,partie aérienne ,feuilles ,fleurs ,fruits) et les conditions d'analyse .

II. Composition chimique des extraits ethanoliqes des trois plantes étudiées

La composition chimique des extraits phénoliques d'*O.basilicum* ; *T.algeriensis* et *M.spicata* a été déterminée par une analyse HPLC-UV DAD. (Voir l'annexe).

la présence supposée des flavonoïdes dans un extrait ethanoliq (polaire) nous a permis d'orienter les recherches sur l'utilisation du gel de silice dont le rôle est de permettre la séparation de composés polyphénoliques suivant leur polarité.

Les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C_{18} alors que ceux possédant un caractère apolaire se verraient plus retenus par celle-ci.

Les composés élués sont généralement repérés en sortie de colonne par leur absorption en lumière ultraviolette (280,325,360 nm) pour tous les phénols dû à la présence du cycle phénolique [21].

La quantification des composés phénoliques se fait par intégration de l'aire sous les pics grâce aux courbes d'étalonnage des différents étalons.

- **Les étalons**

Dans cette analyse nous avons utilisé un mélange composé d'une solution méthanol-eau 50:50 (v/v) qui contient 15 étalons.

Le tableau 17 montre les propriétés des étalons utilisés dans cette analyse.

Chaque étalons est caractérisé par une valeur LOD en ppm définie comme la limite de détection d'une procédure analytique (c'est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée), une valeur λ_{max} et un temps de rétention.

Tableau 17 : les propriétés des étalons utilisés.

Les étalons	LOD (ppm)	Longueur d'onde
Gallic acid	0.01	280
3,4-dihydroxy benzoic acid	0.03	280
4-hidroxy benzoic acid	0.01	280
2,5 dihydroxybenzoic acid	0.75	320
Chlorogenic acid	0.01	320
Vanillic acid	0.11	320
Epicatechin	0.43	260
Caffeic acid	0.01	280
p-coumaric acid	0.01	320
Ferulic acid	0.01	320
Rutin	0.57	360
Ellagic	0.45	240
Naringin	0.40	280
Quercetin	0.57	360
Cinnamic acid	0.01	280

Les concentrations des composés phénoliques identifiés dans tous les échantillons analysés sont présentées dans le tableau 18 (présentées dans l'ordre de leur temps de rétention).

Tableau 18 : Teneur en composés phénoliques des extraits par l'analyse HPLC.

Composés phénoliques standard	Temps de rétention standard RT (min)	<i>O.basilicum</i> (µg/g)	<i>T.algeriensis</i> (µg/g)	<i>M.spicata</i> (µg/g)
Gallic acid	6.8	17.61	10.49	10.19
3,4-dihydroxy benzoic acid	10.7	21.56	1.42	7.23
4-hidroxy benzoic acid	15.7	46.29	10.03	46.50
2,5 dihydroxybenzoic acid	17.2	52.14	778.76	87.10
Chlorogenic acid	18.2	25.11	22.68	26.44
Vanillic acid	19.2	138.24	182.67	71.33
Epicatechin	21.3	225.01	824.79	167.78
Caffeic acid	22.7	6.48	33.30	4.34
p-coumaric acid	26.1	12.83	83.80	65.09
Ferulic acid	30.1	25.00	34.30	309.97
Rutin	45.6	476.28	280.39	295.10
Ellagic	47.7	27.64	374.58	418.96
Naringin	49.7	21.02	120.67	9.76
Quercetin	70.4	0.36	2.84	1.07
Cinnamic acid	71.1	54.68	20.51	180.29

Les données du tableau 2 ont révélé que l'extrait éthanolique d'*O. Basilicum* avait des quantités élevées de rutine, d'épicatéchine et d'acide vanillique: 476,28 µg / g, 225,01 µg / g et 138,24 µg / g, respectivement. Deux composés phénoliques, la quercétine (0,36 µg / g) et l'acide caféique (6,48 µg / g), ont été trouvés en faibles concentrations. Dans l'extrait éthanolique de *T. algeriensis*, six composés ont été détectés à des concentrations particulièrement élevées: épicatéchine (composé majeur;

824,79 $\mu\text{g} / \text{g}$), 2, 5 acide dihydroxybenzoïque (778,76 $\mu\text{g} / \text{g}$), acide ellagique (374,58

$\mu\text{g} / \text{g}$), rutine (280,39 $\mu\text{g} / \text{g}$), acide vanillique (182,67 $\mu\text{g} / \text{g}$) et naringine (120,67 $\mu\text{g} / \text{g}$). L'épicatéchine s'est révélée être le principal composé de l'extrait éthanolique de *Thymus algeriensis* (824,79 $\mu\text{g} / \text{g}$), et l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque a été détecté à la plus faible concentration (1,42 $\mu\text{g} / \text{g}$).

Les analyses ont montré aussi que l'acide ellagique, ferulique, rutin, l'acide cinnamique et l'épicatéchine sont les composés les plus importants dans l'extrait du *M.spicata* avec des valeurs respectives de 418,96 $\mu\text{g/g}$, 309,97 $\mu\text{g/g}$ et 295,10 $\mu\text{g/g}$ et 180,29 $\mu\text{g/g}$.

Il est à noter qu'au cours de cette étude on n'a pas pu identifier certains composés phénoliques présents dans les extraits des plantes par manque des étalons adéquats.

La recherche bibliographique sur le profil chimique des extraits phénoliques des trois étudiées a également permis d'identifier plusieurs composés (Tableau 19).

Tableau 19 : Composé phénoliques présents dans les trois plantes étudiées d'après des recherches

Composé phénoliques	<i>Ocimum basilicum L</i>	<i>Thymus algeriensis</i>	<i>Mentha spicata L</i>
Syringic acid			0.004 mg /g [26]
o-Coumaric acid		9.83 µg/g [25]	0.627 mg /g [26]
p-Anisic acid			0.329 mg /g [26]
Salicilic acid			0.004mg /g [26]
Methoxy-cinnamic acid			0.030mg /g [26]
caftaric acid	1595.32 mg/100g[22] <0.2µg /g[23]		<0.2 mg/100g [27]
gentisic acid			<0.2 mg/100g [27]
caffeic acid	88.452 mg/100g[22] <0.2 µg/g[23] [24]		<0.2 mg/100g [27][29][30]
p-coumaric acid	[24] [24]		0.44 mg/100g [27]
isoquercitrin	[22] 179.19 µg/g[23]		16.06 mg/100g [27]
rutin	658.443 mg/100g[22] 425.71 µg/g[23]	4.52 µg/g [25]	<0.2 mg/100g [27] 0.01 mg/g[28]
Quercitrin	[22] 50.39 µg/g[23]		2.23mg/100g [27]
Quercetin	3.39 µg/g[23] [24]		
luteolin	[24] 6.06 µg/g[23]		2.23 mg/100g [27][29]
apigenin	[22]		<0.2 mg/100g [27][29]
salvianolic acids			14.70 mg /g [28]
Hydroxycinnamic acids			3.00 mg /g [28]
Caffeoylquinic acids			3.06 mg /g [28]
Hydroxyphenylpropanoic acids			0.99 mg /g [28]
Luteolin-O-glucoside			[29]
Apigenin-7-O-rutinoside			[29]
Rosmarinic acid derivatives	<0.2 µg/g[23]		230.50 mg /g [28] [29] [30]
Flavones			0.53 mg /g [28]
Flavonols			0.01 mg /g [28]
Flavanones			0.04 mg /g [28]
Thymusin			[29]
Thymonin			[29]
Desmethylnobiletin			[29]
Cirsilineol			[29]
Sideritoflavone			[29]
Eriocitrin			[29]
diosmin			[30]
p-hydroxy benzoic acid	[24]		
benzoic acid	[24]		
kaempferol	[24]		
catechin	[24]		
Benzoic acid		5,71 µg/g [25]	
Epicatechin		48,03 µg/g [25]	

D'après la comparaison avec la littérature nos résultats sont en bon accord avec les recherches de Benedec et al [22] ; ont montré que les extraits d'*ocimum basilicum* est riches en composés phénoliques. Ainsi, les composés identifiés sont essentiellement l'acide caftaric ,l'acide caffeic et la rutine .

Et d'après Vlase et al, la quantification de la retine égale a 425.71 µg/g [23], cette valeur est proche a notre résultats 426,28 µg/g.

Néanmoins, à notre connaissance, l'identification par HPLC de composés phénoliques de *Thymus algeriensis* n'a pas beaucoup signalée auparavant.

Nous avons trouvé un seul article qui montrait la richesse de cette plante en epicatechin (48.03 µg/g) [25].

Concernant *M.spicata* , il existe de nombreuses études sur la composition chimique de son extrait phénolique . Parmi eux, une étude qui a montré la richesse de cette plante en acide Rosmarinic derivatives (230,50 mg /g) [28].

- **Conclusion**

L'étude phytochimique par HPLC des extraits ethanoliqes des trois espèces étudiées a montré sur la base des spectres UV et des composés témoins disponibles que tout les extraits ethanoliqes présentent un grand nombre des composés phénoliques , identifiés et quantifiés .

La même étude a montré la présence des composés phénoliques majoritaires communs entre les trois espèces telle que : epicatechin , rutine , acide vanilique , acide ellagique . Composés connus selon la littérature par leurs puissantes activités biologiques.

Références

- [1] Dudai N, Li G, Shachter A, Belanger F, Chaimovitsh D. Heredity of phenylpropenes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) chemotypes and their distribution within an F2 population. *Plant Breed.* 2018 .137:443–9.
- [2] Oliveira J S, Porto L A, Estevam C S, Siqueira RS, Alves P B, Niculau E S, et al. Phytochemical screening and anticonvulsant property of *Ocimum basilicum* leaf essential oil. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 2009 .8:195-202.
- [3] L Hadj Khelifa, M Brada, F Brahmi, D Achour, M L Fauconnier, G Lognay. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of *Ocimum basilicum* leaves from the Northern Region of Algeria, *Topclass J. Herb. Med.* 2002. 1 (2) 53e58.
- [4] Belkamel A , Bammi J , Janneot V , Belkamel A , Dehbi Y , et Douira A. Evaluation de la biomasse et analyse des huiles essentielles de trois variétés de basilic (*Ocimum basilicum* L.) cultivées au Maroc. *Acta Bot. Gallica.* 2008 .155 (4), 467-476.
- [5] Marotti M , Piccaglia R , & Giovanelli E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 1996 .14 : 3926–3929.
- [6] Ramdriamiharisoa R, Gaydou E M , Bianchini J P , Ravelojaona G, Vernin G. Study of the variation in the chemical composition and classification of Basil essential oils from Madagascar. *Sci. Aliments.* 1986. 6 : 221–231.
- [7] Benedec D, Oniga I, Oprean R, Tamas M. Chemical composition of the essential oils of *Ocimum basilicum* L. cultivated in Romania. *Farmacia.* 2009 .57:625–9.
- [8] El Hadj Ali I B , Zaouali Y , Bejaoui A , & Boussaid M. Variation of the Chemical Composition of Essential Oils in Tunisian Populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae) and Implication for Conservation. *Chemistry & Biodiversity.* 2010. 7(5) :1276–1289.

- [9] Nikolić M , Glamočlija J , Ferreira I. C. F. R , Calhelha R. C , Fernandes Â , Marković T, Soković M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014 .52 : 183–190.
- [10] Hazzit M , Baaliouamer A , Veríssimo A R , Faleiro M , & Miguel M G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*. 2009.116(3) : 714–721.
- [11] Ouariachi E, mokhtar E , Hamdani I , Bouyanzer A , Hammouti B , Majidi L , Costa J, Chetouani A. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014. 4(4) :281–286.
- [12] Megdiche-Ksouri W , Saada M , Soumaya B , Snoussi M , Zaouali Y , Ksouri R. Potential use of wild *Thymus algeriensis* and *Thymus capitatus* as source of antioxidant and antimicrobial agents. *JNS* 23. 2015. 1046e1056.
- [13] Chemat S , Cherfouh R , Meklati B Y, & Belanteur K. Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. 2012. 24(1) : 5–11.
- [14] D Zhao, Y W Xu, G L Yang, A M Husaini and W Wu. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China. *Ind Crop. Prod.* 2013 .42 :251– 260.
- [15] I Telci, I Demirtas, E Bayram, O Arabaci and O Kacar. Environmental variation on aroma components of pulegone/ piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Ind. Crop. Prod.* 2010. 32 : 588–592
- [16] H Boukhebt, A N Chaker, H Belhadj, F Sahli, M Ramdhani, H Laouer and D Harzallah. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*. 2011. 3 :267–275
- [17] Piras A , Porcedda S , Falconieri D , Maxia A , Gonçalves M , Cavaleiro C, & Salgueiro L. Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha*

pulegium L. growing wild in Sardinia island (Italy). *Natural Product Research*. 2019 .1–7.

[18] G Kofidis, A Bosabalidis and S Kokkini. Seasonal variation of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *J. Essent Oil Res*. 2004 .16 : 469–472.

[19] Brahmi F , Adjaoud A , Marongiu B , Falconieri D , Yalaoui-Guellal D , Madani K , & Chibane M. Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata*L. Leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 2016. 28(3) : 211–220.

[20] R Giordani, Y Hadeif and J Kaloustian. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*. 2008. 79 (3) : 199–203.

[21] Merken H M, Beecher G R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2000. 48(3):577-99.

[22] Benedec D , Vlase L, Hanganu D, Oniga I. Antioxidant potential and polyphenolic content of Romanian *Ocimum basilicum*. *Dig. J. Nanomater. Bios*. 2012 .7 : 1263–1270.

[23] Vlase L , Benedec D, Hanganu D , Damian D , Csillag I, Sevastre B, Mot A C, Silaghi-Dumitrescu R , Tilea I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules* .2014.19 : 5490–5507.

[24] Mohamed HM Abd El-Azim, Ahmed AM Abdelgawad, Mohamed El-Gerby, Sherin Ali and Amani MD El-Mesallamy. Phenolic Compounds and Cytotoxic Activities of Methanol Extract of Basil (*Ocimum basilicum* L.) . *Microbial & Biochemical Technology* .2015. Volume 7(4): 182-185

[25] Boutaoui N, Zaiter L, Benayache F, et al. Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Different Extracts from *Thymus algeriensis* Aerial Parts. *Molecules*. 2018.23(2):463.

- [26] Sytar O, Hemmerich I, Zivcak M, Rauh C, Brestic M. Comparative analysis of bioactive phenolic compound composition from 26 medicinal plants. *Saudi J Biol Sci.* 2016.
- [27] R I Moldovan, R Oprean, D Benedec et al. "LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania". *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* 2014.vol 9 . no 2, pp 559–566.
- [28] Cirlini M , Mena P, Tassotti M, Herrlinger K A, Nieman, K M, Dall'Asta C, Rio D D. Phenolic and volatile composition of a dry spearmint (*Mentha spicata* L.) extract. *Molecules.*2016.21 : 1007.
- [29] Pereira O R, Cardoso S M. Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols. *Curr Anal Chem.* 2013. 9: 382–396.
- [30] Fatiha, B , Didier H , Naima G , Khodir M , Martin K , Léocadie K , Caroline S , Mohamed C , Pierre, D. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Ind. Crops Prod.* 2015. 74 :722-730.

Chapitre IX

Résultats des activités biologiques

I. Activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont remplacés les antioxydants synthétiques et qui peuvent être employés pour empêcher les maladies et l'oxydation des systèmes complexes des aliments. Les résultats de détermination de la capacité considérablement de la méthodologie utilisée, de l'oxydant et du substrat oxydable utilisé dans la mesure [1]. Par conséquent, il est important de comparer différentes méthodes analytiques variantes dans leur cible d'oxydation afin de comprendre l'activité biologique d'un antioxydant et obtenir des données précises pour une meilleure comparaison avec d'autres données de la littérature [2].

Ce travail, nous avons utilisé quatre méthodes pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des plantes étudiées à savoir : DPPH, ABTS, FRAP et phosphomolybdate. Ces tests ont été choisis parmi les tests les plus cités dans la littérature.

Dans un souci de comparaison, nous avons fait le choix d'exprimer les résultats découlant différents tests de façon homogène : en milligramme par millilitre (ou tout simplement IC₅₀) pour les tests antiradicalaire DPPH et ABTS et en microgramme ou milligramme d'équivalent d'acide ascorbique (antioxydant de référence) par millilitre d'extrait ou tout simplement AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity) pour les deux tests antioxydants FRAP et Phosphomolybdate.

Le tableau 20 résume les résultats obtenus de l'évaluation de l'activité antioxydante par les différents tests des extraits bruts des plantes étudiés.

Tableau 20 : Activité antioxydante des extraits ethanolyques et des huiles essentielles des plantes et des standards déterminée par les tests DPPH, ABTS , FRAP et phosphomolybdate.

	Extraits	IC50 (DPPH) (mg/ml)	IC50 (ABTS) (mg/ml)	AEAC(µg/ml) Test de FRAP	AEAC (mg/ml) Teste de Phosphomolybdate
<i>Ocimum basilicum L</i>	EE	0,679 ± 0,383	0,970 ± 0,022	3,657± 0,009	0,005±0,0003
	HE	16.296±0.394	0,6870±0,203	0,003±0,0007	0,760 ±0,001
<i>Thymus algeriensis</i>	EE	1,560±0,010	1,743 ± 0,195	0,897±0,064	0,007±0,0006
	HE	1.437±4.51 .10 ⁻⁵	0,896±0,203	1,387±0,265	0,432±0,001
<i>Menta spicata</i>	EE	0,367 ± 0,010	0,586± 0,008	2,332± 0,018	0,008± 9,485E-05
	HE	3,451±0,177	0,377± 0,008	3,797±0,212	0,297±0,003
Ascorbique acide		0.002±3.826.10 ⁻⁶	0,001±5,13E-05	ND	ND
Vitamin E		ND	ND	ND	0.674 ± 0.057
Trolox		ND	0,003±3,35E-05	ND	ND
BHA		1.685±0.658	ND	1000±0.047	ND

ND : Non déterminé .

I.1. Activité anti-radicalaire DPPH

Pour évaluer les différents potentiels antioxydants des extraits phénoliques et des huiles essentielles, leurs valeurs IC_{50} ont été déterminées par le test DPPH, et ont été comparées à l' IC_{50} du composé de référence acide ascorbique (vitamine C) en mg / ml. La présente étude montre que les extraits éthanoliques ont démontré d'excellentes activités d'élimination des radicaux DPPH.

En général, l'activité associée à l'extrait de *M.Spicata* était plus forte que celle associée à l'extrait de *T. algeriensis* et d'*O.Basilicum*, mais les trois extraits avaient moins d'activité que l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,002 \pm 3,826.10^{-6}$ mg / mL). Pour les huiles essentielles, l'activité la plus forte a été associée à l'huile de *T. algeriensis*, avec une valeur IC_{50} de 1,437 mg / mL, suivie de BHA (IC_{50} de 1,437 mg / mL), de l'huile de *M.Spicata* ($IC_{50} = 3,451 \pm 0,177$ mg / ml) et en fin de l'huile *O. basilicum* (IC_{50} de 16,296 mg / mL). Cependant, tous les échantillons examinés étaient moins actifs que l'acide ascorbique.

Pour l'*O.Basilicum*, des nombreuses études sont concentrées principalement sur les activités antioxydantes des extraits bruts, en utilisant du méthanol, de l'acétone ou de l'eau comme solvant, Cependant Gülçin, İ. et al ont constaté que l'extrait éthanolic d'*O. basilicum* de la Turquie exerce une inhibition du radical DPPH (62% pour une concentration de 50 µg / ml d'extrait) [3].

O.Basilicum, récoltée en Serbie, a fait aussi l'objet d'une étude portant sur la capacité antioxydante des extraits organiques avec le test DPPH. Tous les extraits évalués ont pu réduire le radical DPPH stable avec des valeurs IC_{50} (50% de réduction) comme suit: 8,17 µg / mL pour H₂O, 12,86 µg / mL pour EtOAc, 17,67 µg / mL pour n-BuOH, 21,14 µg / mL pour CHCl₃, et 24,91 µg / mL pour l'extrait Et₂O. Respectivement [4].

Pour l'HE, Hussain et al ont montré que l'HE de basilic riche en linalol offre une activité antioxydante (6 µg / ml) comparable à l'antioxydant synthétique BHT (5,8 µg / ml) [5]. Concernant les résultats obtenus précédemment pour l'extrait phénolique et l'huile essentielle de *T.Algeriensis* par la méthode DPPH, Bendjabeur et al [6], ont montré que l'EE avait presque même efficacité que le BHT pour des concentrations supérieures à 50 µg / mL et étaient bien plus efficaces pour piéger le radical DPPH que l'HE, où l'huile de *T. algeriensis* avait une activité modérée traduite par une valeur élevée de IC_{50} (547,68 µg / mL).

L'huile de *M. spicata* présentait une activité considérable de piégeage des radicaux libres selon Hussain, A et al [7], l'huile essentielle marque une valeur IC_{50} de 13,3 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Dorman et al [8] ont établi que différents isolats de *Mentha* étaient capables de piéger le radical DPPH dans l'ordre décroissant suivant; *M. piperita* > *M. dalmatica* et *M. spicata*.

Une autre étude de Mata, A [9] a montré que l'extrait éthenolique présente de très bonnes activités d'élimination des radicaux DPPH ($IC_{50} = 5.7 \pm 0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$).

I.2. Activité antiradicalaire ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ de coloration bleu-verte en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

Nous avons déterminé pour chaque extrait le pourcentage IC_{50} mg / ml ; Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox et d'acide ascorbique à capturer l'ABTS.

D'après le tableau 20, les activités antioxydantes varient considérablement entre les différents extraits des trois plantes étudiées. En comparant les valeurs d' IC_{50} , on constate que, les HE posséder une activité anti-radicalaire plus élevée que les extraits éthanoliques. L'extrait éthanolique de *M.spicata* et d'*O. Basilicum* a démontré une activité antiradicalaire plus élevée que l'extrait éthanolique de *T. algeriensis*, ce qui peut être attribué à sa haute teneur en phénols (rutine, acide vanillique, épicatechine, ellagic); ces composés sont responsables du piégeage du radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ en fournissant H^+ .

La Comparaison de nos résultats avec les travaux antérieurs sur la plante *d'ocimum basilicum* , Nous constatons qu'ils sont presque identique : les huile essentielles sont plus actif visa vis l'ABTS que les extraits éthanoliques .

Coelho, J A trouvé que l'extrait éthanolique de basil possède une valeur $IC_{50} = 5.38 \pm 0.23 \text{ mg} / \text{ml}$ alors que l'huile essentielle obtenue par extraction de fluide supercritique a marqué une IC_{50} égal a $1.74 \pm 0.05 \text{ mg} / \text{ml}$ [10].

De même, Bayala et son équipe ont suggéré que L'huile essentielle du basilic qui contiennent es monoterpènes les monoterpènes oxygénés, tels que le thymol, le carvacrol et l' α -terpinéol, (principalement responsables du potentiel antioxydant des

huiles végétales) montrent une activité antiradicalaire élevée.(0.69 ± 0.03 mmol TE/g) [11].

En outre, une étude réalisée par sur l'activité antioxydante (exprimée en IC_{50} (mg/l) d'huiles essentielles et d'extraits éthanoliques de *T. algeriensis* irradiés par rayons gamma à différentes doses (0, 10, 20 et 30 kGy). A donné une faible activité antiradicalaire par test d'ABTS (du 7.64 a 11.01 mg/l pour l'huile essentielle et du 20.37 a 33.16 mg/l pour l'extrait éthanolique) [12].

Dans la méthode ABTS, tous les échantillons du *T.algerinsis* étudiés par Bendjabeur (huiles et EE) ont montré des activités significatives similaires ou meilleures que celles des standards (Trolox et BHT) [13].

L'HE a montré un taux de piégeage des radicaux plus élevé que l'extrait de méthanol.

Malgré le même mécanisme de transfert d'électrons unique rapporté pour les deux méthodes, le même composé phénolique peut avoir une cinétique d'oxydation différente selon le test utilisé et par conséquent avec un comportement différent, bien que le même mécanisme . Dans certains composés volumineux, le test ABTS est supérieur au test DPPH en raison de l'encombrement stérique. De plus, les composés hydrophiles et lipophiles peuvent être testés pour leur activité antiradicalaire en utilisant le test ABTS $\cdot^+$ [6].

En mettant en évidence la plante de menthe, et en comparant notre échantillon d'huile essentielle avec un autre échantillon de la région de Bejaia en Algérie, nous constatons une similitude dans les résultats obtenus en ce qui concerne le test ABTS ($IC_{50} = 36.2 \pm 3.2$ µg /ml) [13].

Avec une différence dans les valeurs IC_{50} dans les deux tests (DPPH et ABTS), malgré la similitude du mécanisme d'interaction, Cela est probablement dû aux facteurs stériques qui contribuent largement à la réduction du radical DPPH $\cdot$ stable. [13] , et c'est ce que notre étude indique.

I.3. Test de FRAP

Le tableau 4 montre les valeurs AEAC pour les extraits éthanoliques et les huiles essentielles obtenus à partir des plantes étudiées, ainsi que celui de BHA, qui a été choisi comme antioxydant standard. Une attention considérable a été accordée à la détermination de la capacité antioxydante totale en utilisant l'activité antioxydante de l'acide ascorbique en termes d'équivalence et reflétée dans l'AEAC, définie comme la concentration d'acide ascorbique (µg / mL) qui donne un pouvoir antioxydant

équivalent à celui de une concentration de 1 mg / mL de l'OE et de l'EE. Un AEAC élevé indique une capacité antioxydante notable [14].

Par rapport à celle du contrôle positif, l'EE d'*O. Basilicum* avait l'activité la plus puissante (AEAC de $3,657 \pm 0,009$ $\mu\text{g} / \text{mL}$), suivie par l'EE de *M.spicata* (AEAC de $2,332 \pm 0,018$ $\mu\text{g} / \text{mL}$) et enfin l'EE de *T.algeriensis* (AEAC= $0,897 \pm 0,064$). Cependant, l'EE de *T. algeriensis* a démontré un potentiel antioxydant inférieur, avec une IC_{50} de $0,897 \pm 0,064$ $\mu\text{g} / \text{ml}$). Notamment, les OE des deux plantes *M.spicata* et *T.algeriensis* ont démontré un potentiel de réduction du Fe_2^{+} très élevé par rapport à l'HE d'*O. Basilicum*.

Selon Gülçin, Aux différentes concentrations, l'extrait ethanolic d'*Ocimum basilicum* a montré une capacité à réduire le fer plus élevées que le contrôle et ces différences étaient statistiquement significatives ($p < 0,05$) [15].

Pour les mesures des capacités réductrices d'HE de *Thymus algeriensis*, la transformation de $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$ en présence d'huiles a été étudiée par Nikolić 2014. Le pouvoir réducteur le plus élevé a été enregistré pour *T. algeriensis* ($\text{IC}_{50} = 0,68$ g / ml) [16].

Hazzit a indiqué dans sa précédente étude que Les pouvoirs réducteurs des huiles de *T. algeriensis* pauvres en thymol ou carvacrol étaient nettement inférieurs à ceux des huiles essentielles riches en ces deux phénols. Ce résultat suggère qu'il pourrait y avoir une relation étroite entre ces deux composés phénoliques et le pouvoir réducteur, en raison des substitutions hydroxyles dans le cycle aromatique, qui possèdent de puissantes capacités de don d'hydrogène [17].

De nombreuses études s'intéressent au suivi de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la menthe (*M. spicata*), parmi lesquelles une étude de Chauhan, S [18], qui prouve que l'huile de menthe possède une très forte capacité à réduire le complexe ferricynide (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) et qui est équivalente même à l'activité des produits de contrôle.

Le pouvoir réducteur maximal a été observé dans l'huile de collection Tanakpur en Inde, avec une absorbance à 700 nm (A_{700}) ($2,873-4,000 (\pm 0,003-0,000)$),

comparable à celle du BHT standard, de la catéchine et de l'acide gallique ($A_{700} = 4.000 \pm 0,000$) [18].

Les résultats d'une autre étude concernant le pouvoir réducteur (FRAP) de l'extrait phénolique de *M.spicata*, démontrent clairement que l'extrait aqueux de feuille de *M. spicata* est riche en composé phénolique et possède un pouvoir réducteur élevé. Où la concentration d'extrait qui peut fournir une absorbance de 0,5 (EC_{50}) a été déterminée à partir du graphique de l'absorbance par rapport à la concentration d'extrait ($EC_{50} = 0.026 \pm 0.001$ mg/mL) [19].

I.4. Test du phosphomolybdate

Les différents extraits d'*O. Basilicum*, de *T. algeriensis* et de *M.spicata* ont également été utilisés pour déterminer leurs capacités antioxydantes à partir de la formation du complexe de phosphomolybdène vert. Les activités antioxydantes des extraits ont été référencées à celles de l'acide ascorbique en termes d'équivalence en calculant la valeur AEAC. Cette méthode est basée sur la réduction du molybdène d'un état d'oxydation VI à un état d'oxydation V en présence d'un antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre détectable dans le visible à 695 nm à un pH acide [20].

Les résultats indiquent que dans les conditions expérimentales appliquées, les HE des trois plantes sont de puissants antioxydants, tandis que leurs extraits phénoliques ont le plus faible potentiel de réduction du molybdène. L'huile d'*Ocimum basilicum* a enregistré l'AEAC le plus élevé, qui a dépassé l'AEAC de la vitamine E dans les mêmes conditions expérimentales.

Ce résultat peut être attribué à la composition chimique de l'huile d'*O. Basilicum*, qui contenait principalement 92% de monoterpènes oxygénés, avec le linalol comme composé prédominant [21].

I.5. Corrélation entre teneur en polyphénols totaux et activité antioxydante

Afin de confirmer que l'activité antioxydante des extraits phénoliques des trois plantes étudiées issue de leurs richesses en composés phénoliques, nous avons essayé de trouver des corrélations linéaires entre les valeurs de capacité antioxydante de nos extraits avec leurs contenue en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux. (Figure 31 et 32).

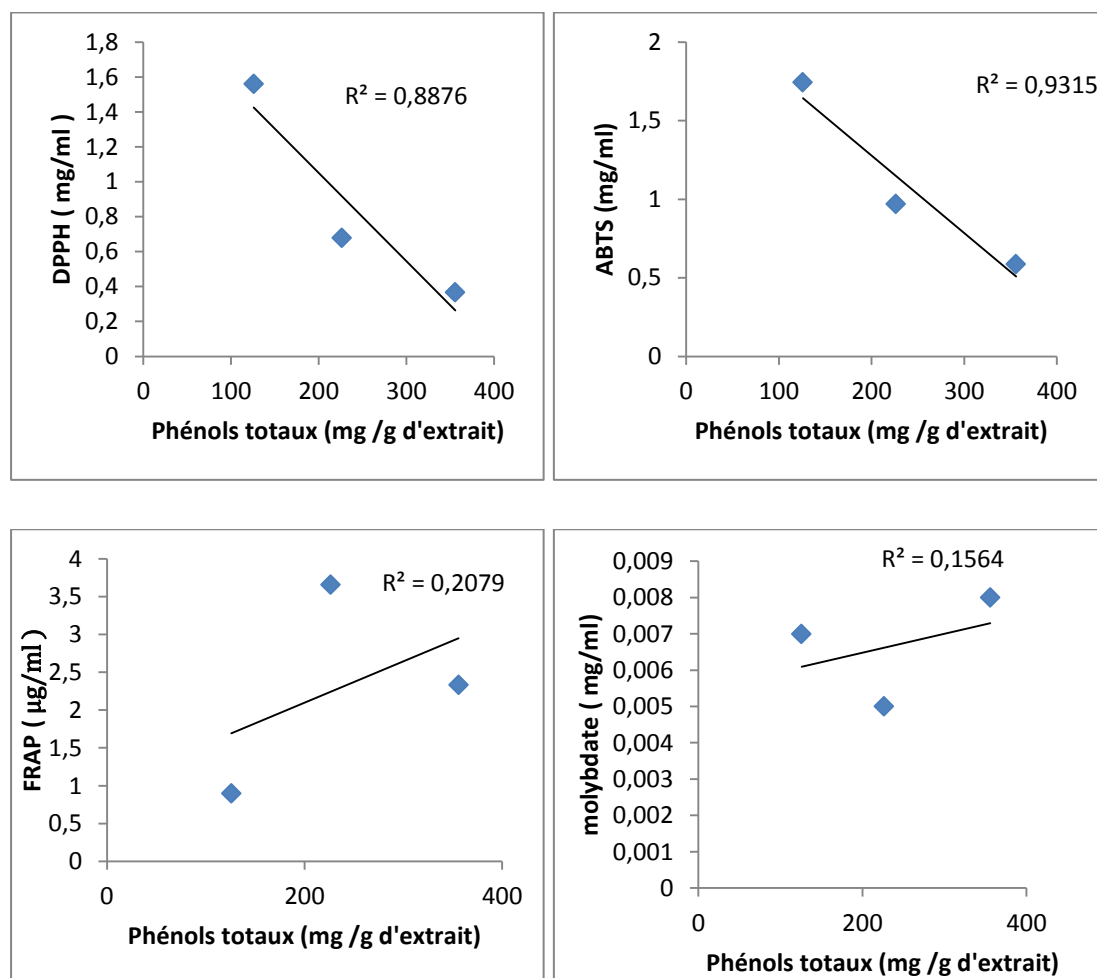


Figure 31 : Corrélation entre teneur en phénols totaux et tests d'activité antioxydante.

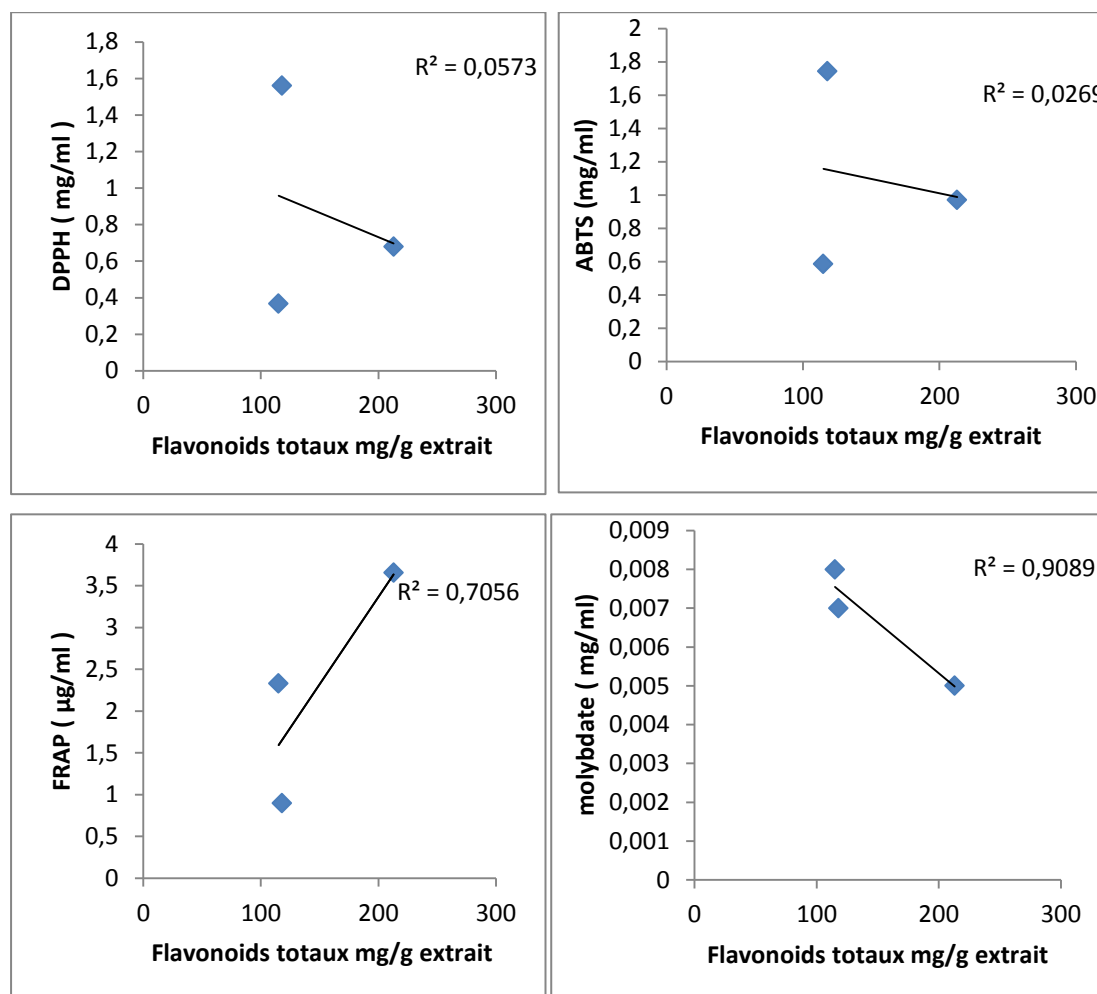


Figure 32 : Corrélation entre teneur en flavonoïdes totaux et tests d'activité antioxydante.

D'après ces tracés, une corrélation significative est observée entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire DPPH et ABTS avec $R^2 = 0,887$ et $R^2 = 0,931$ respectivement, Alors cette coordinance confirme que l'activité antiradicalaire est due principalement à la teneur élevée en polyphénols totaux dans les extraits des plantes. Mais pas forcément les flavonoïdes, ces derniers ont enregistré des coefficients de corrélation faibles vis-à-vis le radical DPPH et ABTS (figure 32). L'activité antioxydante élevée est due à l'effet inductif des trois groupes hydroxyles de l'acide gallique et aussi à la présence de l'acide p-coumarique [22],[23].

D'autres travaux ont montré que l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide

férulique, l'acide p-coumarique et la catéchine possèdent de forte corrélation positive entre les activités du piégeage des radicaux (DPPH, ABTS⁺) l'acide gallique et la catéchine sont étroitement corrélés à l'activité de chélation des métaux et l'inhibition de la peroxydation lipidique [24].

Après toutes les combinaisons effectuées, nous enregistrons l'absence de corrélation entre les deux tests du pouvoir antioxydant (FRAP et Molybdate) et les teneurs en polyphénols, cette confirmation est largement répandue dans la littérature [25].

Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols exige une activité antioxydante puissante [26].

La seule explication de l'absence de cette corrélation est du à la synergie des composés phénoliques dans les extraits alcoolique [27] , et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules. C'est pourquoi les deux extraits *T.Algeriensis* et *M.spicata* , comme avec des teneurs plus au moins comparables en flavonoïdes de l'ordre de 114 mg ER/ g et 118 mg ER/g respectivement peuvent présenter des changements remarquables dans leur activité antioxydante (cas de l'ABTS , réduction de fer, test de DPPH).

Les extraits des composés phénoliques révèle la présence d'une bonne corrélation entre les teneurs en flavonoïdes ($R^2 = 0,705$ et $0,908$) et les autres propriétés antioxydantes FRAP et MOLYBDATE

Ces correlations sont dues à la présence des flavonoïdes. Ces derniers possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante des flavonoides [28].

De plus nous avons cherché la présence d'une corrélation linéaire entre les quatre tests *in vitro* DPPH ,ABTS,FRAP et phosphomolybdate . Les graphiques nous permettent d'obtenir les codifient des corrélations regroupées dans la matrice suivante :

Tableau 21: Corrélation entre les quatres testes d'activité antioxydante des extraits éthanoliques des trois plantes étudiées.

	DPPH	ABTS	FRAP	PHOSPHOMOLYBDATE
DPPH	1			
ABTS	0,994	1		
FRAP	0,529	0,453	1	
PHOSPHOMOLYBDATE	0,004	0,02	0,405	1

Les activités d'inhibition des radicaux DPPH et ABTS présentaient une bonne corrélation $r = 0,994$, peut être expliquée par le fait que ces deux méthodes utilisent des mécanismes d'action similaires.

Et inversement aucune corrélation est observé entre les activités antiradicalaires et le test de phosphomolybdate cela peut être expliqué comme suit : les composés phénoliques responsables au pouvoir réducteur sont différents au composés phénolique piégeant des radicaux libre.

Cependant, cette faible corrélation est expliquée par le fait que le pouvoir réducteur est sensible au transfert d'électron, tandis que l'ABTS en plus de sa sensibilité au transfert d'électron, elle est aussi sensible au transfert d'atome d'hydrogene.

Selon Clark et al [29] il existe une corrélation négative entre ces trois tests, cela peut etre expliqué par l'existence d'une différence entre ces derniers, le DPPH qui est le piégeage des radicaux libres. Par contre, le pouvoir réducteur et le phosphomolybdate c'est la réduction des ions, en plus de ça chaque analyse reflète un aspect différent du comportement antioxydant d'un échantillon.

Nos résultats suggèrent que les trois plantes de la famille *lamiaceae* peuvent être considérées comme une source précieuse de produits antioxydants. de sorte que ces plantes cultivés en Atlas saharien algérien pourraient trouver un certain nombre d'applications industrielles, en particulier dans le domaine médical.

II. Activité antibactérien

Pour surmonter le problème de résistance des microorganismes vis-à-vis les antibiotiques, la plupart des travaux sont orientes actuellement vers d'autres agents antimicrobiens possédant un mode d'action tout à fait spécifique [7]. Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits

Phénoliques des trois plantes, des microorganismes causant pour la plupart des infections et des maladies nosocomiales ont été testés.

Lorsque des huiles sont soumises aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut être également critique même à l'état de traces, le solvant ne devrait pas empêcher la conduite du processus biologique [30]. Pour éviter toutes interactions possibles avec le solvant, les huiles ont été utilisées à l'état brut.

L'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur des huiles et des extraits a été quantitative par la détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI).

Les résultats de sensibilité des germes par la méthode de microdilution sont représentés dans le tableau 22.

La détermination des CMI des différents agents antimicrobiens testés dans cette étude a été réalisée par la méthode des puits (Partie expérimentale, chapitre 6). Cette méthode consiste à mettre en contact les bactéries avec différentes concentrations d'échantillons pendant 48 h. Après ce temps, il est possible de voir la première concentration, qui induit une inhibition des bactéries. Cette concentration est alors la CMI.

Plus les CMI sont faibles, plus l'activité antibactérienne des agents testés est meilleure.

Aligiannis et ses collaborateurs 2001 ont proposés une classification des extraits des matériels végétaux sur la base des résultats des CMI comme suit [31]:

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500 µg/ml.
- Inhibition modérée : CMI varie de 600 à 1500 µg/ml.
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1600 µg/ml.

Tableau 22 : Activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques et des huiles essentielles des plantes étudiés contre huit micro-organismes pathogènes exprimée en valeurs CMI ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

Extract	S. epidermidis	S. aureus	B. subtilis	E. coli	K. pneumoniae	p. aeruginosa	C. albicans	C. glabrata
<i>O.basilicum</i> EE	128	128	64	128	256	256	64	128
<i>T.algeriensis</i> EE	128	64	64	256	256	512	128	128
<i>M.Spicata</i> EE	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>O.basilicum</i> HE	32	32	16	64	128	256	32	32
<i>T.algeriensis</i> HE	32	32	32	64	256	512	64	32
<i>M.Spicata</i> HE	32	-	-	64	-	-	-	256
Ampicillin	2	2	4	16	64	128	-	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	-	2	2

Les extraits éthanoliques d'*O. Basilicum* et de *T. algeriensis* ainsi que leurs huiles essentielles ont été évalués en termes d'activité antimicrobienne potentielle contre un groupe de micro-organismes pathogènes, comprenant des bactéries gram-positives et gram-négatives et champignons.

Une activité antimicrobienne supérieure a été observée contre les bactéries gram-positives examinées dans cette étude, tandis que les extraits de plantes et les huiles essentielles ont démontré des activités modérées contre les bactéries gram-négatives. Fait intéressant, les activités antimicrobiennes observées après le traitement aux huiles essentielles semblaient généralement plus puissantes que celles associées aux extraits éthanoliques d'*O. Basilicum* et de *T. algeriensis*. Comme le montre le

tableau 22 , une activité antifongique modérée a été associée à la fois aux extraits éthanoliques et aux huiles essentielles d'*O. Basilicum* et de *T. algeriensis* lorsqu'ils ont été examinés contre *Candida glabrata* et *Candida albicans*.

L'huile de *Mentha spicata* a démontré un niveau variable d'activité antimicrobienne contre les micro-organismes examinés. la détermination de la concentration (CMI) a indiqué que l'huile essentielle était la plus active contre le *Staphylococcus epidermidis* à Gram positif avec une valeur de CMI de 32 µg \ mL

De nombreuses études documentaires ont fourni un soutien pour les activités antimicrobiennes de plusieurs des composés dans les extraits éthanoliques et les huiles essentielles de *O. basilicum* et *T. algeriensis*. Par exemple, la quercétine a été signalée comme un composé antimicrobien très efficace contre plusieurs bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif [32].

En outre, il a été démontré que les activités antibactériennes des flavonoïdes, tels que la quercétine, étaient efficacement améliorées en présence de rutine, un composant majeur des extraits éthanoliques des deux plantes, bien que la rutine n'ait pas montré d'activité seule [33].

Afin de caractériser l'activité biologique des huiles essentielles, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été examinée dans la présente étude. Fait intéressant, les rapports de la littérature sur l'association entre la composition phytochimique des huiles essentielles et son activité antimicrobienne se sont révélés être en grande cohérence avec les résultats de la présente étude. En particulier, les monoterpènes oxygénés étaient manifestement signalés comme un puissant agent antimicrobien dans la composition de plusieurs huiles essentielles [34]. De plus, le 1,8-cinéole et les sesquiterpènes ont montré une activité antimicrobienne considérable contre une large gamme de bactéries Gram-positives et Gram-négatives [34],[35].

L'huile essentielle de *T. algeriensis* est moins active comparée à l'essence d'*O. Basilicum* selon Amarti, F et al [36]. Cette faible activité peut être due à la présence dans l'huile de *T. algeriensis* de l' α -pinène, du β -pinène et du limonène reconnus par leur faible activité antibactérienne .

La même constatation a été rapportée par Giordani et al [37] qui ont montré que parmi les huiles de sept plantes aromatiques et médicinales différentes de

l'Algérie, l'essence de *T. algeriensis* a présenté la plus faible activité antifongique contre *Candida albicans*.

L'activité antimicrobienne est aussi attribuée au phénomène de synergie entre les composants minoritaires des huiles essentielles [38]. Les interactions entre ces composants peuvent être à l'origine d'une activité plus élevée par rapport à celle prévisible pour les composés Majoritaires [39],[40] .

Cependant, comme les huiles essentielles contiennent de multiples composants, leurs activités antimicrobiennes sont plutôt dues à l'action additive ou synergique de plusieurs composés chimiques agissant sur un ou plusieurs sites cibles [39].

La sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles dépend aussi de la composition de leur membrane externe. Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries à Gram positif [41],[42].

Ceci est dû à leur membrane externe qui est constituée d'une barrière de perméabilité efficace. Le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes [43].

En raison de l'absence de cette barrière, les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, leur faible teneur en phospholipides permet le contact direct des constituants hydrophobes des huiles essentielles [41].

III. Activité anticancéreuse

Nous avons évalué l'activité de nos différents extraits sur le taux de croissance globale des lignées de cellules cancéreuses du sein (MCF-7, MDA-MB 231), du col de l'utérus humain (HeLa) , du prostate humain (PC3), du leucémie humaine (K562) , du colon (HCT-116) , du carcinome canalaire humain (T47D) à l'aide du test colorimétrique de cytotoxicité MTT. Il a permis de déterminer, pour chaque extrait testé, les indices LD₅₀ (la concentration à laquelle la survie des cellules cancéreuses a été réduite de 50%.) à partir des courbes dose-réponse de cytotoxicité (figure 33 et 34).

Le tableau 23 reprend les résultats du test de cytotoxicité MTT des différents composés testés, sur les lignées cellulaires. Les courbes dose-dépendantes obtenues par régression non linéaire ont été utilisées pour calculer les valeurs de LD₅₀. La

doxorubicine, un agent anticancéreux bien connu, a été utilisée comme contrôle positif et a démontré des valeurs de LD₅₀ allant de 1 à 20 µg / ml contre les différentes lignées de cellules cancéreuses utilisées dans cette étude.

Tableau 23: Activités antiprolifératives des extraits phénoliques et d'huiles essentielles des trois plantes étudiées sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines, temps d'exposition 48 h. Les valeurs de LD₅₀ (µg / mL) sont affichées ±SD

Extrait	MCF-7	MDA-MB-231	HeLa	Pc3	K562	T47D	HCT-116
<i>O.basilicum</i> EE	> 10,000	> 10,000	> 10,000	> 10,000	> 10,000	-	-
<i>T.algeriensis</i> EE	> 10,000	> 10,000	> 10,000	> 10,000	> 10,000	-	-
<i>M.spicata</i> EE	-	-	-	-	-	-	-
<i>O.basilicum</i> HE	1090±64	1012±44	1052±38	1028±78	929±18	-	-
<i>T.algeriensis</i> HE	647±16	715±22	746±19	1067±96	300±13	-	-
<i>M.spicata</i> HE	975±156	-	-	-	-	324±81	279±52

Généralement, les huiles essentielles des plantes étaient beaucoup plus efficaces pour supprimer la croissance des cellules cancéreuses que les extraits éthanoliques.

Sur la lignée cellulaire K 562, les résultats indiquent que tous les huiles essentielles de feuilles de *T. Algeriensis* et *d'O.basilicum* ont visiblement des effets antiprolifératifs sur cette lignée cellulaire. Le meilleur résultat sur les K 562 a été obtenu avec le *T. Algeriensis*, qui a montré une LD₅₀ de 300±13 µg /mL

Concernant la lignée MCF7 par le même test; La meilleure activité est obtenue avec l'huile essentielle du *T.algeriensis* : une LD 50 égal à 647 ± 16 µg/ml, suivi d'huile de *M.spicata* avec une LD₅₀ de 975 ± 156 µg/ml et enfin l'huile *d'O.basilicum* LD₅₀=1090±64 µg /ml.

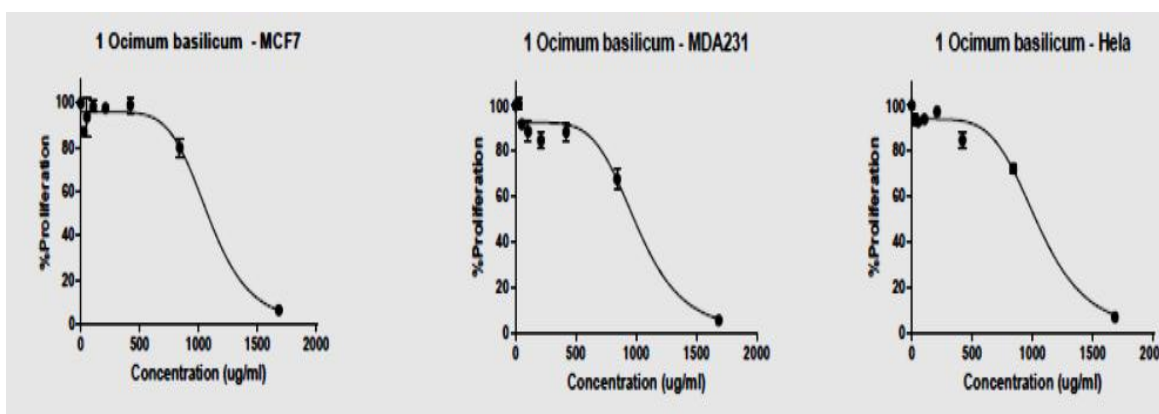


Figure 33: Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de *O. Basilicum* sur trois lignées cellulaires cancéreuses, temps d'exposition 48 h.

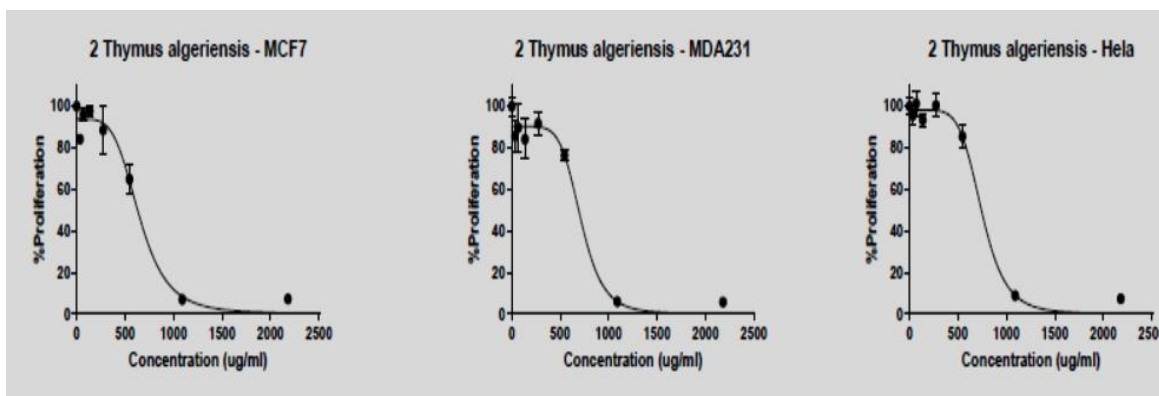


Figure 34 : Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de *T. Algeriensis* sur trois lignées cellulaires cancéreuses, temps d'exposition 48 h.

L'huile hydrodistillée *M. spicata* a été évaluée pour ses caractéristiques antiprolifératives *in vitro* sur trois lignées cellulaires de cancer humain, y compris la lignée cellulaire MCF-7 d'adénocarcinome du sein humain, la cellule T47D de la tumeur épithéliale du sein canalaire humain et le cancer du côlon humain HCT-116.

LD₅₀ a été calculée sur la base des courbes dose-dépendantes et était de $324 \pm 81 \mu\text{g} / \text{mL}$, $279 \pm 52 \mu\text{g} / \text{mL}$ et $975 \pm 156 \mu\text{g} / \text{mL}$ pour les lignées cellulaires T47D, HCT-116 et MCF-7, respectivement . Les activités anticancéreuses observées sur les trois lignées cellulaires cancéreuses examinées peuvent être attribuées à l'abondance significative de certains des composants anticancéreux les plus naturellement actifs de l'huile, tels que le 1,8-cinéole et le limonène [44].

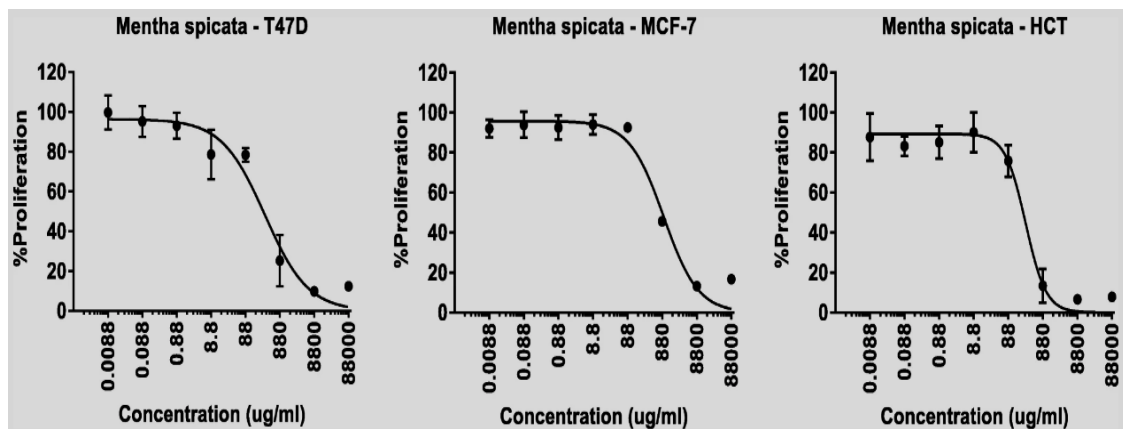


Figure 35 : Activités antiprolifératives de l'huile essentielle de *M. spicata* sur trois lignées cellulaires cancéreuses, temps d'exposition 48 h.

La résistance pléiotropique aux agents chimiothérapeutiques (Multidrug Resistance ou MDR) est la diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses, et par conséquent la réduction de l'efficacité du traitement, C'est une obstacle majeur pour le traitement de nombreuses pathologie malignes, notamment pour ceux qui ne peuvent pas être traités par chirurgie ou radiothérapie, dont les leucémies, les lymphomes, les sarcomes et la plupart des carcinomes, en particulier hépatiques, rénaux, surrénaux et coliques [45],[46].

Les différents mécanismes qui peuvent induire la résistance sont très complexes et très divers, et pourrait être due à l'altération du métabolisme du médicament, l'altération de la cible du médicament, l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN et la modification de l'expression des gènes apoptotiques [47]. De plus, Cette résistance multi-drogues (MDR) pour cette large catégorie de chimiothérapies est associée a une diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments soit par la diminution de l'entrée du médicament dans la cellule ou l'augmentation de l'efflux du médicament de la cellule par l'augmentation de l'expression du produit d'un gène fortement conservé. plusieurs efforts sont investis

dans l'identification de produits naturels ayant des propriétés réversantes, permettant d'inhiber les transporteurs membranaires, de renverser le phénotype MDR envers différentes médications, et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie conventionnelle sans les effets secondaires rapportés avec les inhibiteurs classiques des transporteurs membranaires. C'est dans ce contexte que l'utilisation des extraits des plantes fait actuellement l'objet de nombreuses recherches [48-50].

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses; d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose.

Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de la prostate; ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (Fatty Acid Synthase) [51].

Les travaux réalisés par Mahmoud, N. N. [52] et Depeint *et coll* [53]; montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine, sont les deux flavonoïdes les plus conseillées pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal; tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toutefois Caltagirone *et coll.* 2000 [54]; Depeint *et coll.* 2002 [53] signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer, est plutôt assurée par toutes les flavonoïdes.

Quelques composés phénoliques (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les quinones, les coumarines) ont prouvé une activité antioxydante efficace et ont également prouvé des activités anticancéreuses/anticarcinogénique/antimutagénique [55].

L'action antitumorale des HE est liée à l'activation des cibles moléculaires menant à la mort de la cellule cancéreuse sans altérer les cellules normales. Un grand nombre d'études suggèrent que les constituants des HE, tels que le carvacrol, constituent une nouvelle classe de drogues anticancéreuses très frappantes dans la régression des tumeurs avec une toxicité limitée [56].

Nikolic et al. ont montré l'activité cytotoxique des HE de cinq espèces de la famille de *Lamiaceae* (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja montana* et *Salvia lavandulifolia*) contre des lignées tumorales des cellules de *carcinome* (HeLa), *Adenocarcinoma* (A549) et de cellules fibroblastiques cancéreuses de fœtus humain (MRC-5).

L'huile a également révélé l'activité cytotoxique la plus élevée contre les lignées cellulaires testées, présentant des valeurs IC₅₀ de 40,13 à 65,51 g / ml, avec une légère sélectivité envers les cellules HeLa observée par rapport à la lignée cellulaire normale (MRC-5) [16].

Rahimifard et al. (2010) ont démontré que les six espèces de *Mentha*, y compris les extraits et les huiles essentielles de *M. piperita* et *M. pulegium*, étaient toxiques contre les lignées cellulaires Vero, Hela et Hep2 à différentes concentrations. Cette espèce a été largement étudiée pour sa composition chimique et son profil pharmacologique [57].

Selon les données de la littérature, l'activité antiproliférative d'*O. basilicum* huile essentielle et des extraits ont été étudié par Zarlaha et al. in vitro, sur quatre lignées cellulaires cancéreuses humaines différentes: les cellules HeLa de l'adénocarcinome du col humain, les cellules FemX du mélanome humain, les cellules K562 de la leucémie myéloïde chronique humaine et les cellules SKOV3 ovariennes humaines. Les principaux constituants de l'OE et des extraits, tels que l'eugénol, l'isoeugénol, le linalol, l'acide caféique et l'acide rosmarinique ont également été étudiés. Dans cette étude, l'isoeugénol, l'eugénol, le linalol et l'acide caféique présentaient une cytotoxicité élevée et une activité anticancéreuse contre les cellules ovariennes humaines SKOV3. En comparant nos et leurs résultats sur les cellules HeLa et K562, on a pu voir que notre extrait et l'huile essentielle présentent une activité légère mais notable [58].

L'activité anticancéreuse in vitro de l'HE d'*O. basilicum* a été examinée en utilisant un dosage de méthylthiazol tétrazolium contre la lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus humain (HeLa) et la lignée cellulaire de carcinome épithélial du larynx humain (Hep-2). Les valeurs IC₅₀ obtenues étaient respectivement de 90,5 et 96,3 µg / mL [59].

De même, l'huile essentielle du *Thymus algeriensis* from lybia présente une forte activité anticancéreuse contre quatre cellules tumorales humaines : NCI-H460, MCF-7, HCT-15 et AGS avec des valeurs de LD₅₀ allant de 62,12 a 64,79 µg / ml [16].

L'activité antitumorale de l'huile essentielle du *Thymus algeriensis* maroain ainsi que celle de deux composés purs (carvacrol et thymol) a été évaluée par rapport à la lignée cellulaire tumorale P815. Les résultats montrent que cette huile a un effet cytotoxique important et que le carvacrol est le produit cytotoxique le plus important et qui représente le composé majoritaire [60].

On ce qui concerne la plante *M.Spicata* , selon Fitsiou et al , l'huile de menthe verte était puissante contre la lignée cellulaire THP-1 (EC₅₀ = 0,71 ± 0,004 mg / mL), alors qu'elle présentait une activité similaire contre la lignée cellulaire HepG2 et MCF-7 (EC₅₀ = 0,22 ± 0,038 mg / mL et EC₅₀ = 0,284 ± 0,02 mg / mL, respectivement)). Les cellules Caco2 étaient les plus sensibles à l'huile de menthe verte (EC₅₀ = 0,162 ± 0,0035 mg/ml) [61].

L'huile de menthe verte s'est également révélée être un puissant agent antiprolifératif contre les cellules KB, P388, LNCaP et MCF-7 après 24 h d'incubation [62],[63].

Le basilic doux ainsi que la menthe verte appartiennent à la famille des *Lamiacées* et de nombreuses huiles essentielles de plantes de cette famille ont également reçu une grande attention et étudié pour leurs effets antioxydants et antiprolifératifs ou synergiques possibles avec les médicaments chimiothérapeutiques conventionnel . [63].

En fait, les résultats des recherche précédentes ont révélé que plusieurs monoterpènes tels que le D-limonène (sur les cellules PZ-HPV-7 de la prostate épithéliale humaine), l'a-pinène, le myrcène et le linalool (sur les cellules rénales de singe Vero), et la stylosine (sur les cellules de fibroblastes fœtaux humains) pourrait avoir des effets cytotoxiques. [64-66].

L'activité cytotoxique est fortement liée à la présence des composés terpéniques et phénoliques bioactifs. Cependant, les mécanismes physiologiques et

moléculaires impliqués dans les propriétés antitumorales des HE ne sont pas clairs. Il existe plusieurs cibles moléculaires sur lesquelles agissent les huiles essentielles pour inhiber et/ou arrêter la prolifération des cellules tumorales. Elles peuvent induire l'apoptose activant les protéines proapoptotiques directement ou via les voies de signalisation, arrêter le cycle cellulaire directement ou via l'inhibition de l'activité des protéines-kinases, et elles peuvent modifier le potentiel membranaire des cellules cancéreuses. Étant donné que les HE sont riches de plusieurs composés, on peut avoir l'effet de plusieurs mécanismes générant ainsi une action amplificatrice [56].

Cependant, malgré de nombreuses études montrant l'évaluation des mécanismes d'action possibles de ces composés, la majorité des études ne présentent toujours que des données de dépistage préliminaires et ne décrivent donc aucun mécanisme d'action. Pour ces études, les monoterpènes sont classés uniquement comme «actifs». Ainsi, des recherches supplémentaires doivent être développées pour élucider comment divers monoterpènes agissent pour inhiber la prolifération et induire la mort des cellules tumorales [67].

IV. Conclusion

Tous les extraits ; et spécialement les HEs montrent des activités antioxydantes importantes (DPPH, ABTS, FRAP et du phosphomolybdate). L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits vis-à-vis de 8 microorganismes s'est révélée modérée avec des actions renforcées contre les bactéries gram-positives. Les EEs possèdent une activité anticancéreuse du test MTT faible par rapport aux HEs, ces derniers enregistrent des valeurs LD₅₀ considérables contre les 7 lignées cellulaires testées variant entre 279 et 1090 µg / mL. l'huile essentielle de *T. Algeriensis* a montré une activité remarquable contre la lignée cellulaire MCF-7.

Références

- [1] Mărghitas L A , Stanciu O G , Dezmirean D S , Bobis O , Popesar O , Bogdanov S , and Campos M G. In vitro antioxidant of honey bee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food chemistry*. 2009.115 :878-883.
- [2] Popovici C , Saykova I , and Tylkowski B .Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 2009. 4 :25-39.
- [3] Gülçin İ , Elmastaş M, & Aboul-Enein H Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*. 2007.21(4) :354–361.
- [4] Kaurinovic B , Popovic M , Vlaisavljevic S , & Trivic S. Antioxidant Capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. Extracts. *Molecules*. 2011. 16(9) : 7401–7414.
- [5] Hussain A I, Anwar F, Hussain Sherazi S T, & Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 2008. 108(3) : 986–995.
- [6] Bendjabeur S , Benchabane O , Bensouici C , Hazzit M , Baaliouamer A , & Bitam A. Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018. 12 (4) : 2278-2288.
- [7] Hussain A I, Anwar F, Shahid M , Ashraf M , & Przybylski R. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata*L.) From Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*. 2010. 22(1) : 78–84.
- [8] Dorman H J D , Koşar M, Kahlos K, Holm Y , & Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 51(16) : 4563–4569.

- [9] Mata A T , Proença C , Ferreira A R , Serralheiro M L M , Nogueira J M F , & Araújo M E M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*. 2007.103(3) :778–786.
- [10] Coelho J, Veiga J, Karmali A , Nicolai M , Pinto Reis C , Nobre B , & Palavra A. Supercritical CO₂ Extracts and Volatile Oil of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Comparison with Conventional Methods. *Separations*, 2018.5(2) : 21.
- [11] Bayala B , Bassole I H N , Gnoula C , Nebie R , Yonli A , Morel L , Simpure J. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Essential Oils of Plants from Burkina Faso. *PLoS ONE*. 2014. 9(3) : e92122.
- [12] Douar-Latreche S , Benchabane O , Sahraoui N , Hazzit M , Mouhouche F , & Baaliouamer A. Effect of Gamma Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Thymus algeriensis* Extracts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2018. 21(2) : 449 461.
- [13] Brahmi F , Adjaoud A , Marongiu B , Falconieri D , Yalaoui-Guellal D , Madani K , & Chibane M. Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. Leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 2016. 28(3) : 211–220.
- [14] Amarowicz R, Troszyńska A. Nnina Baryłko-pikielna, Fereidoon ShahidI. Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *J Food Lipids*. 2004. 11(4):278–86
- [15] Gülçin İ , Elmastaş M, & Aboul-Enein H Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*. 2007.21(4):354–361.
- [16] Nikolić M , Glamočlija J , Ferreira I C F R, Calhelha R C, Fernandes Â, Marković T, Soković M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014.52 :183–190.

- [17] Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo A R , Faleiro M L , & Miguel M G. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry*. 2009. 116(3) :714–721.
- [18] Chauhan S S , Prakash O , Padalia R C , Vivekanand Pant A K , & Mathela C S. Chemical Diversity in Mentha spicata: Antioxidant and Potato Sprout Inhibition Activity of its Essential Oils. *Natural Product Communications*. 2011. 6(9) :1934578X1100600.
- [19] Bayani M, Ahmadi-Hamedani M, Jebelli Javan A. Study of Hypoglycemic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Activities of Iranian *Mentha Spicata* Leaves Aqueous Extract in Diabetic Rats. *Iran J Pharm Res*. 2017.16(Suppl):75–82.
- [20] Lu Y, Foo Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem*. 2001.75:197–202.
- [21] Jamali C A, El-Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, Abbad A. Chemical composition and antioxidant and Anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan Thymus species. *Chem Biodivers*. 2012.9(6):1188–97.
- [22] Sánchez-Moreno C , Larrauri J A , Saura-Calixto F .A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.*Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998.76: 270-276.
- [23] Benhammou N , Atik Bekkara F , Kadifkova Panovska T. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr. J. Pharm Pharmacol*. 2008.2 (2): 022-028.
- [24] Tsai M C , Song T Y , Shih P H , Yen G C . Antioxidant properties of water soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Food Chem*. 2007.104: 1115-1122.
- [25] Sun T , Ho C-H. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*. 2005.90: 743–749.

- [26] Moure A , Cruz J M , Franco D, Dominguez J M , Sineiro J, Dominguez H, Núñez M J , Parajo J C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001.72: 145–171.
- [27] Rice-Evans C A, Sampson J , Brameley P M , Holloway D E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vitro?. *Free Radical Res.* 1997. 26: 381-398.
- [28] Cai Y-Z. Sun M , Xing J , Luo Q , Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006.78: 2872-2888.
- [29] Clark G, Ting KN, Wiart C et Jeffrey F. Hingh correlation of 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical scavenging, Ferric reducing activity potential and total phenolic content indficates redundancy in use of all three assay to screen for antioxidant activity of extracts of plant. *From the Mlaysiaian Rainforest antioxidant.* 2013.2 :1-10.
- [30] Yrjöen T .Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. 2004. P 76.
- [31] Aligiannis N, Kalpoutzakis E , Mitaku S, and Chinou I B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 2001.49:4168–4170.
- [32] Bardaweel S K, Hudaib M M, Tawaha K A, Bashatwah R M. Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015.2015:790838.
- [33] Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002.66(5):1009–14.
- [34] Knobloch K, et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1989.1(3):119–28.
- [35] Baratta M T, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragrance J.* 1998.13(4):235–44.

- [36] Amarti F , et al. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*. 2009. 6 (6): p. 342.
- [37] Giordani R, Hadeff Y, & Kaloustian J . Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*. 2008.79 :199-203
- [38] Cao L , Yong Si J , Liu Y, Sun H, Jin W, Li Z, Hong Zhao X, Le Pan R. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* (Maxim). *Food Chem*. 2009.115 : 3801 – 805
- [39] Al-Bayati F A .Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol*. 2008.116:403-406.
- [40] Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, Brat P, Lebrun M, Romestand B, Menut C, Andrianoelisoa H S, Rahehimandimby M, Danthu P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*. 2009.114 :680-684.
- [41] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol*. 2004.94 :223-253.
- [42] Holley R A , Patel D, Improvement in shelf-life and safety of perishable compounds from leaf essential oil and smoke antimicrobials. *Food Microbiol*. 2005. 22 : 273- 292.
- [43] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003.67:593-656.
- [44] Yang C, et al. Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel. *Molecules*. 2017. 22(8):1391.
- [45] Gerhard T, Gerhard H. Rôle de la résistance multi-drogues dans les tumeurs génitourinaires. *Progrès en Urologie*. 1993. 3: 385-392.
- [46] Meschini S, Calcabrini A, Monti E, Del Bufalo D, Stringaro A, Dolfini E, Arancia G. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 2000.87(5): 615-628.

- [47] Manju S, Shaoqin G . Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances*. 2013.31: 1397–1407.
- [48] Shu-Qi W, Xia L, Xiao-Ning W, Na-Na W, Hong-Xiang L. Coumarins from *Cicuta virosa* and their modulating effects on multidrug-resistant (MDR) tumors. *Phytochemistry Letters*. 2011.4: 97–100.
- [49] Hengrui Z, Zulong L, Lisha T, Junhua L, Mei Z, Fang X , Zheng W, Yuqi W, Sida S, Lihong H, Long Y . Reversal of P-gp and MRP1-mediated multidrug resistance by H6, a gypenoside aglycone from *Gynostemma pentaphyllum*, invincristine-resistant human oral cancer (KB/VCR) cells. *Eur J Pharmacol*. 2012. 696: 43–53
- [50] Victor K, Igor KV, Roger T, Armelle T M, Benjamin W, Veronique P B, Thomas E . Cytotoxicity of *Elaeophorbia drupifera* and other Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multidrug resistant cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*. 2013.13:250.
- [51] Brusselmans K , De Schrijver E , Verhoeven G , & Swinnen J V. RNA Interference–Mediated Silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase- α Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 2005.65(15) :6719–6725.
- [52] Mahmoud N N. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*. 2000.21(5) :921–927.
- [53] Depeint F , Gee J M , Williamson G , & Johnson I T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2002 .61(01): 97–103.
- [54] Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB & Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer*. 2000.87 :595–600.
- [55] Xiao C H , Yang S S , Hong X K. The Chemistry of Traditional Chinese Medicines. *Shanghai Science and Technology Publishing House*, Shanghai. 2000.
- [56] Bouyahya A , Abrini J , Bakri Y , & Dakka N. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*. 2016.14.
- [57] Rahimifard N M , Haji H , Hedayati M H , Bagheri O , Pishehvar H , Ajani Y. Cytotoxic effects of essential oils and extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep2 cell lines. *J. Med. Plants* .2010. 9 (35) : 88–92.

- [58] Zarlaha A, Kourkoumelis N, Stanojkovic T, Kovala-Demertzi D. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *Ocimum basilicum* against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor. *J. Nanomater. Biostruct.* 2014 .9 : 907–917
- [59] Shirazi M T, Gholami H , Kavooosi G, Rowshan V, & Tafsiry A. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science & Nutrition.* 2014. 2(2) :146–155.
- [60] Jaafari A , Mouse H A, Rakib E M , M'barek L A , Tilaoui M , Benbakhta C, Ziad A. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2007. 17(4) : 477–491.
- [61] Fitsiou E , Mitropoulou G , Spyridopoulou K , Tiptiri-Kourpeti A , Vamvakias M , Bardouki H , Pappa A. Phytochemical Profile and Evaluation of the Biological Activities of Essential Oils Derived from the Greek Aromatic Plant Species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. *Molecules.* 2016.21(8) : 1069.
- [62] Manosroi J , Dhumtanom P, Manosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 2006. 235 :114–120.
- [63] Hussain A I , Anwar F , Nigam P S , Ashraf M, Gilani A H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agric.* 2010. 90:1827–1836.
- [64] Silva SL, Figueiredo PM and Yano T . Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. *Acta Amazonica.* 2007.37: 281–286.
- [65] Rabi T, Bishayee A . D-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *Journal of Carcinogenesis.* 2009. 8: 9.
- [66] Rassouli F B, Matin M M, Iranshahi M and Bahrami AR . Investigating the cytotoxic and apoptosis inducing effects of monoterpenoid stylosin in vitro. *Fitoterapia.* 2011. 82: 742–749.

[67] Sobral M V , Xavier A L, Lima T C, & de Sousa D P. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. *The Scientific World Journal*. 2014. 1–35.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail a porté sur l'étude des extraits phénoliques et huiles essentielles des différentes plantes de la famille *lamiaceae* : *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis* et *Mentha spicata* , et nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité considérable de flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que les trois plantes sont riches en flavonoïdes

L'analyse qualitative et quantitative des extraits par HPLC a révélé la richesse de plusieurs composés phénolique dans les trois plantes étudiées comme l'acide vanilique, l'acide ferulique, l'acide cinnamique, l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque ,l'epicatechin , la retine et l'acide ellagique.

L'analyse chimique des huiles essentielles montre une augmentation du pourcentage des monoterpènes oxygénés dans chaque plante. *Ocimum basilicum* a révélé 26 composés uniques, avec le linalool (52,1%) et l'acétate de linalyle (19,1%) comme principaux composés. 29 composés ont été identifiés dans les l'huile de *Thymus algeriensis*, avec l'acétate d' α -terpinyle (47,4%), l'acétate de néryle (9,6%) et l' α -pinène (6,8%) comme principaux composés.

Pour *Mentha Spicata* , on a identifié 44 composés dont le carvone (49,5%) , le limonène (16,1%) et 1,8-cineole (8,7%) sont les composés les plus dominants .

Par ailleurs, tous les extraits ; et spécialement les huiles essentielles possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils montrent une inhibition très importante vis-à-vis du radical DPPH, ABTS et une forte activité réductrice vis-à-vis du fer ferreux et du phosphomolybdate.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits vis-à-vis de 6 espèces bactériennes et 2 espèces fongiques s'est révélée modérée avec des actions

Conclusion générale

renforcées contre les bactéries gram-positives.les concentrations minimales inhibitrices varient entre 512 µg/ml et 32 µg/ml .

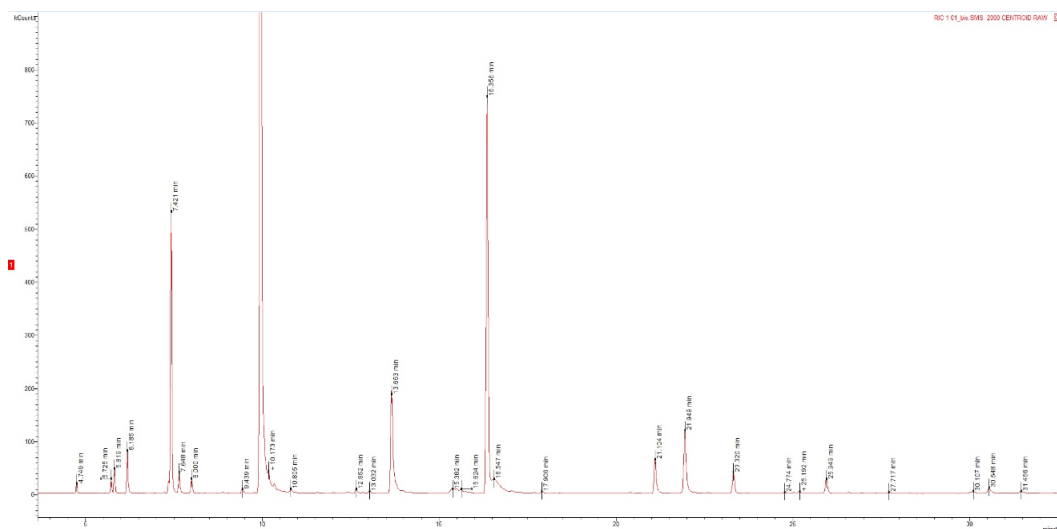
D'après les résultats du test correspondant à la méthode de dilution en milieu liquide, nous pouvons considérer que nos extraits peuvent être des substances bactériostatiques.

Les extraits phénoliques possèdent une activité antiproliférative du test MTT faible par rapport aux huiles essentielles , ces dérivés enregistrent des valeurs LD₅₀ considérables contre les lignées cellulaires testées, toutefois l'huile essentielle de *Montha spicata* et de *Thymus Algeriensis* ont montré une activité remarquable contre la lignée cellulaire MCF-7 ou la valeur LD₅₀ égale à 279 µg/ml et 647 µg /ml respectivement.

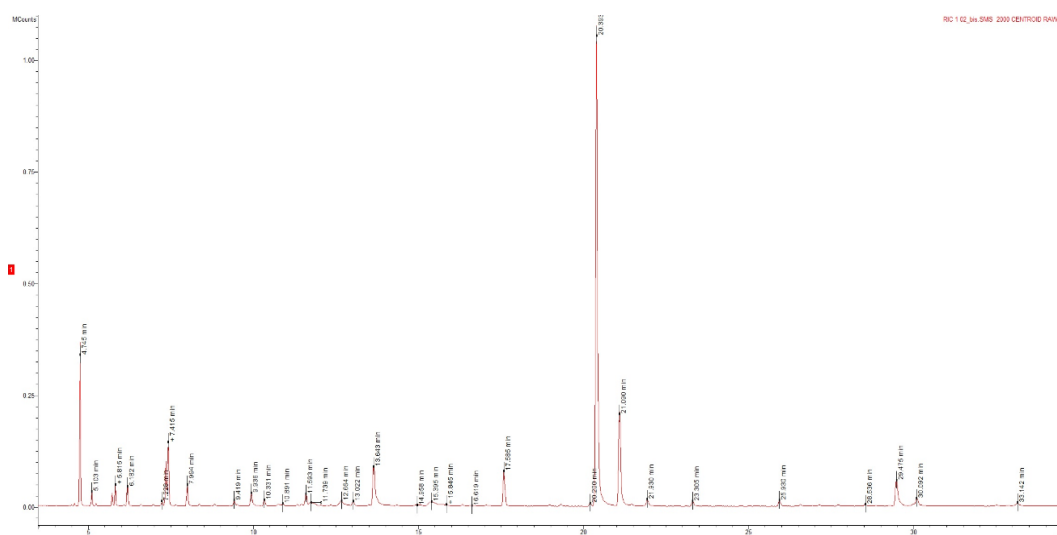
Perspectives et recommandations:

- Poursuivre l'étude photochimique des espèces la famille *lamiaceae* : *Ocimum basilicum*, *Thymus algeriensis* et *Mentha spicata*, sur l'ensemble des parties de la plante.
- Purifier et identifier les principes actifs majoritaires,
- Etudier les activités biologiques de ces métabolites *in vivo* et *in vitro*.

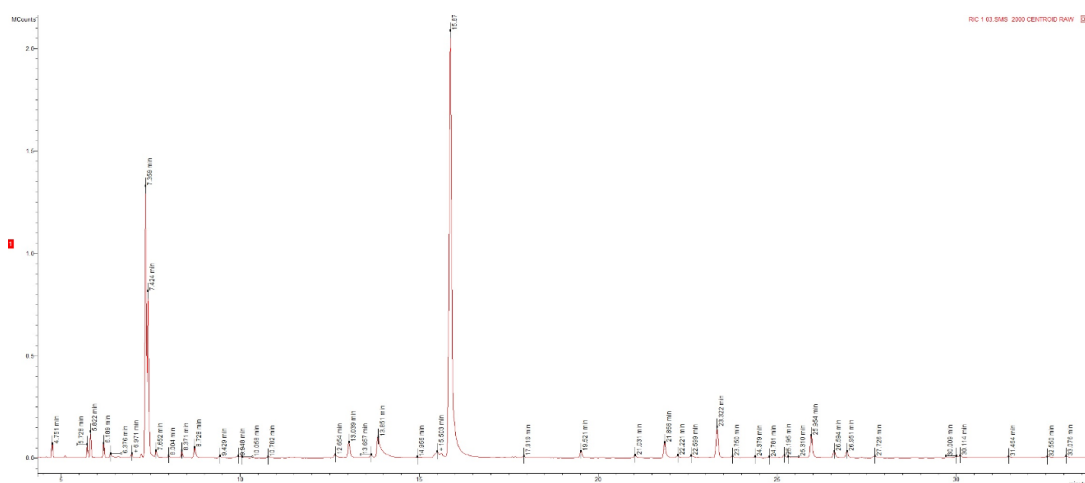
Annexe



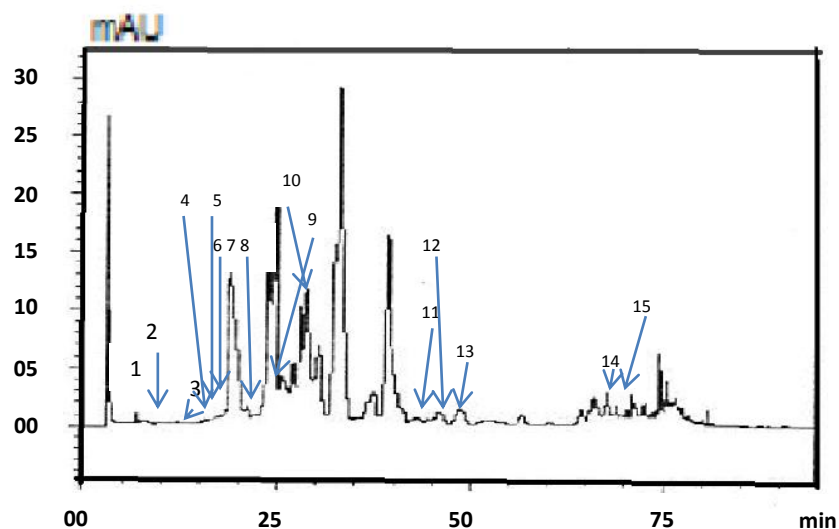
Chromatogramme GC-MS de l'échantillon *ocimum basilicum*



Chromatogramme GC-MS de l'échantillon *thymus algeriensis*

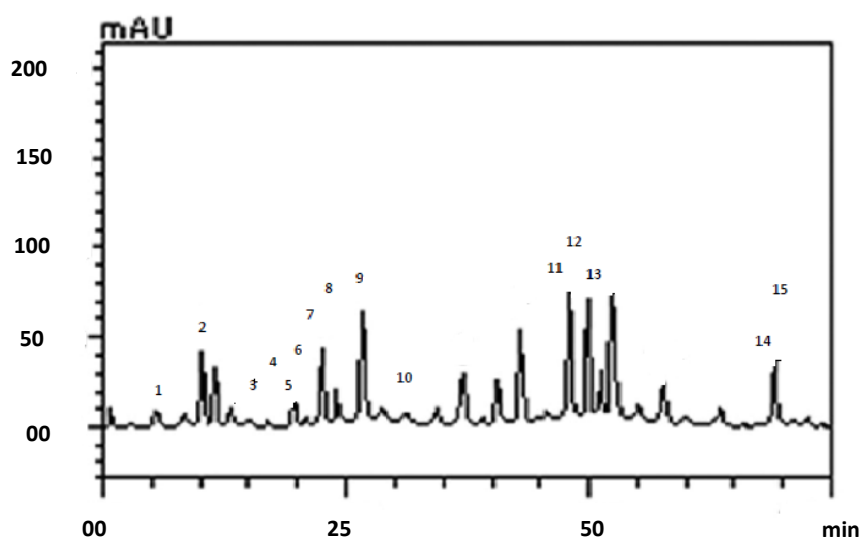


Chromatogramme GC-MS de l'échantillon *Mentha spicata*



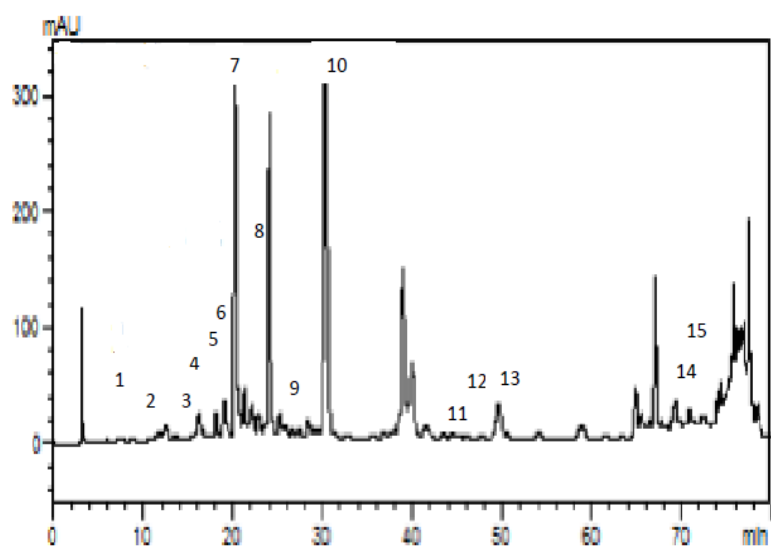
Chromatogramme HPLC-DAD de l'EE de *T. Algeriensis*.

(1) Gallic acid ; (2) 3,4-dihydroxy benzoic acid ; (3) 4- hydroxy benzoic acid ; (4) 2,5 dihydroxy benzoic acid ; (5) Chlorogenic acid ; (6) Vanillic acid ; (7) Epicatechin ; (8) Caffeic acid ; (9) p-coumaric acid ; (10) Ferulic acid ; (11) Rutin ; (12) Ellagic ; (13) Naringin ; (14) Quercetin ; (15) Cinnamic acid .



Chromatogramme HPLC-DAD de l'EE de *O. Basilicum*

(1) Gallic acid ; (2) 3,4-dihydroxy benzoic acid ; (3) 4- hydroxy benzoic acid ; (4) 2,5 dihydroxy benzoic acid ; (5) Chlorogenic acid ; (6) Vanillic acid ; (7) Epicatechin ; (8) Caffeic acid ; (9) p-coumaric acid ; (10) Ferulic acid ; (11) Rutin ; (12) Ellagic ; (13) Naringin ; (14) Quercetin ; (15) Cinnamic acid



Chromatogramme HPLC-DAD de l'EE de *M. Spicata*.

(1) Gallic acid ; (2) 3,4-dihydroxy benzoic acid ; (3) 4- hydroxy benzoic acid ; (4) 2,5 dihydroxy benzoic acid ; (5) Chlorogenic acid ; (6) Vanillic acid ; (7) Epicatechin ; (8) Caffeic acid ; (9) p-coumaric acid ; (10) Ferulic acid ; (11) Rutin ; (12) Ellagic ; (13) Naringin ; (14) Quercetin ; (15) Cinnamic acid