

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique.
Filière : Science de la nature et de la vie
Option : Biochimie Appliquée.



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude comparative des activités biologiques
des huiles essentielles et extraits volatiles (CO₂
supercritique) de plantes aromatiques du
genre Thymus.**

Présenté par :

Alouache Fatah et Benmeziane Salem

Soutenu le : **21 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mr.: BELKACEM N.	MAA	Président
Mme: RAHMANI - BERBOUCHA M.	MAA	Encadreur
Mme: ADRAR S.	MAA	Examinatrice

Année universitaire : **2016 / 2017**

Remerciements

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail. Au moment où s'achève ce travail, permettez-nous de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de travail, nous a dirigé, soutenue, aidé et encouragé.

Tout d'abord, nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice M^{me} RAHMANI M. enseignante à l'université de Bejaia, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance tant pour avoir accordé sa confiance, sa grande disponibilité et ses précieux conseils, son aide et le temps qu'elle nous a consacré pour la réalisation de ce travail.

Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance au Mme ATMANI pour nous avoir accueilli dans son laboratoire.

Nos remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de génétique.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Notre reconnaissance va également à tous les enseignants du département de physico-chimie de l'université de Bejaia pour l'aide pendant notre formation d'étude.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Salem et Fatah

Dédicaces

Avec l'aide d Allah le tous puissant, ce travail est achevé.

Je le dédie à toutes personnes qui me sont chère ;

Au deux être les plus chers au monde qui ont donnés sens à mon existence, et qui m'ont soutenu nuits et jours durant tout mon parcours.

Ma très chère mère qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, je lui serai éternellement reconnaissante, merci maman.

Mon très cher père qui m'a donné un magnifique modèle de volonté, merci papa, Avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

A ma grand- mère : Wahchia

A mon très cher frère : Hocine

A mes très chères sœur : Djida, Nacira et sa fille« Nelia ».

A mes cousins(es), oncles, tantes.

A mes amies : Lounis, motaleb, mouhoub (sahitou), Mouhand (mouzawar), Salim, Idris sans oublier Akh Ali.

A mon binôme Fatah et sa famille.

A toute la promotion de biochimie 2016 -2017.

A tous ceux qui me sont chers ...

Salem

Dédicaces

Avec l'aide de bon DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie A :

Mes parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions, pour
leurs sacrifices et leurs soutiens.

Mes frères et sœurs

Toute ma famille et mes amis

Mon binôme et sa famille

Toute la promotion de biochimie appliqué 2016 /2017

Fatah

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur le genre Thymus2

I.1.1. Historique et botanique.....2

I.1.2. Distribution géographique et classification de Thym.....2

I.1.3. Classification4

I.1.4. Principales utilisations du Thym.....4

I.1.5. Huile essentielle du Thym5

I.1.6. Activité pharmacologique du Thym5

I.2. Les huiles essentielles.....5

I.2.1. Localisation des huiles essentielles5

I.2.2. Propriétés physico-chimiques des HE6

I.2.3. Biosynthèse des composés chimiques et structures des huiles essentielles.....7

I.2.3.1 Composés terpéniques7

I.2.3.2. Composés aromatiques8

I.2.4. Méthode d'extraction des huiles essentielles.....9

I.2.4.1. Hydrodistillation.....9

I.2.4.2. Extractions au CO₂ supercritique.....10

I.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles10

I.2.5.1. Activité antifongique11

I.2.5.2. Activité antimicrobienne11

I.2.5.3 Activité anti-inflammatoire11

I.2.5.4. Activité anti oxydante et leur mécanisme d'action.....	12
---	----

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel	14
II.1.1.Appareillage	14
II.1.2.Produits chimiques	14
II.1.3.Matériel Végétal.....	14
II.1.3.1. Thymus algeriensis.....	14
II.1.3.2. Thymus hirtus.....	15
II.1.4. Echantillons en huiles essentielles extraites de <i>Thymus algeriensis</i> et <i>Thymus hirtus</i> ..	15
II.2.Méthodes d'évaluation, <i>in vitro</i> , des propriétés antioxydants.....	17
II.2.1.Méthode du radical stable DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	17
II.2.Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS ⁺	19
III. Analyse statistique	21

ChapitreIII: Resultats et discussion

III.1. Rendement de l'extraction en huiles essentielles.....	22
III.2. Activité antioxydante	23
III.2.1. Activité antioxydante du radical synthétique DPPH	23
I.2.1.1.Détermination des IC ₅₀	26
I-2-2. Activité antioxydante du radical ABTS ⁺	32
I.2.2.1-Détermination des IC ₅₀	34
Conclusion	40

Référencés bibliographique.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique

ERO : Espèce Réactive d'Oxygène

I% : Pourcentage d'inhibition

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%

1O₂ : Oxygène singulet

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline -6-sulfonique)

AF : Avant Floraison

ANOVA : Analyse de la variance (Analyse of variance)

F : Floraison

GPP : Pyrophosphate de géranyle

HD: Hydrodistillation

HE : Huile essentielle.

IPP: Pyrophosphate Isopentényle

PG: Propylgallate

SFE: Supercritical Fluid Extraction

SNK: Student Newman Keuls

T.: Thymus.

T° : Température

µg: Microgramme

BHA : Hydroxy Anisole Butylé.

BHT : Hydroxy Toluène Butylé.

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

nm: Nanomètre

Liste des figures

Figure n°1 : Distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde	3
Figure n°2 : Structures histologiques des plantes	6
Figure n°3 : Biosynthèse des terpènes	8
Figure n°4 : Structures chimiques de certains terpènes	8
Figure n°5 : Structure de quelques composés aromatiques	9
Figure n°6 : Schéma d'un montage d'Hydrodistillation	10
Figure n°7 : Schéma du principe d'extraction au CO ₂ supercritique	11
Figure n°8 : Structure de certains composés synthétiques (BHT PG, TBHQ)	13
Figure 9 : Photographie de <i>Thymus algeriensis</i>	15
Figure 10 : Photographie de <i>Thymus hirtus</i>	15
Figure 11 : Schéma du dispositif d'extraction (Clevenger) des huiles essentielles	16
Figure 12 : Montage d'extraction par CO ₂ supercritique	17
Figure n°13 : Principe de mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH	18
Figure n°14 : Schéma de piégeage du radical libre DPPH	19
Figure n°15 : Principe de la méthode ABTS ^{•+}	20
Figure n°16 : protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABT ^{•+}	21
Figure n°17 : Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des espèces étudiés	24
Figure n°18 : Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par les composés pures des huiles essentielles.	25
Figure n°19 : Variation d'IC ₅₀ des HEs des espèces étudiées.	26
Figure n°20 : Variations des IC ₅₀ des HEs issues des fluides supercritiques des espèces étudiés	28
Figure n°21 : Variations des IC ₅₀ des molécules des huiles essentielles	29

Figure n°22: Variations des IC50 des HEs et les molécules majoritaires des huiles essentielles.31

Figure n°23 : Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS⁺ en fonction des molécules des HEs.....33

Liste des tableaux

Tableau I : Localisation des principales espèces du Thym en Algérie.	3
Tableau II : Utilisations traditionnelles du Thym.	4
Tableau III : Rendements en huiles essentielles des différentes espèces de Thymus, issus des deux méthodes d'extractions (HD et CO ₂ supercritique).	22
Tableau IV : Analyse de variance des moyennes calculées (IC ₅₀) en fonction des extraits issus de la méthode hydrodistillation.	27
Tableau V : Analyse de variance des moyennes calculées (IC ₅₀) des fluides supercritiques.	29
Tableau VI : Analyse de la variance des moyennes calculées (IC ₅₀) en fonction des composés individuels des HEs étudiés.	30
Tableau VII : Analyse de la variance des molécules des huiles essentielles et les extraits étudiés.	32
Tableau VIII : Analyse de la variance des moyennes calculées (IC ₅₀) en fonction des extraits issus de la méthode hydrodistillation.	36
Tableau IX : Analyse de la variance des moyennes calculées (IC ₅₀) des fluides supercritiques.	38
Tableau X : Analyse de la variance des molécules individuelles des huiles essentielles.	39
Tableau XI : l'analyse de la variance des molécules des huiles essentielles et les extraits étudiés.	40

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (Amarti *et al.*, 2011).

Environ 80% de la population de la plupart des pays en développement ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne, mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité (Benkherara *et al.*, 2013).

Le climat méditerranéen en Algérie favorise la croissance des plantes sauvages, mais malheureusement, parmi les différentes espèces de la flore algérienne, jusqu'à présent, peu d'entre elles sont étudiées. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (Haoui *et al.*, 2015).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est l'une des propriétés biologiques, qui possède un grand intérêt dans le domaine médical et dans l'industrie agroalimentaire, car elle peut être utilisée pour augmenter la production et la durée de conservation des aliments (Dongmo *et al.*, 2010).

Les études réalisées sur l'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes du genre *Thymus* en Algérie sont peu nombreuses. A cet effet, on s'est intéressé aux plantes du genre *Thymus*, l'un des genres de la famille de Lamiacées le plus riche en HE, qui sont utilisées dans une large gamme d'activités biologiques : antiseptique, antibactérienne, antifongique et antioxydante (Faleiro *et al.*, 2003).

L'objectif de ce travail consiste d'une part, à extraire les huiles essentielles de deux espèces du genre *Thymus* poussant à l'état spontané en Algérie : *Thymus algeriensis* et *Thymus hirtus*, et d'autre part à l'étude de leurs propriétés antioxydantes.

C'est dans cet ordre d'idées que nous avons alimenté, dans une première étape, notre problématique par une synthèse bibliographique. Dans un second temps, une mise en œuvre d'une comparaison des méthodes d'extraction (hydrodistillation et CO₂ supercritique), détermination de l'effet antioxydant de ces huiles essentielles par différentes méthodes (piégeage du radical DPPH[•], piégeage du radical ABTS^{•+}). Ensuite, les différents résultats recueillis dans les différents tests sont commentés et discutés.

Enfin et sur l'ensemble d'observations et de conclusions, nous y sommes parvenus à mettre des perspectives où la réalisation est souhaitable.

Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur le genre Thymus

I.1.1. Historique et botanique

Le nom Thymus vient probablement du latin "Thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "Thymos" qui signifie "courage" ou "force (Stahl-Biskup et Saez ,2002).

Les grecques brûlaient cette herbe pour chasser les insectes piquants de la maison. Le Thym représentait le style et l'élégance des premiers Grecs, et l'esprit républicain en France au moyen Age. A cette époque, les moines bénédictins apportaient du Thym en Europe centrale et en Angleterre car ils pensaient que les oreillers à Thym soulageaient l'épilepsie et la mélancolie. Au XVII siècle, le Thym a été utilisé au cours de la peste qui a balayé l'Europe .Il est utilisé aussi par les Egyptiens pour embaumer les morts. Les Romains, de leur part brûlaient le Thym pour éloigner les créatures venimeuses. Ils s'en servaient aussi pour aromatiser le fromage (Charles, 2012).

Les plantes du genre Thymus sont des arbustes perpétuels herbacés avec des racines ligneuses, elles peuvent atteindre une hauteur de 45 cm (2 pieds). Les tiges sont verticales, les branches sont persistantes, les feuilles sont aromatiques et recouvertes de glandes et les fleurs sont colorées avec une couleur violette pâle à deux lèvres avec un calice glandulaire (Charles, 2012).

Plusieurs dénominations ont été données aux espèces du genre Thymus; en Amazigh : Azukni, Tazuknite, en Arabe : Ziitra (Stahl-Biskup et Saez, 2002).

Ce genre contient des propriétés aromatiques et médicinales et le plus populaires dans le monde. La connaissance de la composition chimique et les effets pharmacologiques de ce genre permettent la classification des différents chémotype. Ces espèces de Thymus, se rencontrent, en plaine, en montagne, dans les rocailles, les garrigues, les pelouses et les broussailles (Bellakhdar, 1997).

I.1.2. Distribution géographique et classification de Thym

I.1.2.1. Dans le monde

Le genre Thymus de la famille de Lamiacée est largement retrouvé dans le monde (figure 1) tels que l'Europe, l'Afrique, l'Asie, le Groenland, le Canada, le Chili et la nouvelle Zélande, mais ce genre est principalement répandu dans la méditerranée.

Aujourd'hui, environ 250 taxons qui se concentrent dans la méditerranée (214 espèces et 36 sous-espèces sont acceptées et sont divisées en huit sections) (Morales, 2002).

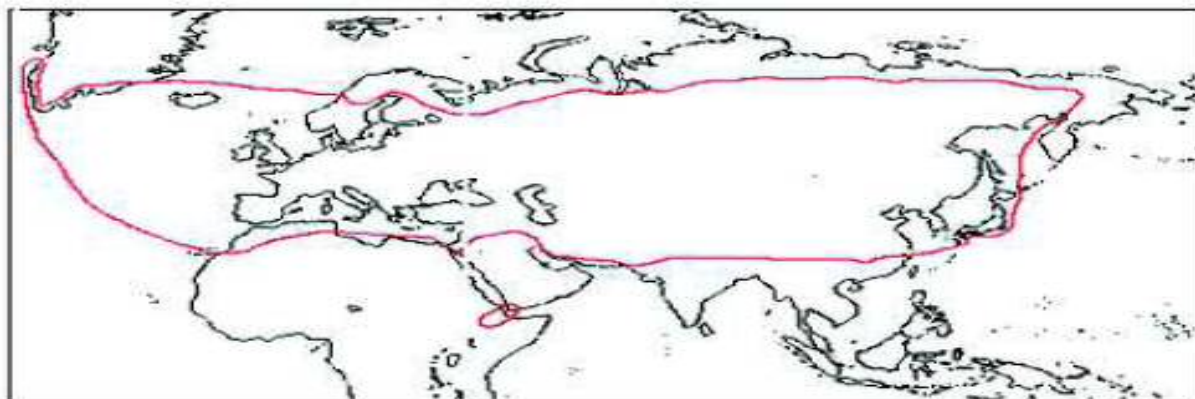


Figure n°1 : Distribution du genre *Thymus* dans le monde (Morales, 2002).

Le cercle rouge représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde

I.1.2.2. En Algérie

Le genre *Thymus* a colonisé le territoire de l'Algérie avec 12 espèces (Dob et al., 2006). Parmi ces dernières, certaines sont endémiques de l'Algérie, telles que *Thymus pallescens* de Noé, *Thymus dreatensis* Batt., *Thymus guyonii* de Noé et *Thymus lanceolatus* Desf (Hazzit et al., 2009). Sa répartition géographique est représentée dans le « tableau I ».

Tableau I : Localisation des principales espèces du Thym en Algérie (Quézel, 1963).

Espèce	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois et oranais et constantinois.	—
<i>Thymus dreatensis</i>	Batt	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois et constantinois.	—
<i>Thymus lanceolatus</i>	Desfontaine	Le secteur de l'atlas tellien (terni de Médéa et Benchicao) et sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret).	Zaàteur
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur littoral.	Djertil Hamrya
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de l'Atlas saharien.	Zizerdite

I.1.3. Classification

La classification botanique, selon **Quétel, (1963)** est la suivante :

- Règne : *Plantae*
 - Sous-règne : *Tracheobionta*
 - Embranchement : *Magnoliophyta*
 - Sous-embranchement : *Magnoliophytina*
 - Classe : *Magnoliopsida*
 - Sous-classe : *Asteridae*
 - Ordre : *Lamiales*
 - Famille : *Lamiaceae*
 - Genre : *Thymus*
 - Espèce : *Thymus vulgaris*

I.1.4. Principales utilisations du Thym

Le Thym possède un large spectre d'utilisation (**Tableau II**), parmi lesquelles on peut citer:

Tableau II : Utilisations traditionnelles du Thym.

| Parties utilisées | Indications | Mode d'emploi | Références |
|---------------------------|--|--|---|
| Plante entière | Fièvre
Rhumes grippes
Maladies broncho-pulmonaires | De l'eau avec la plante, mettre une serviette sur la tête, et inhaler les vapeurs dégagées. Ensuite, boire une tasse de cette décoction filtrée avant de se coucher. | Rasooli et al., 2006. |
| Racines | Diarrhée | Décoction | Pina-Vaz et al., 2004. |
| Feuilles | Fièvre
La toux
Les blessures
Infection | Utilisées comme poudres ou en infusions. | El Bouzidi et al., 2013. |
| Feuilles et fleurs | Condiment culinaire | Employée pour donner de saveur à la viande.
Conserve plus longtemps les aliments et empêche la formation des moisissures. | Miura et al., 2002. |
| Plante entière | Antiseptiques
Antispasmodiques
Antimicrobiennes | Décoction ou infusion | Nickavar et al., 2005; Pirbalouti, 2013. |

I.1.5. Huile essentielle du Thym

L'essence de Thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives (**Rasooli et al., 2006**). Les huiles essentielles de *Thym* sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

La variabilité chimique des huiles essentielles de *Thym* dépend de plusieurs facteurs qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais, qui peuvent être aussi d'ordres génétique et saisonnier (stade végétale) (**Loziene et al., 2007**). Ainsi, une étude menée par **Dob et al., (2006)** sur les *Thymus* d'Afrique du Nord a montré que le composé majoritaire est le Thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

I.1.6. Activité pharmacologique du Thym

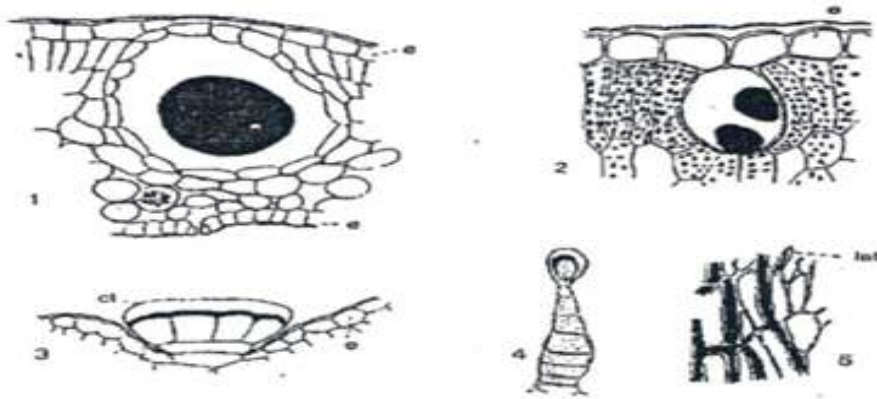
Les espèces de plantes aromatiques du genre *Thymus* sont des plantes médicinales importantes, fortement recommandées en raison d'une gamme de propriétés thérapeutiques de leur huile essentielle (huile de *Thym*): anti hématologique, antiseptique, antispasmodique, antimicrobien, (**Rasooli et al., 2006**),cardiaque, carminatif, diurétique et expectorant (**Nikolić et al., 2014**). Cette forte activité des huiles essentielles de *Thym* a été prouvé par (**Panizzi et al., 1993**).

I.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles appelées aussi essence végétale, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est -à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (**Pardini et Lucheroni, 1996**).

I.2.1. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être synthétisées par tous les organes de la plante, notamment les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les rameaux, les graines, les fruits, les racines, le bois ou l'écorce. Les huiles essentielles localisées dans les cellules sécrétoires, les cavités, les canaux, les cellules épidermiques ou les trichomes glandulaires (figure n°2) (**Bakkali et al., 2008**).



1, poche sécrétrice dans une feuille d'*Eucalyptus globules* (Myrtacées) ; 2, cellule isolée située sous l'épiderme, e, de la famille de *Saassafra officinale* (Lauracées) ; 3. Poil de menthe poivrée (*Menthe piperita*, Lamiacées) : l'essence (en noir) s'accumule sous la cuticule. Et très épaisse ; 4, poil de patchouli (*Pogostemon*, lamiacées) ; 5. Laticifères, lat., dans la racine de Salsifis (Astéracées).

Figure n°2: Structures histologiques des plantes (Guignard, 1996).

I.2.2. Propriétés physico-chimiques des HE

Malgré leur différence de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physico-chimiques communes très connues à savoir :

- ✓ A température ambiante, elles sont généralement liquides ; alors qu'elles sont volatiles à température élevée, c'est leur volatilité qui les distingue des huiles fixes telles que l'huile d'olive et l'huile d'amande douce ;
- ✓ Pouvoir intense de diffusion et de pénétration ;
- ✓ Elles sont incolores ;
- ✓ Elles ont généralement une densité inférieure à celle de l'eau ($d < 1$), mais il existe des exceptions (les huiles essentielles de girofle) ;
- ✓ Elles possèdent un indice de réfraction généralement élevé ;
- ✓ Elles sont peu solubles dans l'eau (entraînables à la vapeur d'eau) ;
- ✓ Elles sont solubles dans les solvants organiques usuels, dans les graisses (liposolubles), et dans les alcools (Jean, 1993).
- ✓ Elle se caractérise aussi par pouvoir rotatoire, viscosité, point d'ébullition et congélation (Kanko *et al.*, 2004).

I.2.3. Biosynthèse des composés chimiques et structures des huiles essentielles.

Les huiles essentielles végétales sont habituellement le mélange complexe des composés polaires et non polaires (**Massagno, 2005**). En général, les constituants des huiles essentielles appartenant principalement à deux grands groupes chimiques, à savoir les composés terpéniques et les composés aromatiques (**Bakkali et al., 2008**).

I.2.3.1 Composés terpéniques

Les terpènes étant des constituants très importants de la plupart des huiles essentielles. La biosynthèse de cette famille de produit naturel est résumée dans la figure n°3. En effet, l'acide mévalonique, métabolite important dans la biosynthèse des terpènes se transforme en deux unités de pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et de pyrophosphate de β, β diméthylallyle. La combinaison de ces deux pyrophosphates produit le pyrophosphate de géranyle (GPP), qui à son tour se transforme en géraniol et autres monoterpènes. La synthèse des autres terpènes s'effectue à la suite de condensations d'autres unités d'IPP (**François-Xavier, 2001**).

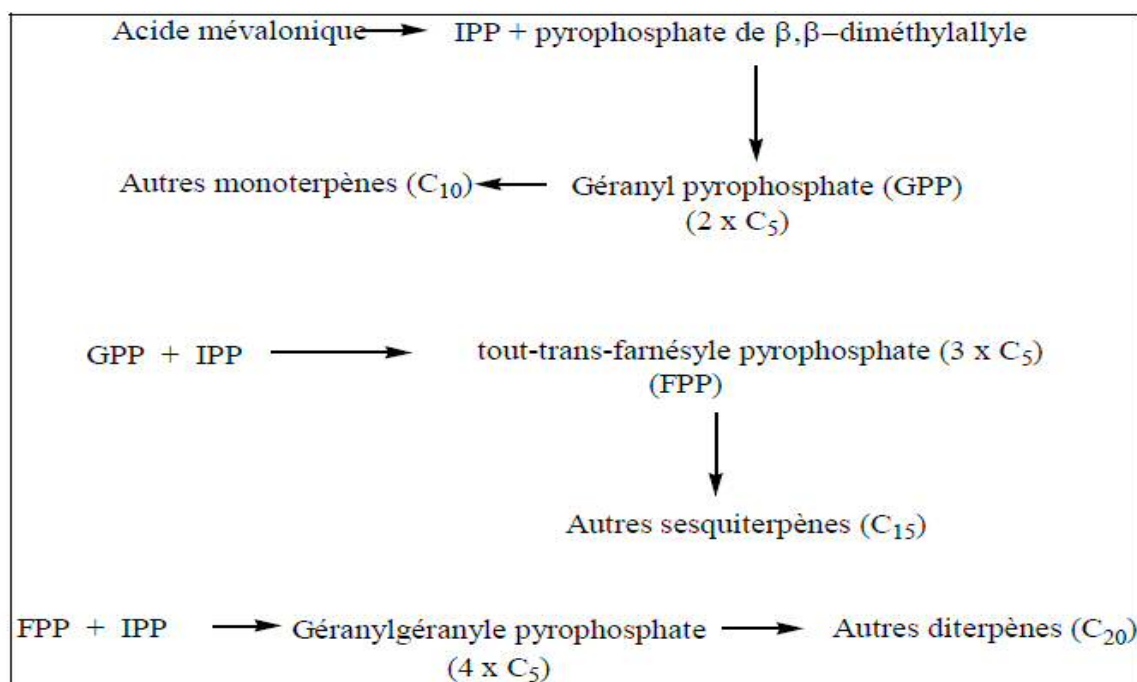


Figure n°3 : Biosynthèse des terpènes (**François-Xavier, 2001**).

a. Monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents, ils peuvent être acyclique, monocyclique ou bicyclique, ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (**jean, 2009**).

b. Sesquiterpènes

Les propriétés structurales principales sont similaires par rapport aux monoterpènes (Bruneton, 1999).

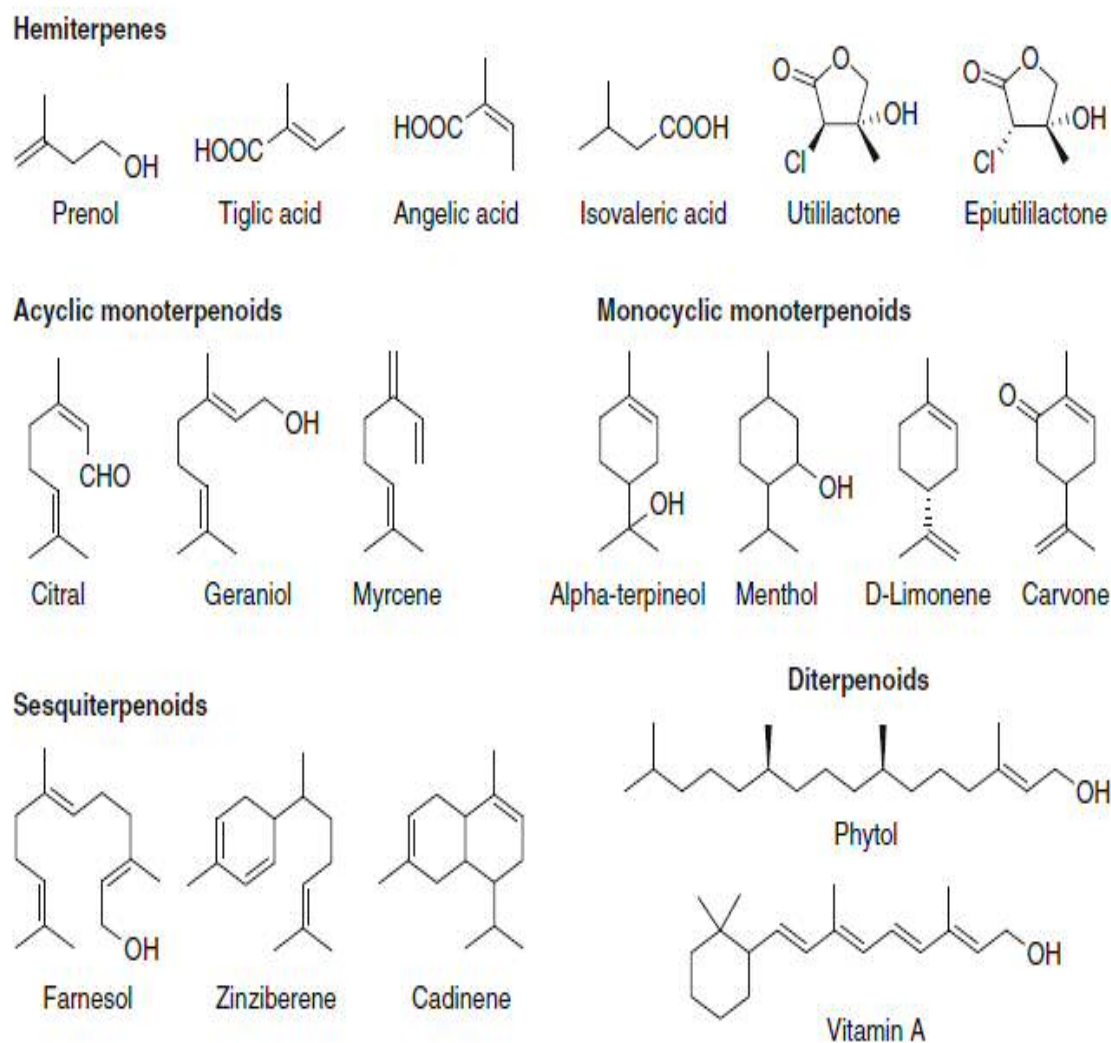


Figure n°4 : Structures chimiques de certains terpènes (Brahmkshatriya et Brahmkshatriya, 2013).

I.2.3.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes. Ce sont souvent des allyles- et des propénylphénols, et rarement des aldéhydes dans les huiles essentielles des composés en (C₆- C₃) tels que la vanilline et l'antranilate de méthyle (figure n°5) (Bruneton, 1999).

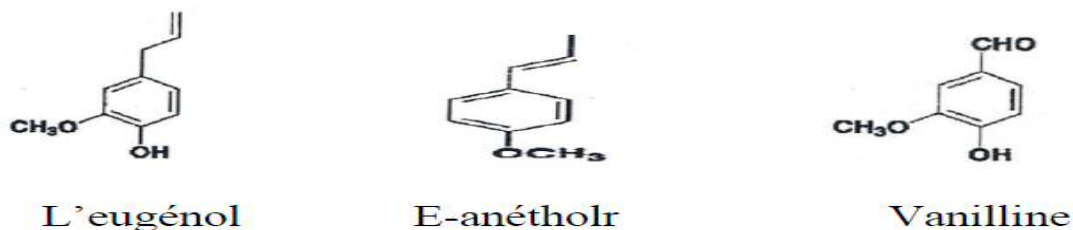


Figure n°5 : Structure de quelques composés aromatiques (Bruneton, 1999).

I.2.4. Méthode d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues à partir des plantes naturelles par plusieurs méthodes d'extractions, telles que la distillation, la presse à froid et la distillation à sec (Li et Chemat, 2014). Toutes ces techniques et les huiles essentielles dépendent du matériel botanique (l'état et la forme de la matière) et la nature des composés (flavonoïdes, tannins etc.), qui détermine la qualité des huiles essentielles (Tongnuanchan et Benjaku, 2014).

I.2.4.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (HD) est une variante de la distillation à la vapeur, au lieu de l'apport de vapeur, les matières végétales en HD sont directement immergées dans l'eau (figure n°6). Ce mélange solide-liquide est ensuite chauffé jusqu'à ébullition, sous pression atmosphérique dans un alambic, où la chaleur permet la libération des molécules odorantes dans les cellules végétales. Ces composés aromatiques volatils et l'eau forment un mélange azéotropique, qui peut être évaporé ensemble, puis condensé et séparé dans un flacon florentin en raison de leur immiscibilité et différence de densité (Li et Chemat, 2014).

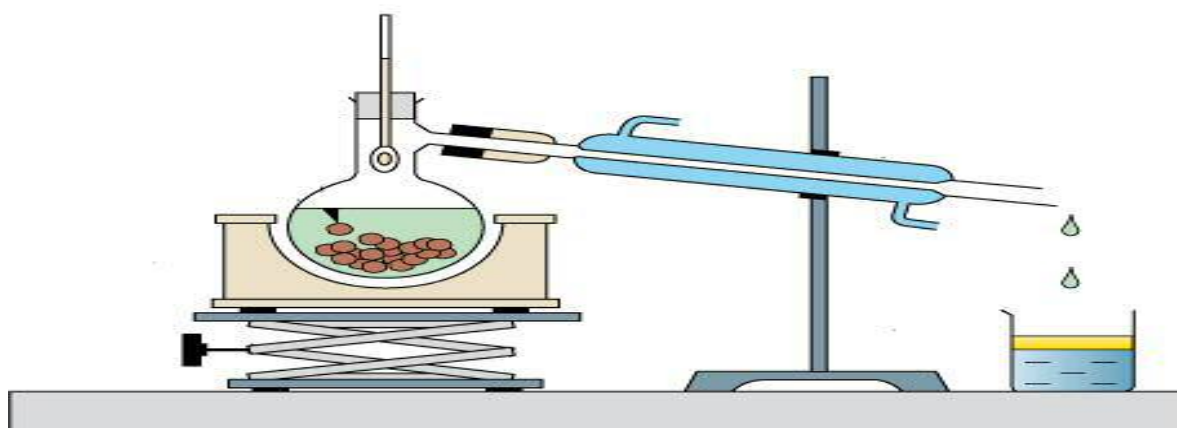


Figure n°6 : Schéma d'un montage d'Hydrodistillation (Rassem, 2016).

I.2.4.2. Extractions au CO₂ supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est le processus de séparation d'un composant (l'agent d'extraction) d'un autre (la matrice) en utilisant des fluides supercritiques comme solvant d'extraction (figure n°7). Dans la pratique, plus de 90% de toute extraction analytique de fluide supercritique (SFE) est réalisée avec du dioxyde de carbone (CO₂). Le CO₂ est relativement non toxique, non inflammable, disponible à haute pureté à un coût faible et facilement éliminé de l'extrait (Rozzi *et al.*, 2002).

La basse polarité du dioxyde de carbone est l'inconvénient majeur de cette technique d'extraction (Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007).

Cette méthode d'extraction produit un rendement plus élevé et une viscosité plus faible. De nombreuses huiles essentielles qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur d'eau peuvent être obtenues avec l'extraction du dioxyde de carbone (Capuzzo *et al.*, 2013).

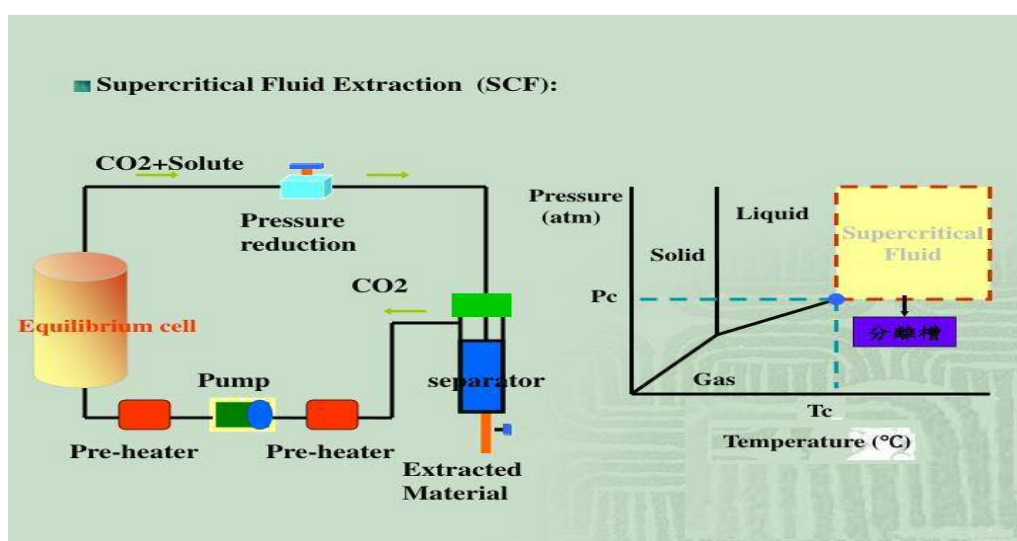


Figure n°7 : Schéma du principe d'extraction au CO₂ supercritique (Rassem, 2016).

I.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles

Beaucoup des composés naturels isolés à partir des plantes aromatiques et médicinales ont différentes activités biologiques (Nikolić *et al.*, 2014) ; antioxydante (Miura *et al.*, 2002), anti-inflammatoire, Anti antiseptique, et antimicrobienne (Rasooli *et al.*, 2006).

I.2.5.1. Activité antifongique

Les HE des plantes aromatiques sont connus pour avoir des propriétés antifongiques (**Pinto et al. 2007**).

Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxine chez les moisissures (**Edris, 2007**).

L'activité antifongique des huiles du Thym sont attribuées au Thymol et au carvacrol. Ils provoquent une dégénérescence des champignons Hyphes qui semblent vider leur contenu cytoplasmique (**Zambonelli et al., 1996**).

I.2.5.2. Activité antimicrobienne

Dans les années 1980, plusieurs études sur les huiles essentielles pour prouver leurs effets antimicrobiens (**Peter, 2004**). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leur toxines (**Edris, 2007**).

L'huile essentielle de Thym a montré une large gamme de l'activité antibactérienne contre les microorganismes qui avaient développé une résistance aux antibiotiques (**Nelson, 1997**).

Juven et ses collaborateurs, (1994) confirment que ce sont les phénols (Thymol, Carvacrol), qui donne à l'huile essentielle le caractère antibactérien. Ces terpènes se lient à l'aminé et aux groupes hydroxylamine des protéines de la membrane bactérienne modifiant leur perméabilité et entraînant la mort de la bactérie.

I.2.5.3 Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Bourkhiss et al., 2010**).

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (**Edris, 2007**).

Dans un test de dépistage, *in vitro*, (test d'inhibition de la cycloxygénases) de plusieurs huiles essentielles, l'huile de Thym exerce un effet inhibiteur sur la biosynthèse des prostaglandines (Peter, 2004).

I.2.5.4. Activité anti oxydante et leur mécanisme d'action

L'activité antioxydante des huiles essentielles est l'une des propriétés biologiques de grand intérêt. Les huiles essentielles de cannelle, de muscade, de clou de girofle, d'origan et de Thym possèdent de puissants composés antioxydants (Edris, 2007).

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes qui agissent comme captateurs de radicaux libres. Ces derniers sont des espèces chimiques ou des molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés causant des dommages à d'autres molécules. Ces espèces chimiques sont générées, *in vivo*, sous forme dérivés oxygénées réactives ERO tels que l'anion super oxyde, le radical hydroxyle et peroxyde d'hydrogène, qui sont très réactifs (Halliwell *et al.*, 1990).

La surproduction de ces radicaux peut être néfaste pour l'organisme. En effet, ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers tels que les protéines, les lipides ou l'ADN en entraînant un stress oxydatif (Edris, 2007) ; qui implique de nombreuses maladies comme la maladie d'Alzheimer, une déficience cognitive légère, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque, et le cancer (Halliwell et Guetteridje, 1990).

Selon Gazzani *et son équipe*, (1998), 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 (Misra *et al.*, 2014).

Au bout des dernières années les antioxydants commerciaux utilisés étaient des antioxydants synthétiques (figure n°8) tels que le Butylhydroxyanisole (BHA), Butylhydroxytoluène (BHT), le Tertiobutylhydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG) car son stable et peu couteux, 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 (Amarowicz *et al.*, 2000).

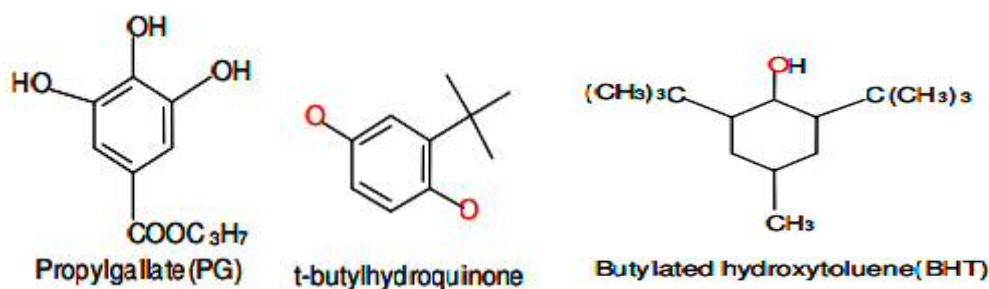


Figure n°8: Structure de certains composés synthétiques (BHT PG, TBHQ) (Hamid *et al.*, 2010).

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 (Favier, 2003).

L'objectif de ce travail consiste en étude comparative de l'effet antioxydant (piégeage du radical DPPH, et l'ABTS⁺) des huiles essentielles de deux espèces du genre *Thymus* poussant à l'état spontané en Algérie : *Thymus algeriensis* et *Thymus hirtus*, issues de deux méthodes d'extraction, « hydrodistillation (HD) et CO₂ supercritique (SFE) ».

Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1.Appareillage

- Lecteur microplaques, BioTek ELx800.
- Balance analytique (RADWAG, poids : max 600g)
- Balance de précision (Sartorius, poids : max 61g).
- Incubateur (BOECO Germany).
- Vortex (VELP).
- Eppendorfs, micropipette, microplaques, éprouvette, spatules, les ambons, béchers et erlenmeyer.

II.1.2.Produits chimiques

- ABTS 2,2'-Azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), SIGMA.
- DPPH (1.1-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl), SIGMA.
- Méthanol et éthanol (Pro labo).
- Potassium persulfate $K_2O_8S_2$, BIOCHEM chemopharma.

II.1.3.Matériel Végétal

II.1.3.1. *Thymus algeriensis*

Sous arbrisseau pouvant atteindre plus de 25 cm de long, d'une odeur forte, aromatisante très agréable, sa période de floraison s'étale du mois d'Avril jusqu'au mois de Juillet. C'est une plante à tiges ligneuses et ramifiées, feuilles sessiles ou courtement pétiolées, décussées, lancéolées et enroulées sur les bords. Fleurs groupées en épis, de couleur violette, pale, avec quatre étamines didynames (Quezel et Santa, 1963).



Figure n°9: Photographie de *Thymus algeriensis*

II.1.3.2. *Thymus hirtus*

Pédicelles bien plus courtes que le calice. Feuilles florales plus courtes que les fleurs. Plante basse, diffuse, peu hispide à fleurs pales (Quezel et Santa, 1963).



Figure n°10: Photographie de *Thymus hirtus*

Les plantes choisies ont été récoltées dans différentes régions de la Kabylie entre mars et juillet 2016. Le matériel végétal, fraîchement récolté, a été débarrassé des mauvaises herbes, séché à l'ombre dans un milieu aéré loin de toute pollution, sec et à l'abri de la lumière. Enfin, il est coupé en petites parties pour des éventuelles extractions d'essences volatiles.

II.1.4. Echantillons en huiles essentielles extraites de *Thymus algeriensis* et *Thymus hirtus*

L'extraction a été réalisée selon deux méthodes, à savoir hydrodistillation (HD) et par le CO₂ supercritique (SFE).

L'hydrodistillation est le procédé suivi pour extraire les huiles essentielles du végétal au moyen d'un dispositif d'extraction de type Clevenger (Figure n°11). Elle consiste à mettre 100 g du végétal coupé grossièrement dans un ballon en verre avec une quantité d'eau distillée suffisante pour recouvrir la matière végétale. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile qui se dégagent passent à travers le serpentín de refroidissement en verre où aura lieu la condensation. L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début de l'ébullition.

L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. Enfin, l'huile obtenue est conservée dans des flacons opaques bien scellés à une température basse (4 °C).

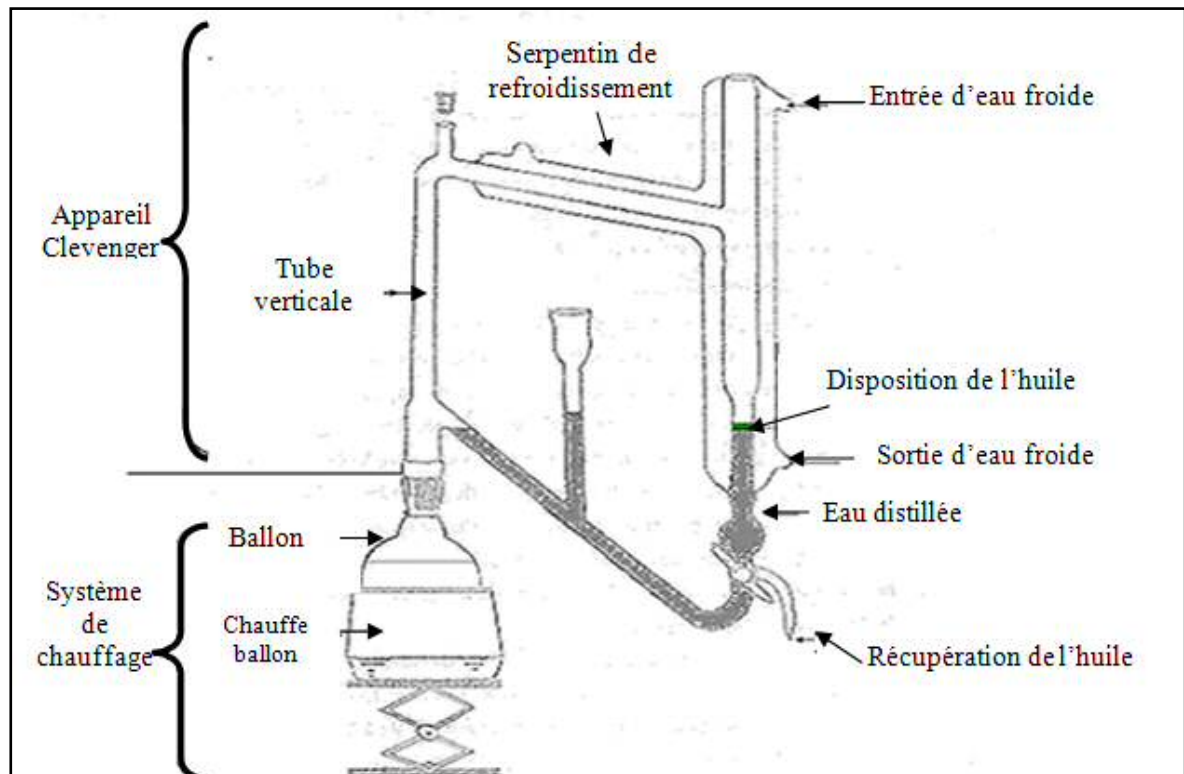


Figure n°11: Schéma du dispositif d'extraction (Clevenger) des huiles essentielles.

La deuxième méthode d'extraction, par le CO_2 supercritique (Figure n°12) est adoptée dans l'extracteur $p = 90$ bars et $t = 50^\circ\text{C}$. Dans le premier séparateur, la même pression d'extraction et à température de -15°C a été appliquée. Dans ces conditions, les constituants de l'huile sont solubles, mais la cire cuticulaire (alcools, alcanes) se précipite au fond de l'enceinte. Dans le deuxième séparateur la pression est affichée à 15 bars et la température à 15°C ; le CO_2 , dans ces conditions, a un très faible pouvoir solvant et l'huile extraite est bloquée au fond de l'enceinte et peut être récupérée à des intervalles de temps déterminés.

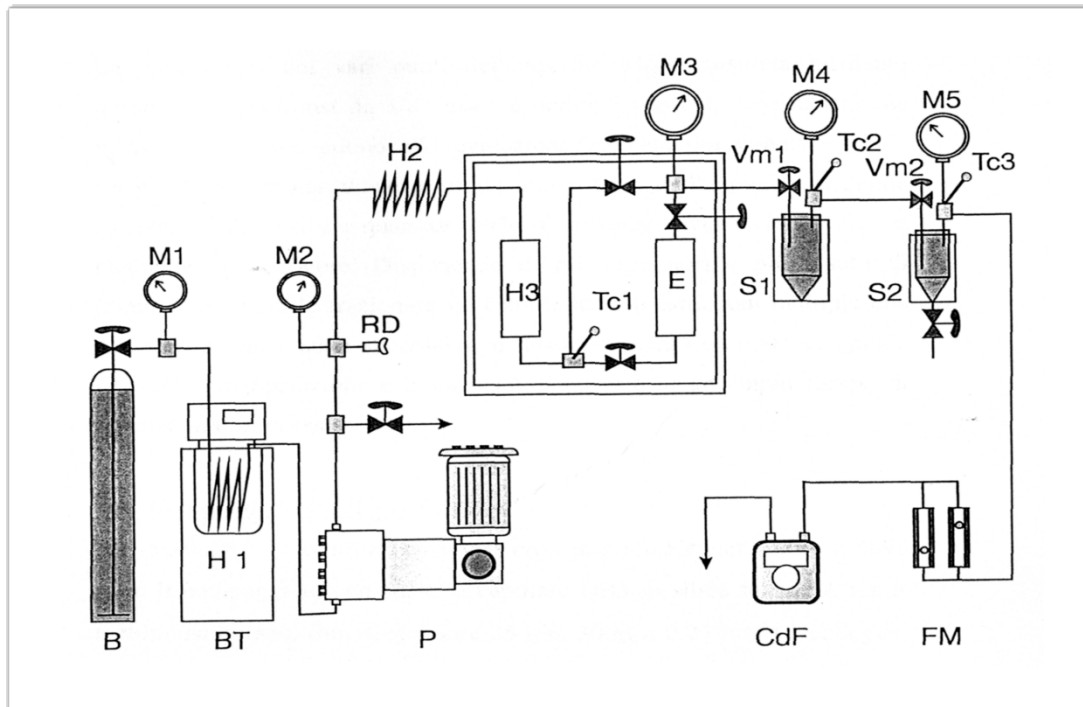


Figure n°12: Montage d'extraction par CO₂ supercritique. B: bouteille CO₂; BT: cryostat; M1, M2, M3, M4, M5: manomètres; H1, H2: scambiatori de chaleur; RD: disque d'explosion; H3: poumon; Et: extracteur; S1, S2: séparateurs; Vm1, Vm2: soupapes micrométrique; Tc1, Tc2, Tc3: thermocouple pour contrôle la température; FM: mesureur de flux; CdF: mesureur de plat; P: pompe pour liquides.

II.2.Méthodes d'évaluation, *in vitro*, des propriétés antioxydantes

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante (Aazza *et al.*, 2011). Parmi les tests les plus utilisés, nous présenteront ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude : le DPPH· et l'ABTS·⁺.

II.2.1.Méthode du radical stable DPPH·(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

- **Principe**

Le DPPH· est un radical libre stable et accepte un électron ou un hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable (Figure n°13) (Soare *et al.*, 1997). Le radical DPPH· est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide de l'activité antioxydante, en raison de sa stabilité en forme et la simplicité de l'analyse (Borzin *et al.*, 2008). Ce radical organique de couleur violette présente un maximum d'absorption puissant à 517 nm. En présence d'antioxydants, le DPPH· est réduit vers le jaune (Brand-Williams *et al.*, 1995).

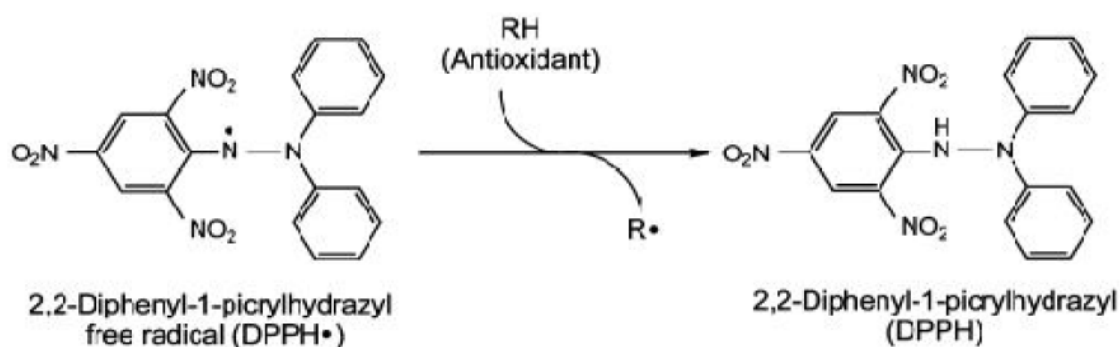


Figure n°13: Principe de mesure de l'activité antioxydante par la méthode DPPH• (Moon et Shibamoto., 2009).

- **Mode opératoire**

Le test est réalisé sur une microplaque à 96 puits, en suivant la méthode de **Wu et ses collaborateurs, (2005)** (Figure n°14). Un volume de 20 μL (différentes concentrations) de chaque échantillons d'huiles essentielles extraites par hydrodistillation (HD) et par le CO_2 supercritique (SFE) des deux espèces de Thym étudiées, a été mélangé avec 180 μL de la solution méthanolique de DPPH• (0.1 mM). Après une période d'incubation de 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm.

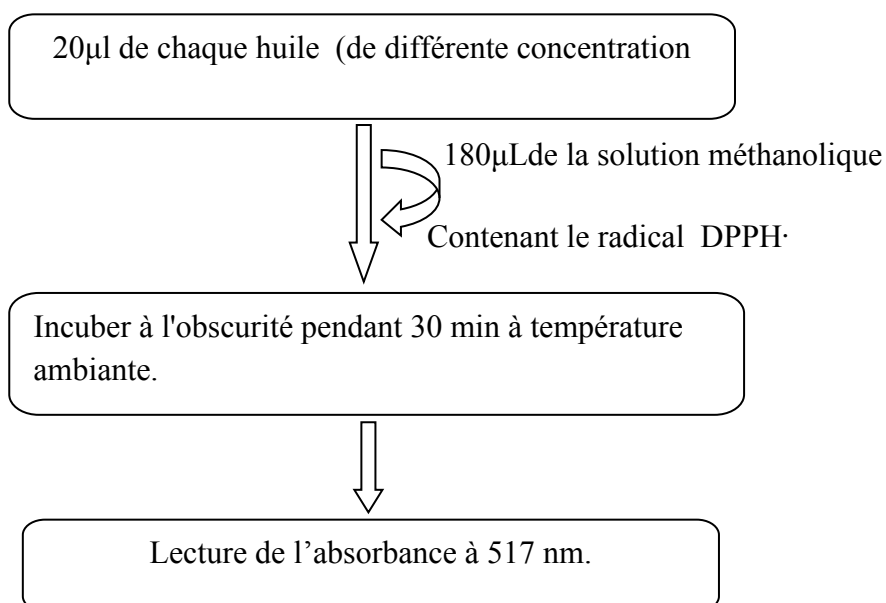


Figure n°14 : Schéma de piégeage du radical libre DPPH• (Wu *et al.*, 2005).

- Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical libre de DPPH \cdot est calculé de la manière suivante :

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

Où:

$A_{\text{contrôle}}$: C'est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception du composé d'essai).

$A_{\text{échantillon}}$: est l'absorbance du composé d'essai.

II.2. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS $^{+\cdot}$.

- Principe

Le radical ABTS $^{+\cdot}$ 2,2'-Azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), a été largement utilisé pour évaluer les propriétés antioxydante (Moon et Shibamoto., 2009). Il est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS $^{+}$. En présence du Trolox, (ou d'antioxydant donneur H \cdot), le radical d'azote concerné piège un H \cdot conduisant au cation l'ABTS $^{+\cdot}$ ce qui entraîne la décoloration de la solution bleue (Figure n°15).

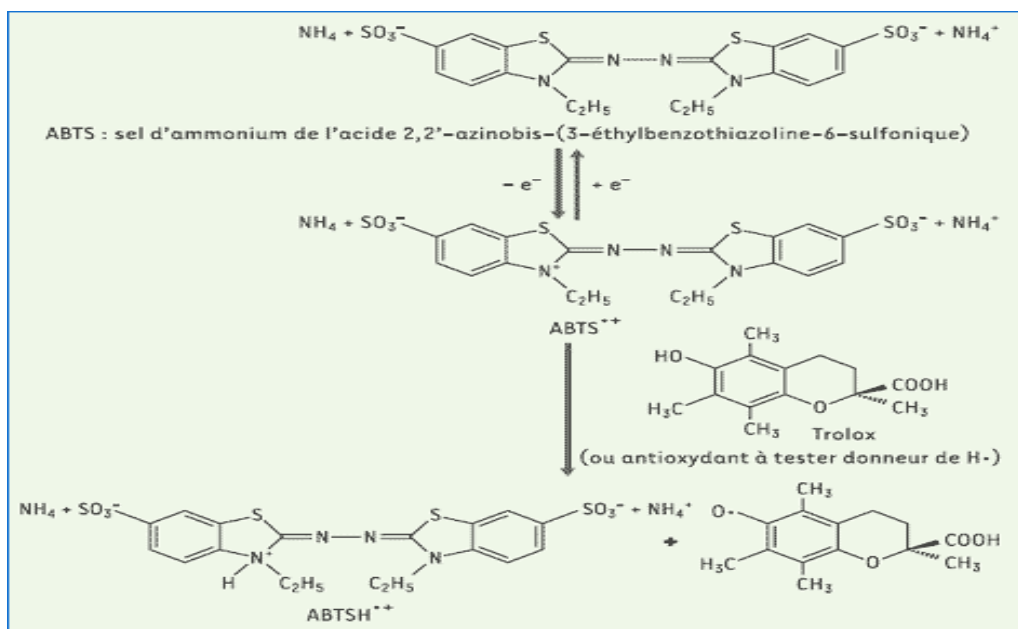


Figure n°15: Principe de la méthode ABTS $^{+\cdot}$ (Lien *et al.*, 1999).

- **Mode opératoire**

Suivant le protocole de **Lien et ses collaborateurs, (1999)**, avec quelques modifications, le radical ABTS⁺ est produit par la réaction entre une solution aqueuse d'ABTS⁺ (7mM) et une solution de persulfate de potassium (K₂S₂O₈, 2,45mM), utilisé comme oxydant. Ce mélange est incubé pendant 16 h, à l'obscurité puis dilué par de l'éthanol jusqu'en obtenir une absorbance de 0,7±0.02 UA, à 690 nm.

Un volume de 180µl de cette solution d'ABTS⁺ est ensuite mélangé avec 20µl d'HE à différentes concentrations (Figure n°16). Après 6 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 690 nm, à l'aide d'un lecteur microplaque.

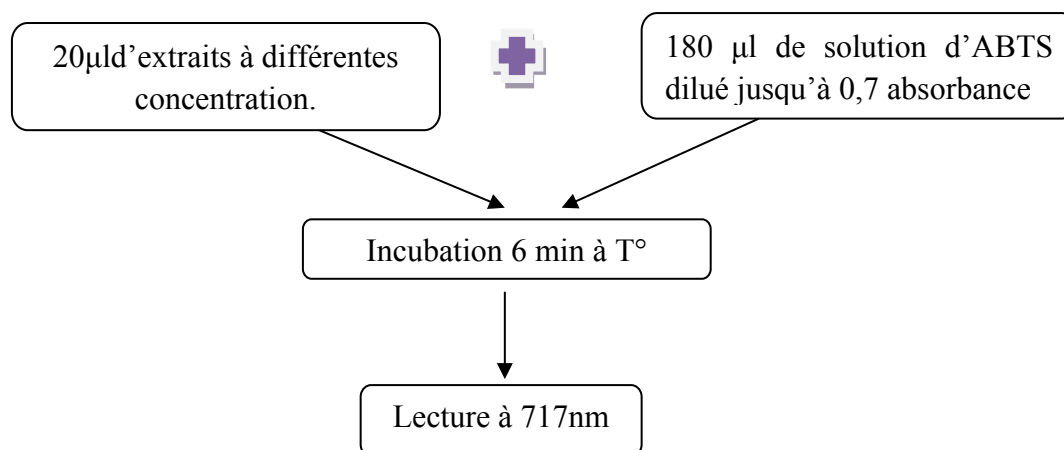


Figure n°16 : protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS⁺(**Lien et al.,1999**).

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition (I%) d'ABTS⁺ a été calculé de la manière suivante :

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

Où :

I% : est le pourcentage d'inhibition (I%) d'ABTS⁺.

A_{contrôle} : C'est l'absorbance de la réaction témoin (contenant tous les réactifs à l'exception du composé d'essai).

A_{extrait} : est l'absorbance du composé d'essai.

III. Analyse statistique

Le calcul des IC₅₀ est déterminé à l'aide du logiciel Graph pad Prisme version 6. L'analyse statistique retenue est l'analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification, selon les extraits testés. L'analyse révélait des différences significatives, elle est complétée par le test SNK (student Newman Keuls) (logiciel XL stat 15. V. 1).

Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extraction en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles des échantillons de deux sous espèces de Thym récoltés de différentes stations et extraites par deux méthodes (Hydrodistillation et CO₂ supercritique) sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Rendements en huiles essentielles des différentes espèces de Thymus, issus des deux méthodes d'extractions (HD et CO₂ supercritique).

| Espèces | Rendements HD | Rendements SFE |
|---|-------------------|-----------------------|
| <i>Thymus algeriensis</i>
(Taourirt-Ighil) (S1) | 1,8 (AF)
2 (F) | 0,69 (AF)
0,83 (F) |
| <i>Thymus algeriensis</i>
Bouhatem (S2) | 1,6 (AF)
2 (F) | 0,6 (AF)
0,89 (F) |
| <i>Thymus hirtus</i> (Ait ouabane) | 2,93 (F) | 0,78 (F) |
| <i>Thymus hirtus</i> (Chellata) | 1,8 (F) | 0,63 (F) |
| <i>Thymus hirtus</i> (Tala Guilef) | 1,89 (F) | 0,67 (F) |
| <i>Thymus hirtus</i> (Hizer) | 0,78 (F) | N.E. |
| <i>Thymus hirtus</i> (Tizi-nkouilel) | 1,2 (F) | 0,54(F) |
| <i>Thymus hirtus</i> (Tikjda) | 1,4 (F) | 0,57 (F) |

*N.E : Non Extrait

L'ensemble des échantillons des deux espèces de Thym a donné des rendements allant de 0,78% à 2,93%, pour la technique conventionnelle (hydrodistillation). Par contre ceux obtenus par le CO₂ supercritique se sont avérés faibles et varient entre 0,54% (*Thymus hirtus* de Tizi nkouilel) et 0,89% (*Thymus algeriensis* du foret Bouhatem). Ces taux considérés faibles pour la plus part des échantillons de deux plantes étudiées.

On remarque aussi que le taux d'extraction des HES au stade de la floraison est toujours supérieur à celui du stade avant la floraison chez l'espèce *T. algeriensis*, et ce avec les deux méthodes d'extractions, hydrodistillation et CO₂ supercritique.

Le rendement obtenu par hydrodistillation avec les échantillons de *T.algeriensis* est largement plus important que celui trouvé par **Hazzit et al., (2009)** qui est de 0,4%.

Dans une autre étude sur le même genre, **Kutta et ses collaborateurs, (2007)** ont constaté que le rendement moyen en huiles essentielles des échantillons de *T. pannonicus* et *T. vulgaris*, obtenus par la technique des fluides supercritiques, étaient d'environ 0,34% et 0,42%, respectivement.

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 (**Li et Chemat, 2014**). Ceci pourrait être en partie, l'un des facteurs influençant le rendement en huiles essentielles de certaines plantes aromatiques.

Par ailleurs, des rendements similaires ont été signalés par **Zayyad et son équipe, (2014)**, qui avoisinent ceux calculés pour *T. algeriensis* d'Ait-ouabane, avec 2,93%. Par contre, à travers l'étude conduite par **El Amrani et al., (2015)**, sur l'espèce *Argania spinosa*, des teneurs en HEs de 2,7% extraites par le CO₂ supercritique ont été enregistrées. Cette valeur est nettement supérieure au rendement de nos échantillons obtenu par le même procédé.

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 (**Merghache et al., 2009 ; Karousou et al., 2005 ; Kutta et al., 2007 ; Amarti et al., 2010**).

III.2. Activité antioxydante

Deux méthodes ont été choisies pour leur facilité de mise en œuvre et leur fiabilité pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des HEs. Il s'agit du test « DPPH· » (1.1-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) et « ABTS⁺ » acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

III.2.1. Activité antioxydante du radical synthétique DPPH·

Les résultats de l'effet antiradicalaire du DPPH·, obtenus par des HEs issues des deux méthodes d'extractions (Hydrodistillation et CO₂ supercritique), des deux espèces de Thym, *T.algeriensis* et *T. hirtus* et échantillonnées de différentes stations, sont illustrés dans la figure ci-dessous.

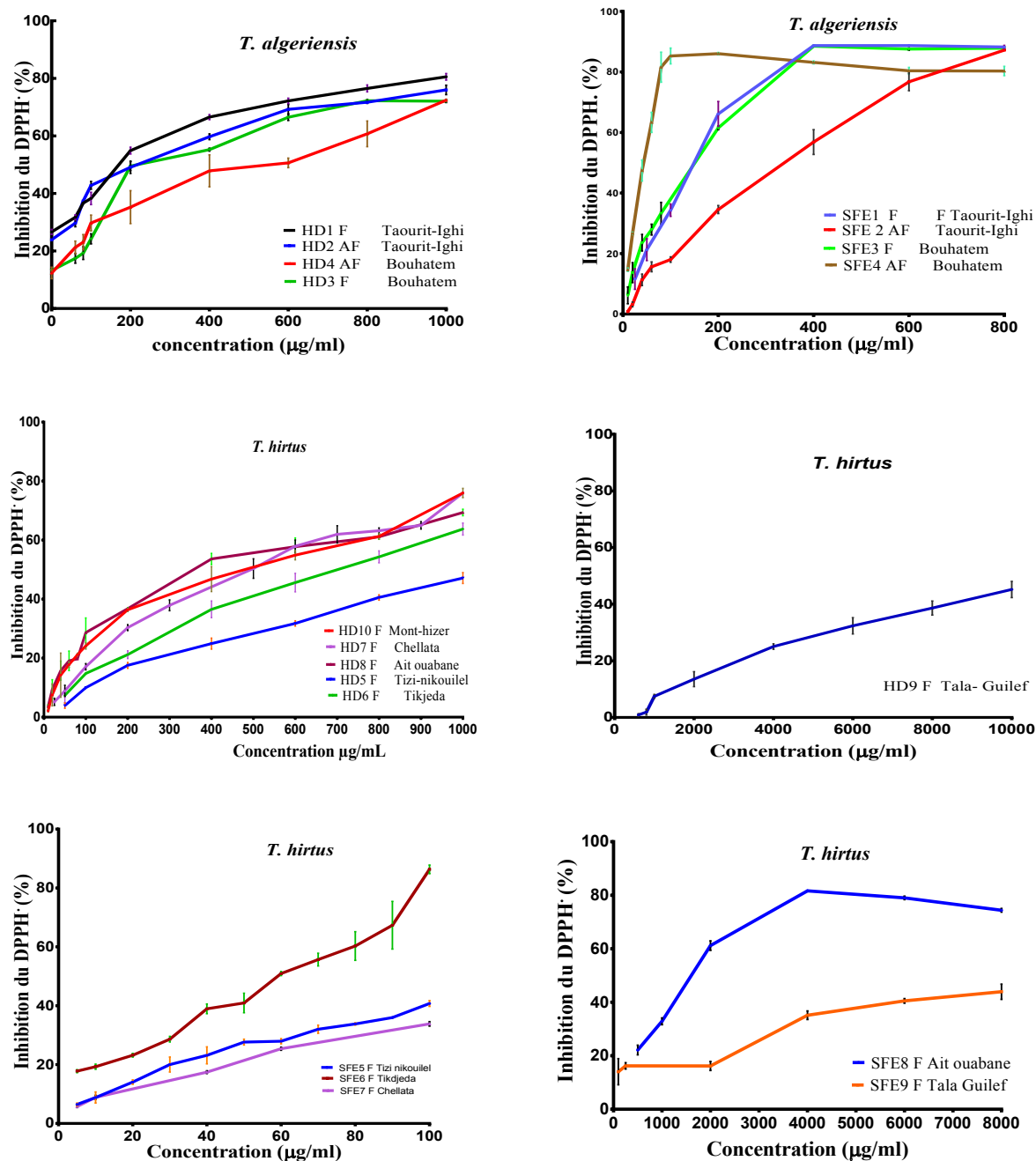


Figure n°17 : Variation du pourcentage d’inhibition du radical libre DPPH· des espèces étudiés.

Ces résultats montrent que les huiles essentielles de Thymus étudiées, témoignent d’un pouvoir antioxydant, *in vitro*, très intéressant notamment, celles de *T.algeriensis* (station Taourirt-Ighil et du foret de Bouhatem), et *Thymus hirtus* de différentes stations (Tikjda, Chellata, Ait-ouabane, Mont-Hizer et Tizi-nkouillel), à l’exception des HEs de la station de Tala-Guilef qui se singularisent avec une activité antiradicalaire très faible, même à des concentrations trop élevées.

Cette forte capacité de réduction des radicaux libres des essences étudiées peut être due à leurs profils chimiques, riches en phénols (Thymol et Carvacrol) (figure n°18). En effet ces deux derniers, constituants phénoliques ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant (Kulisic *et al.*, 2004 ; Tepe *et al.*, 2005). Cependant, la faible activité antioxydante de l'essence de *T. hirtus* de Tala Guilef pourrait être expliquée par sa faible teneur en ces derniers composés.

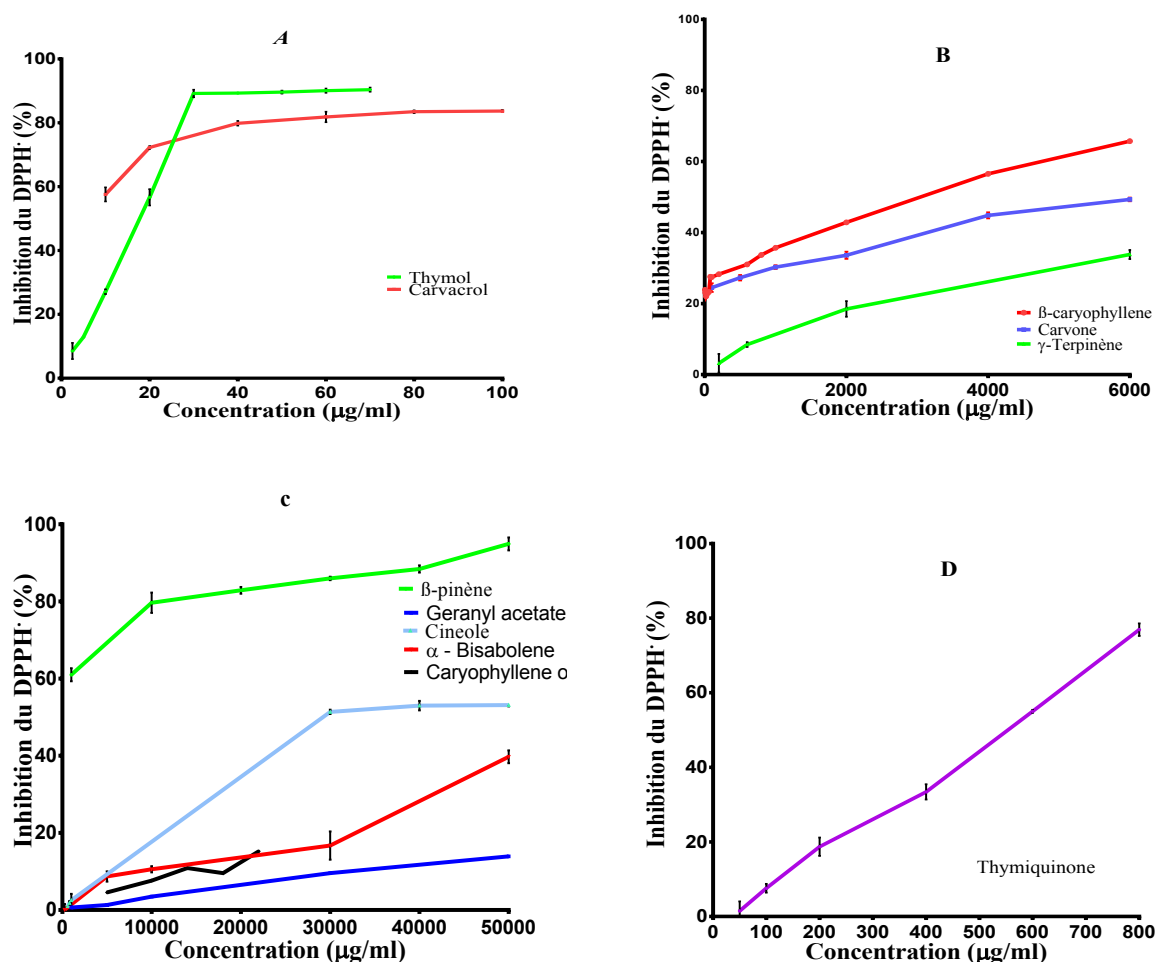


Figure n°18 : Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH· par les composés purs des huiles essentielles.

Par ailleurs, l'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne des faibles pourcentages d'inhibition du radical DPPH·, à l'exception du groupe de molécules monoterpéniques oxygénés « Thymol et Carvacrol ».

Aussi les effets antioxydants des huiles essentielles et d'extraits de plantes sont dus principalement à la présence des groupements hydroxyle dans leur structure chimique (Hussain, 2009). En effet, certains composés autres que les composés phénoliques tels que le γ -Terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante (Ruberto et Barrata, 2000).

I.2.1.1. Détermination des IC₅₀

La valeur des IC₅₀, autrement appelée concentration inhibitrice à 50%, est déterminée pour les HEs et les molécules chimiques pures des huiles essentielles. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui neutralise 50% du radical DPPH \cdot , ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une réduction de 50% de l'absorbance de la solution initiale du DPPH \cdot . Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger, dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano *et al.*, 2007).

L'efficacité des huiles essentielles à piéger le radical DPPH \cdot , est exprimée en pourcentage d'inhibition (Figure n°19).

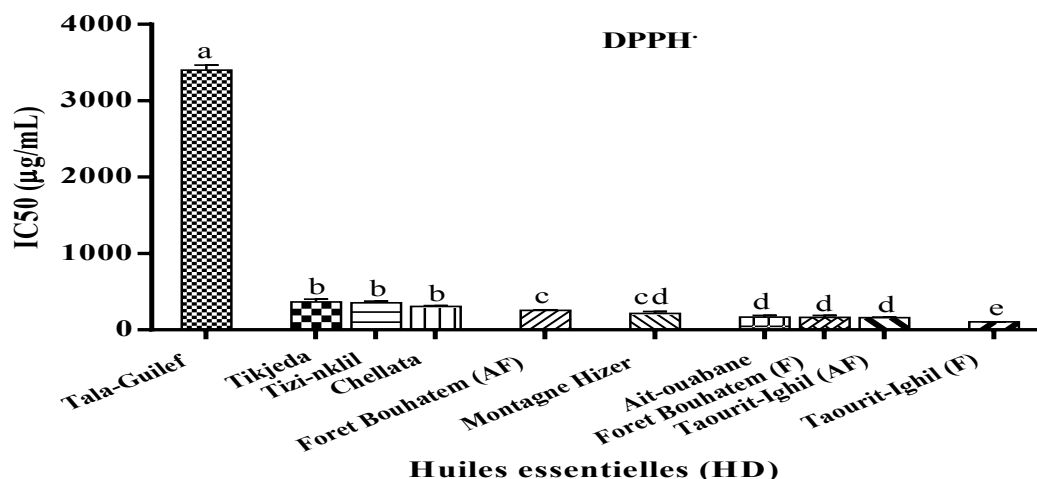


Figure n°19: Variation d'IC₅₀ des HEs des espèces étudiées. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

Les valeurs d'IC₅₀ représentées sur la figure ci-dessus, révèlent une variabilité du taux d'inhibition du radical DPPH \cdot par les HEs de chaque espèce étudiée. Parmi les huiles essentielles testées, l'essence de *Thymus algeriensis* de la station Taourirt- Ighil arrive en tête des résultats avec une IC₅₀ de $102,8 \pm 10,5$ µg/mL, qui correspond à la capacité antiradicalaire la plus élevée.

Cette forte activité a été également signalée par **Bakchiche et ses collaborateurs, (2014)**, qui ont précisé que l'huile essentielle extraite de *Thymus algeriensis*, récoltée de la région de Laghouat possède un pouvoir antioxydant important ($IC_{50} = 0.235 \pm 0.018$ mg /mL). Aussi les résultats obtenus pour l'espèce *T. algeriensis* se sont avérés très intéressants et plus importants comparativement aux travaux menés par **Ali et al., (2015)**, qui ont révélé une faible efficacité de l'huile essentielle de *T.algeriensis* de Tunisie en enregistrant une IC_{50} de l'ordre de 4310 ± 700 μ g/mL.

Les résultats obtenus montrent que la plus faible capacité antiradicalaire est enregistrée avec l'espèce *Thymus hirtus* récoltée au niveau de la station Tala Guilef qui représente la plus grande valeur d' IC_{50} ($2586 \pm 139,5$ μ g/mL).

A travers l'étude conduite par **Ceylan et son équipe, (2016)** l'HE de *T.hirtus* a révélée une bonne efficacité de piégeage du radical DPPH \cdot (85 % à une dose de 50 μ g/mL), comparativement à l'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes étudiées au cours de notre expérimentation.

Les variations notées dans les traitements des résultats obtenus sont soumises au test d'analyse de la variance (**Tableau IV**) selon un critère de classification. Lorsque l'effet de traitement est significatif, l'analyse est complétée par le test de Newman et Keuls.

Tableau IV : Analyse de variance des moyennes calculées (IC_{50}) en fonction des extraits issus de la méthode hydrodistillation.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|----------|----------|
| Modèle | 9 | 27333538,223 | 3037059,803 | 3520,285 | < 0,0001 |
| Erreur | 20 | 17254,627 | 862,731 | | |
| Total corrigé | 29 | 27350792,850 | | | |

Selon le facteur extrait, l'étude statistique confirme une variation hautement significative entre les moyennes calculées, avec $F = 3520,285$ pour $P < 0,0001$.

Concernant les extraits obtenus par la technique des fluides supercritiques, leur pouvoir antioxydant est illustré sur la figure n°20.

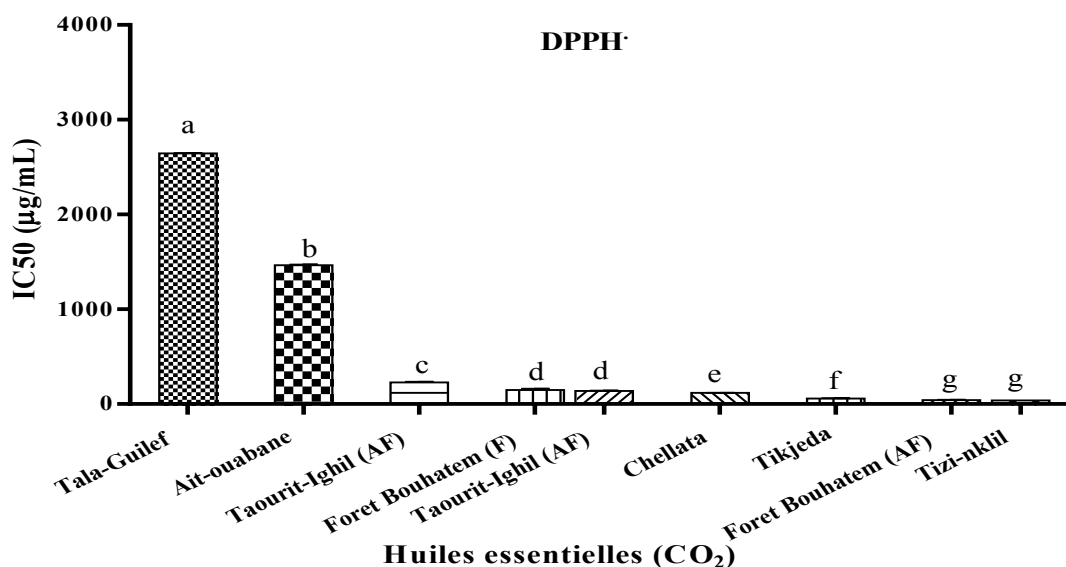


Figure n°20: Variations des IC₅₀ des HEs issues des fluides supercritiques des espèces étudiées. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

L'extrait de *T.hirtus* de la station Tizi-nkouilel présente la plus importante valeur d'IC₅₀ égale $39,4 \pm 2,6$ µg/mL, alors que celle de *T.hirtus* de la station de Tala-Guilef paraît être la moins performante avec un IC₅₀ de $2586 \pm 139,5$ µg/mL.

Xu *et al.*, (2011), ont signalé une faible activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Lepidium apetalum* de la famille des Brassicaceae, avec une valeur d'IC₅₀ égale à 1000 µg/mL. Cette activité antioxydante est faible pour la majorité des échantillons de différentes stations.

Dans l'étude réalisée par Gonçalves *et ses collaborateurs*, (2013), Ces derniers ont précisé que l'huile essentielle de *Calophyllum brasiliense* de la famille des Clusiacées possèdent un pouvoir antioxydant important (IC₅₀ = 149,35 µg/mL).

L'analyse statistique des données (TableauV) par le test de la variance à un facteur de classification (extrait) exhibe une différence hautement significative ($F = 41310,386$ pour $P < 0,0001$).

Tableau V : Analyse de variance des moyennes calculées (IC_{50}) des fluides supercritiques.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|-----------|----------|
| Modèle | 8 | 19810883,461 | 2476360,433 | 41310,386 | < 0,0001 |
| Erreur | 18 | 1079,014 | 59,945 | | |
| Total corrigé | 26 | 19811962,475 | | | |

Les résultats de l'analyse de la variance des extraits en fonction d' IC_{50} révèlent la présence d'une différence très hautement significative entre les moyennes calculées des différents extraits.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des composés des huiles essentielles, de leur part, sont présentés dans la figure n°21.

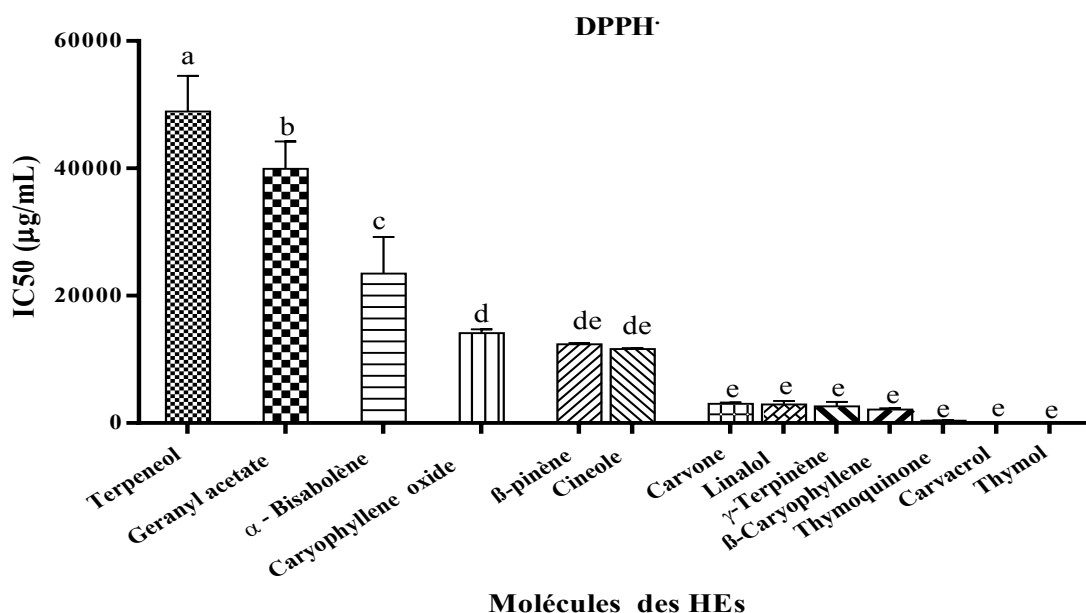


Figure n°21: Variations des IC_{50} des molécules des huiles essentielles. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

Les résultats représentés dans cette figure au dessous, nous montrent l'efficacité inhibitrice du radical DPPH \cdot par les molécules (majoritaires et minoritaires), composant les huiles essentielles, les monoterpènes oxygénés représentés par le Thymol et le Carvacrol, montrent un pouvoir antioxydant important avec des valeurs IC_{50} d'ordre de $15,9 \pm 1,1$ et $19,7 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$, respectivement. Hormis le Terpinéol qui se positionne à la dernière place, avec une IC_{50} égale à $45814 \pm 1662 \mu\text{g/mL}$.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Asdadi et ses collaborateurs, (2014)** confirmant le pouvoir antiradicalaire des composés phénoliques (Thymol, Carvacrol) étudiés. De même, **Aazza et son équipe, (2011)**, ont signalé un très bon pouvoir antioxydant pour les deux composés des HEs « Thymol et Carvacrol » avec une valeur IC_{50} de l'ordre 51 et 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement.

L'activité antioxydante de différents extraits de Thym étudiés est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques se trouvant dans sa composition chimique. En général, les HEs riches en composés oxygénés présentent une activité antiradicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (**Benov, 1994**).

Les variations notées dans les traitements des résultats (Tableau VI) obtenus sont soumises au test d'analyse de la variance selon un critère de classification. Lorsque l'effet de traitement est significatif, l'analyse est complétée par le test de Newman et Keuls.

Tableau VI : Analyse de la variance des moyennes calculées (IC_{50}) en fonction des composés individuels des HEs étudié.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|---------|----------|
| Modèle | 12 | 8903653327,346 | 741971110,612 | 312,951 | < 0,0001 |
| Erreur | 26 | 61643127,434 | 2370889,517 | | |
| Total corrigé | 38 | 8965296454,780 | | | |

Les résultats d'analyse de la variance selon un critère de classification révèlent une différence très hautement significative pour le facteur « extrait » ($F= 312,951$, pour $P< 0,0001$)

Une analyse complète du pouvoir antioxydant du DPPH· des échantillons des huiles essentielles des deux espèces de Thym, ainsi que les molécules pures des huiles essentielles, est illustré sur la figure n°22.

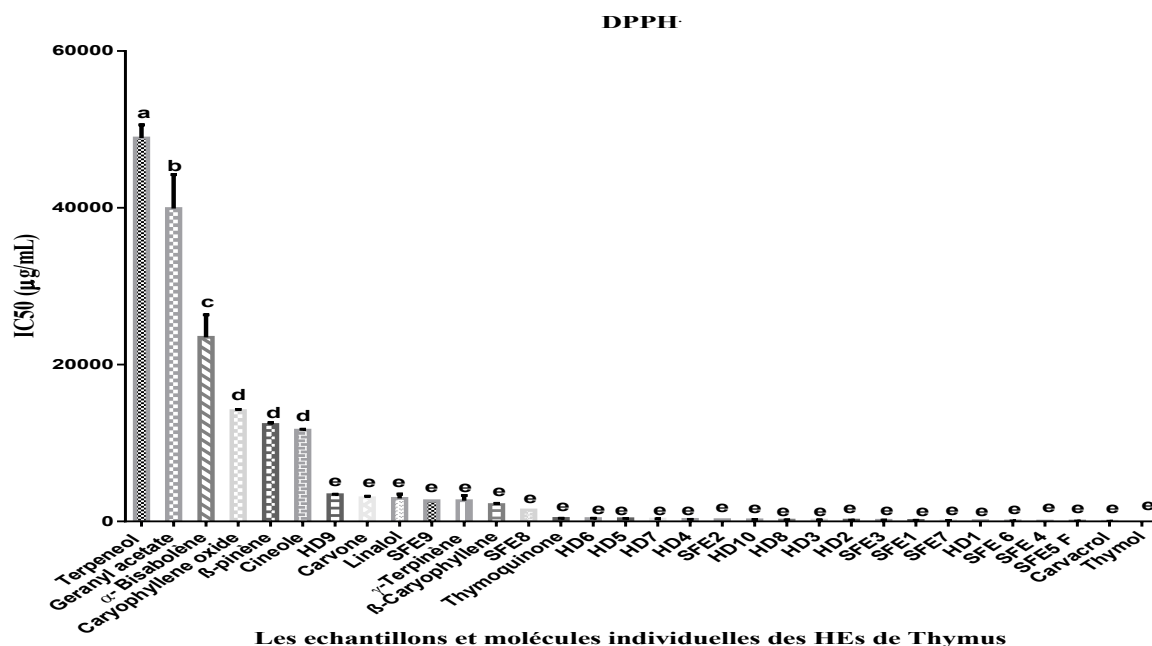


Figure n°22: Variations des IC₅₀ des HEs et les molécules majoritaires des huiles essentielles. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

La comparaison des moyennes d'IC₅₀ montre que toutes les HEs de *T.algeriensis* et *T. hirtus* appartiennent au groupe (e), ce dernier exhibe un pouvoir antioxydant important.

On remarque aussi que les monoterpènes oxygénés notamment le Thymol et le Carvacrol appartiennent à ce groupe, donc leur activité antioxydante pourrait être expliquée par sa forte teneur en composés phénoliques.

Cette dominance du Carvacrol dans l'essence de *T. capitatus* a été également signalée par **Bounatirou et al. (2007)**. D'autres auteurs ont signalé que l'huile de *T. capitatus* de la Sardaigne (Italie) est dominée par le Thymol (29,3%), alors que le Carvacrol ne représente que 10,8% de cette essence (**Cosentino et al., 1999**).

Les variations marquées dans les traitements des résultats obtenus (Tableau VII) (comparaison entre les IC₅₀ des extraits et les molécules étudiés) sont soumises au test d'analyse de la variance, selon un critère de classification. Lorsque l'effet du traitement est significatif, l'analyse est complétée par le test de Newman et Keuls.

Tableau VII : Analyse de la variance des molécules des huiles essentielles et les extraits étudiés.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|--------|----------|
| Modèle | 31 | 12456820766,889 | 401832927,964 | 45,346 | < 0,0001 |
| Erreur | 64 | 567140024,575 | 8861562,884 | | |
| Total corrigé | 95 | 13023960791,464 | | | |

Selon le facteur d'extrait (HEs et fluides supercritique) et les composés des essences, il existe également une variation avec ($F= 45,346$ pour $P < 0,0001$).

I-2-2. Activité antioxydante du radical ABTS⁺

La méthode anti-radicalaire de l'ABTS⁺ a été évaluée afin de déterminer l'activité antioxydante, *in vitro*, des huiles essentielles de deux plantes de la famille des Lamiaceae et du genre *Thymus*, en l'occurrence *T. algeriensis* et *T. hirtus* et les molécules pures des HEs,

Les variations enregistrées sont illustrées dans les figures ci-dessous. Elles représentent le pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺, en fonction de l'espèce étudiée (organe et stade phénologique), la position géographique de la station de cueillette (exposition), la méthode d'extraction utilisée et la concentration choisie.

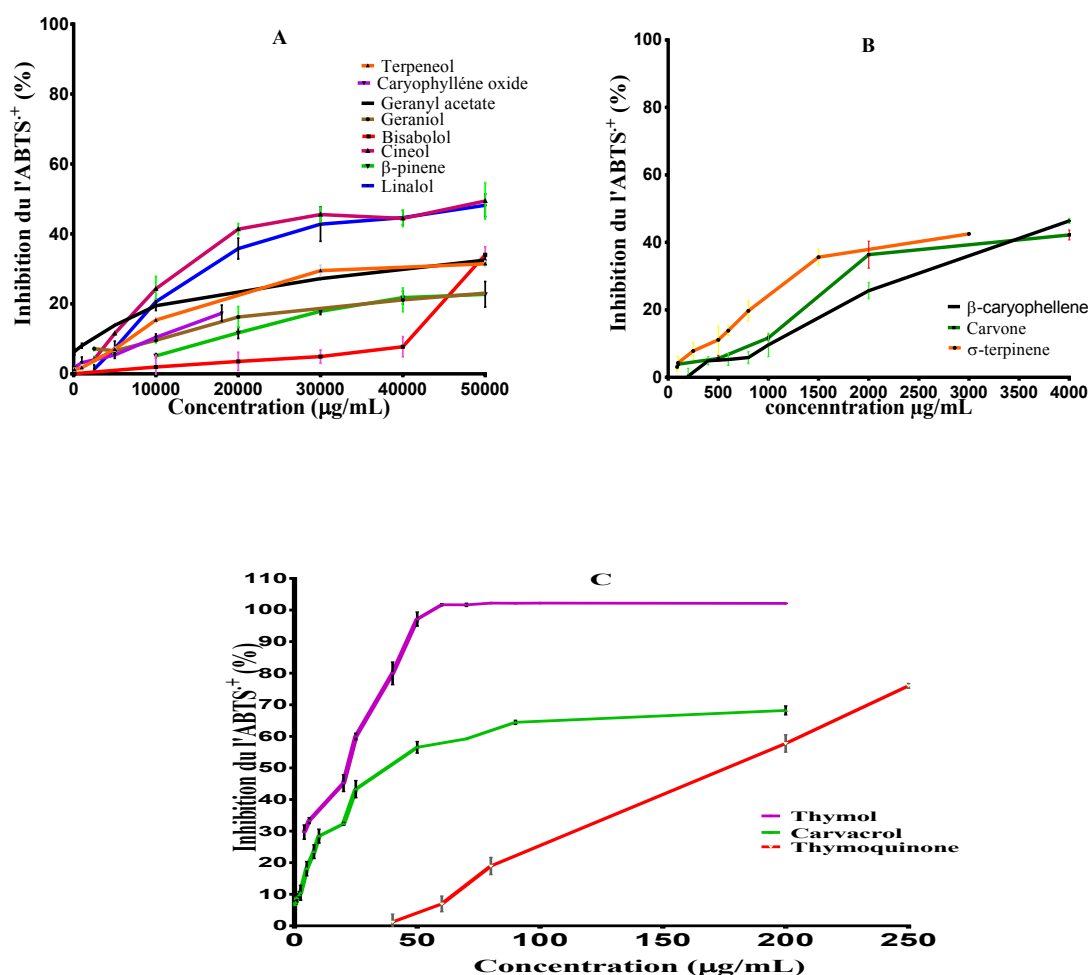


Figure n°23 : Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS⁺, en fonction des molécules des HEs.

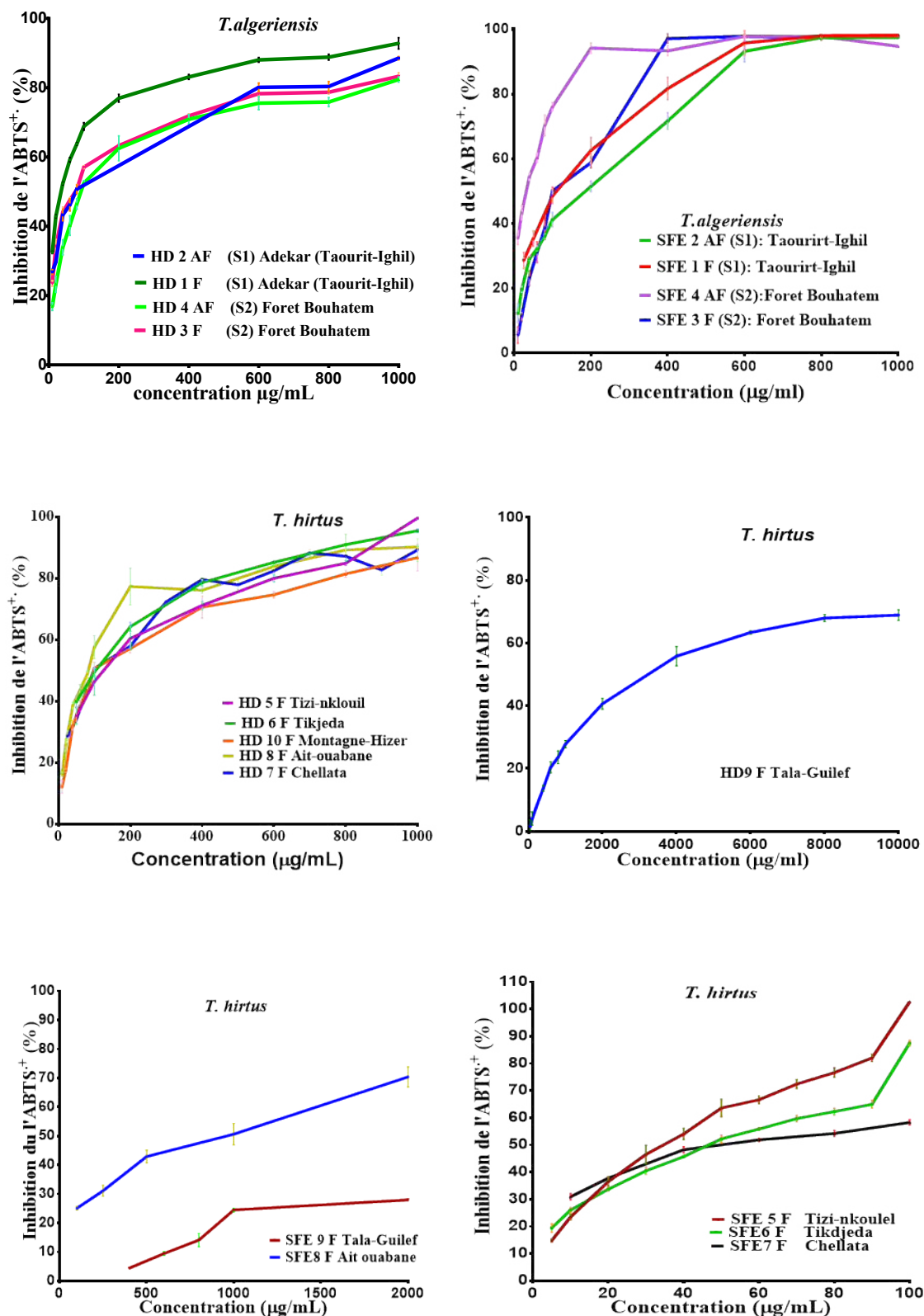


Figure n°24: Variation du pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS⁺ des espèces étudiés.

Hormis les HEs de la station Tala-Guilef qui se singularisent avec un pouvoir antiradicalaire très faible aux concentrations élevées, les graphes des figures ci-dessus montrent que les HEs de *T.algeriensis* et *T.hirtus* ainsi que les composés purs des HEs ont un pouvoir antiradicalaire très important, particulièrement celles de *T.algeriensis* de la station Taourirt-Ighil et du foret de Bouhatem et les extraits de *T.hirtus* des différentes stations.

Cette puissante capacité de réduction des radicaux libres des essences étudiées pourrait être due à la richesse en monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés tels que «Thymol, Carvacrol et Thymoquinone». En effet, la manifestation de l'activité antioxydante est due à la richesse en terpènes, tels que les phénols qui sont responsables de fortes activités antioxydantes (Tepe *et al.*, 2007). Par contre, le faible pouvoir antioxydant des HEs de *T. hirtus* de la station Tala-Guilef pourrait être expliqué par sa faible teneur en ces composées.

1.2.2.1-Détermination des IC₅₀

De même les valeurs IC₅₀ de l'activité inhibitrice du cation ABTS⁺ sont illustrées dans l'histogramme suivant (Figure n°25).

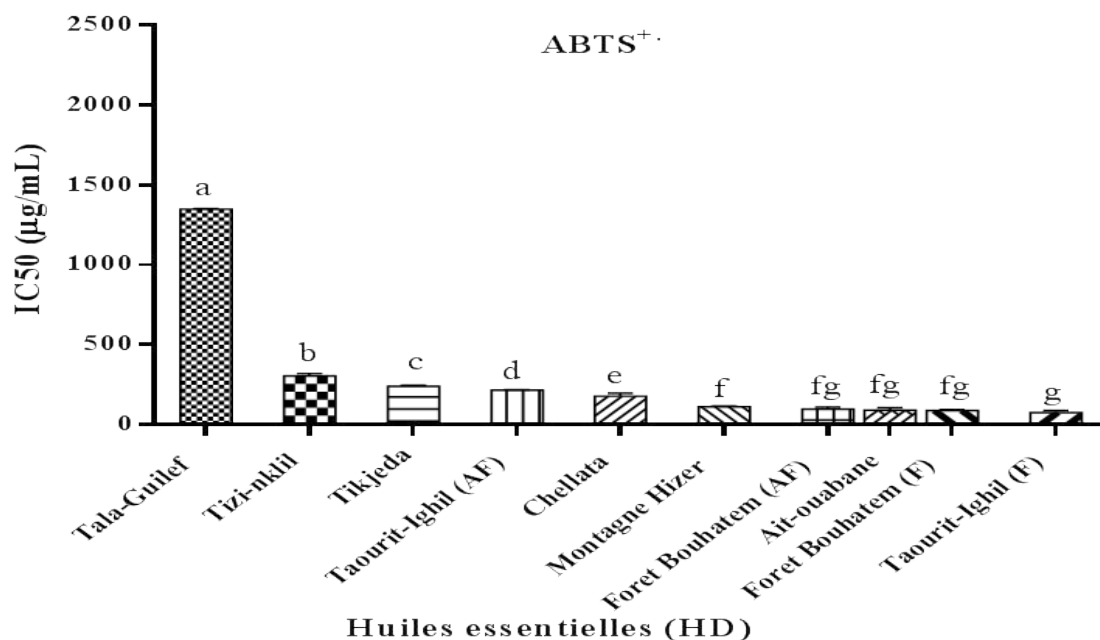


Figure n°25: Variation d'IC₅₀ des HEs des espèces étudiées. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha=0.05$).

D'après les représentations précédentes, nous remarquons une variabilité du taux d'inhibition du radical ABTS^{•+} pour les HEs de chaque espèces étudiée ; l'essence de *T.algeriensis* de la station Taourit-Ighil exhibe un pouvoir antioxydant très important avec une valeur d'IC₅₀ de $76,2 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$. Alors que l'échantillon de la station Tala-Guilef qui semble être la moins performante présente une IC₅₀ de l'ordre de $1325 \pm 91,5 \mu\text{g/mL}$.

Comparativement aux résultats de la présente étude, les travaux menés par **Ceylan et ses collaborateurs, (2016)** sur *T.hirtus* ont démontré une faible activité antiradicalaire de l'ABTS^{•+} (16 % à une dose de 50 $\mu\text{g/mL}$).

De leurs côté, **Ali et son équipe, (2015)**, en étudiant le *T.algeriensis* de différentes stations de Tunisie, ont signalé des IC₅₀ de l'ordre de $11,69 \pm 0,64$; $18,13 \pm 0,92$ et $28,23 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, qui sont plus importantes que celles calculées dans le présent travail. De même, **Aazza et Miguel, (2011)**, ont obtenu une activité antiradicalaire moins importante, avec une IC₅₀ de $3 \pm 2,4 \text{ mg/mL}$.

L'analyse statistique retenue et l'analyse de la variance (**Tableau VIII**) à un critère de la classification. Lorsque cette analyse révèle de différence significative, il est complété par le test de Newman et Keuls.

Tableau VIII: Analyse de la variance des moyennes calculées (IC₅₀) en fonction des extraits issus de la méthode hydrodistillation.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|----------|----------|
| Modèle | 9 | 4008635,654 | 445403,962 | 3405,313 | < 0,0001 |
| Erreur | 20 | 2615,935 | 130,797 | | |
| Total corrigé | 29 | 4011251,589 | | | |

Selon le facteur extrait, nous notons une différence hautement significative avec (F= 3405,313 pour P< 0,0001).

L'efficacité des HEs à piéger le radical DPPH[•] a été traduit par un concentration inhibitrice à 50 % est illustré dans la figure n°26.

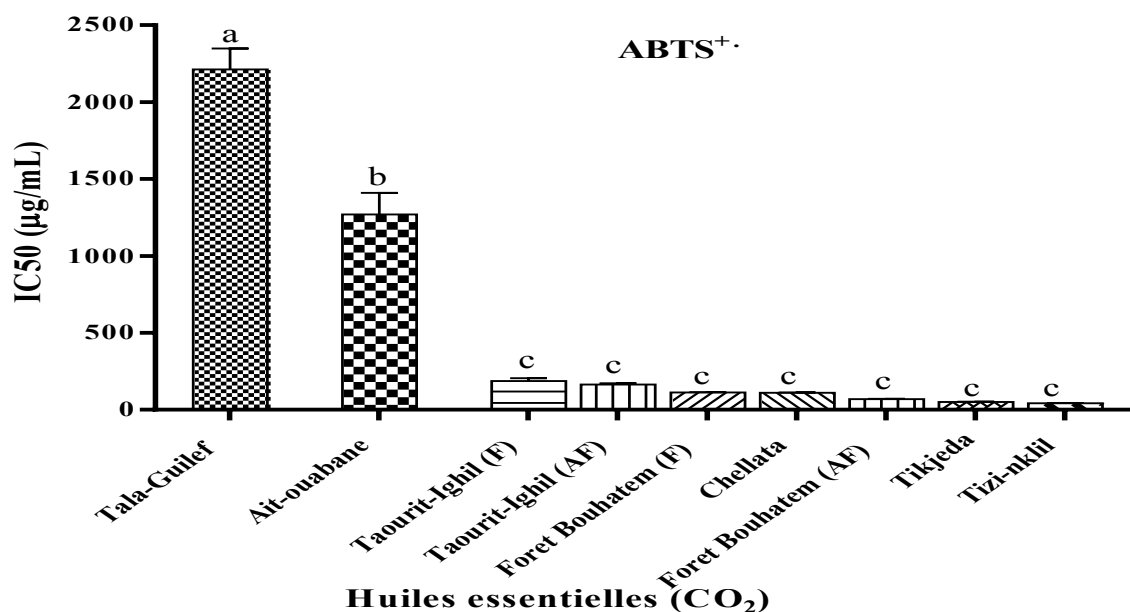


Figure n°26 : Variation d'IC₅₀ des fluides supercritique des espèces étudiés. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$)

L'extrait de Tala-Guilef présente le pouvoir anti oxydant le plus faible avec un IC₅₀ de l'ordre de 2213 ± 245 µg/mL. Hormis que, celle de *T.hirtus* Tizi-nkouilil exhibe la capacité antiradicalaire la plus importante avec une valeur d'IC₅₀ de 43,2 ± 3,4 µg/mL.

Les travaux de **Herzi et ses collaborateurs, (2013)** sur l'espèce *Tetraclinis articulata* de la famille Cupressaceae ont révélé une activité anti-radicalaire élevée avec une valeur IC₅₀ de 40,91 ± 0,53 µg/mL, qui est comparable avec nos résultats, notamment l'extrait de Tizi-nkouilel (IC₅₀ = 43,2 ± 3,4 µg/mL). De même, **Reátegui et son équipe, (2014)** démontre que *Rubus sp.* de la famille des Rosaceae, exerce une forte activité anti-radicalaire du radical ABTS⁺ avec des IC₅₀ de 59,67 ± 1,3 et 63,03 ± 1,99 µg/mL, à 40C° et 60C° respectivement.

L'analyse statistique (Tableau IX) des extraits par le test de la variance à un critère de la classification révèle une différence hautement significative (F= 272,871 et P< 0,0001) entre les différents extraits (CO₂).

Tableau IX : Analyse de la variance des moyennes calculées (IC_{50}) des fluides supercritiques.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|---------|----------|
| Modèle | 8 | 13873761,098 | 1734220,137 | 272,871 | < 0,0001 |
| Erreur | 18 | 114398,405 | 6355,467 | | |
| Total corrigé | 26 | 13988159,503 | | | |

L'efficacité des molécules des HEs à piéger le radical $ABTS^+$ a été traduit par le taux d'inhibition (IC_{50}). L'évolution de cette activité étudiée sont illustrés sur la figure n°27.

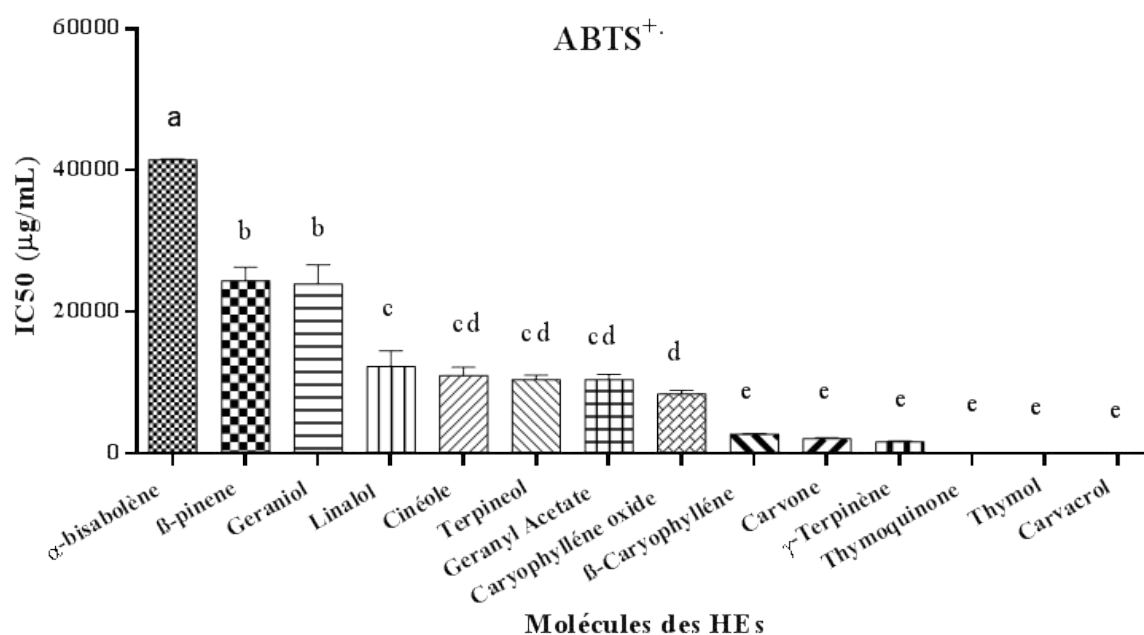


Figure n°27: Variation des IC_{50} des molécules des huiles essentielles. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

Le résultat présenté dans la figure ci-dessus, montre l'efficacité inhibitrice du radical $ABTS^+$, obtenue par les IC_{50} des molécules d'HEs. Les monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés, tels que le Thymol, le Carvacrol et le Thymoquinone exhibent un pouvoir antioxydant important avec des IC_{50} de $20,7 \pm 1,3$; $13,1 \pm 0,7$ et $118,72 \pm 33,57$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Par contre, le α -Bisabolène, qui semble être le moins performant, exhibe une valeur IC_{50} de $41468 \pm 149,92$ $\mu\text{g/mL}$.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Malekitaba et Nickavar, (2016)** sur les composés HEs (Thymol) du genre *Thymus*, montrent une forte activité antioxydante.

L'analyse statistique (Tableau X) des molécules individuelles d'HEs par le test de la variance à un critère de la classification révèle une différence hautement significative (F= 273,610 pour P < 0,0001).

Tableau X : Analyse de la variance des molécules individuelles des huiles essentielles.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|---------|--------|
| Modèle | 13 | 5634646997,993 | 433434384,461 | 273,610 | 0,0001 |
| Erreur | 28 | 44355628,729 | 1584129,597 | | |
| Total corrigé | 41 | 5679002626,722 | | | |

Les molécules des huiles essentielles et les essences ont montré un pouvoir antioxydant important, avec des taux d'inhibition variable. L'évolution de cette activité est présentée sur la figure n°28.

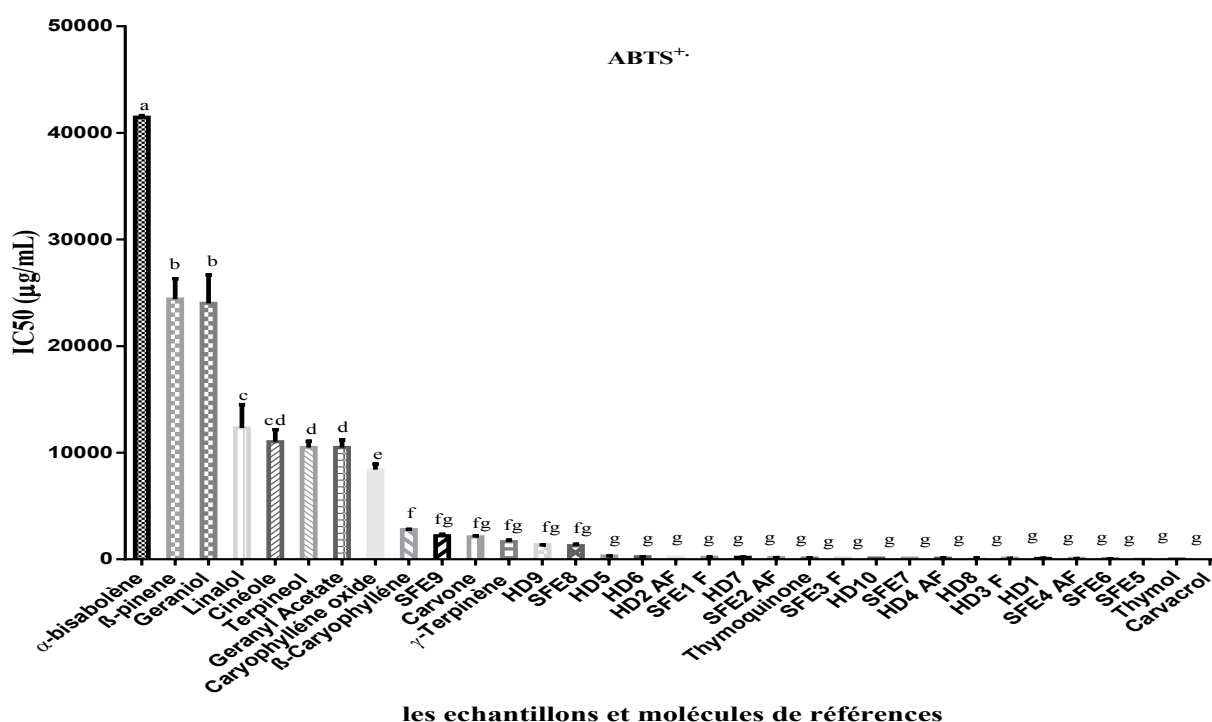


Figure n°28 : Variation des IC₅₀ des HEs et les molécules individuelles des huiles essentielles. Les valeurs des moyennes (trois répétitions) ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Newman & Keuls ($\alpha = 0.05$).

La comparaison des moyennes d'IC₅₀ ont montré que toutes les HEs appartiennent au groupe (g) qui présentent un pouvoir antioxydant important, ceci pourrait être dû à la richesse des HEs étudié en « Thymol, Carvacrol et Thymoquinone ».

Les résultats des analyses d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont caractérisés par une très forte proportion de monoterpènes (97,64 %), surtout oxygénés (63,21%), dans laquelle le Carvacrol (55,2%), le Linalol (3,9%) ont été les principaux composants avec une teneur faible en Thymol (1,5%). La fraction monoterpènes hydrocarbonés représente 34,01% d'huile essentielle et représentée par le γ -Terpinène (12,5%), le p-cymène (9,2%) et le A-Pinène (2,92%) en tant que principaux constituants. En revanche, la fraction sesquiterpénique était plus faible (2,4%). Les résultats précédents ont montré que notre huile a été caractérisée par la présence de cinq composés dominant, le Carvacrol (55,2%), γ -Terpinène (12,5%), le p-Cymène (9,2%), le Linalol (3,9%) et le α -Pinène (2,9%). Ces composés ont déjà été trouvés en tant que constituants de la plupart des huiles essentielles de *Thymus* (Sidali *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus (Tableau XI) sont soumises au test d'analyse de la variance selon un critère de classification. Lorsque l'effet de traitement est significatif, l'analyse est complétée par le test de Newman et Keuls.

Tableau XI : l'analyse de la variance des molécules des huiles essentielles et les extraits étudiés.

| Source | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F | Pr > F |
|---------------|-----|------------------|--------------------|---------|----------|
| Modèle | 32 | 8217034363,629 | 256782323,863 | 381,080 | < 0,0001 |
| Erreur | 66 | 44472643,070 | 673827,925 | | |
| Total corrigé | 98 | 8261507006,699 | | | |

L'analyse montre une différence hautement significative (F= 381,080 pour P<0,0001) pour le facteur extrait.

Conclusion et perspectives

La présente étude a permis d'évaluer le potentiel antioxydant des huiles essentielles et des composés volatiles issus du genre *Thymus* de la famille des Lamiaceae. C'est une première évaluation comparative sur les extraits de deux plantes spontanées de la région de Kabylie.

Dans un premier temps, deux procédés d'extraction simples et rapides sont été choisis pour extraire les produits bio-tests; l'hydrodistillation et l'extraction au CO₂ supercritique. La technique conventionnelle a fournie les meilleurs rendements en huiles essentielles des espèces considérées. Ils varient entre 0,78% et 2,93%. Contrairement à cette dernière, les composés volatiles obtenus par le procédé des fluides supercritiques présentent des taux d'extractions nettement inférieures à ceux de l'hydrodistillation. Ces différences sont attribuées à la conjugaison de plusieurs facteurs, en particulier, les facteurs génétiques, la position géographique, la période de récolte, la nature du sol, les conditions climatiques et le temps et l'appareillage d'extraction.

Le second objectif de ce présent travail est l'étude comparative de l'activité antioxydante, vis-à-vis de deux radicaux synthétiques, à savoir le DPPH[•] et ABTS⁺. Des extractibles volatiles (HEs et composés volatiles) des deux espèces de Thym. En effet, une efficacité remarquable de l'HE de *T. algeriensis* de Taourirt-Ighil avec un IC₅₀=102,8±10,5 µg/mL (extraite par hydrodistillation) et *Thymus hirtus* 39,4 ±2,6 µg/mL de la station Hizer (fluide supercritique) a été révélée. Les mêmes échantillons ont présenté les meilleures activités antiradicalaires de l'ABTS⁺ 76, 1±4,8 µg/mL ; 43, 2±3,4 µg/mL, respectivement. Part contre, le *T. hirtus* de la station Tala-Guilef présente la plus faible activité antioxydante pour les deux méthodes d'extractions.

En s'appuyant sur ces différents résultats, ainsi que sur l'analyse statistique, nous avons constaté que les huiles essentielles de *T. algeriensis* et *T. hirtus* étudiées, possèdent une très bonne activité antioxydante, qui peut être due à leurs richesses aux monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés notamment, le Carvacrol, le Thymol et le Thymoquinone.

A l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour une bonne exploitation des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles :

- ✚ Etudier les différents facteurs influençant la variabilité de la composition en différents constituants.
- ✚ Mesurer l'activité antioxydante en utilisant d'autres tests.
- ✚ Le fractionnement de ces extraits et l'identification des molécules responsables de la meilleure activité.
- ✚ Evaluer le potentiel, *in vivo*, de ces huiles ainsi que de leur toxicité sur des modèles d'animaux de laboratoire.
- ✚ La valorisation des extraits par des tests sur les activités biologiques telles que l'activité anticancéreuse et anti acétylcholine estérase.
- ✚ Exploitation de ces procédés à l'échelle industrielle pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire.

*Références
bibliographiques*

.Aazza, S., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(30), 6688-6696.

.Ali, I. B. E. H., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., & Harzallah-Skhiri, F. (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops and Products*, 77, 631-639.

.Amarowicz, R., Naczki, M., & Shahidi, F. (2000). Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2755-2759.

.Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., ... & Chaouch, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, 9(3), 149-157.

.Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., ... & Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1), 141.

.Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419-421.

.Asdadi, A., Moutaj, R., Hadek, M. E., & Idrissi, L. M. (2014). Chemical polymorphism of populations of *Thymus Leptobotrys* L. harvested from the Argan Tree regions of Morocco, assessed by analysis of their essential oils, and its impact on their anticandidal and antioxidant activity. *Int J Pharm Sci Invent*, 3, 60-70.

.Bakchiche, B., & Gherib, A. (2014). Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(1), 167.

.Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

- Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris : Ibis Press. p.358.
- Benkherara, S., Bordjiba, O., & Djahra, A. B. (2013).** Action des Principes Actifs Naturels d'une Plante Aromatique Algérienne Vis-à-Vis des Entérobactéries Pathogènes. *Algerian Journal of Arid Environment*, 3(2), 15-23
- Benov, L., & Georgiev, N. (1994).** The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*, 8(2), 92-94.
- Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014).** Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 52, 177-182.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., ... & Pedro, L. G. (2007).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155.
- Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010).** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igc, R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
- Brahmkshatriya, P. P., & Brahmshatriya, P. S. (2013).** Terpenes: Chemistry, biological role, and therapeutic applications. In *Natural Products* (pp. 2665-2691). Springer Berlin Heidelberg.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bruneton J. (1999)** .Huile essentielles, in pharmacognosie – phytochimie plante médicinales.3^{eme} éd. Doc. et tec .Lavoisier.

.Capuzzo, A., Maffei, M. E., & Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 18(6), 7194-7238.

.Ceylan, R., Zengin, G., Uysal, S., Ilhan, V., Aktumsek, A., Kandemir, A., & Anwar, F. (2016). GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 983-990.

.Charles, D. J. (2012). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer Science & Business Media.

.Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.

.Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832-7836.

.Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, C. (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *International Journal of Aromatherapy*, 16(2), 95-100.

.Dongmo, P. M. J., Tchoumboungang, F., Ndongson, B., Agwanande, W., Sandjon, B., Zollo, P. H. A., & Menut, C. (2010). Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 606-611.

.Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research*, 21(4), 308-323.

.El Amrani, A., Sánchez, J. A. C., & Eddine, J. J. (2015). Chemical Composition of Moroccan *Argania spinosa* leaf Essential Oils Isolated by Supercritical CO₂, Microwave and Hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(5), 1138-1147.

.El Babili, F., Babili, M. E., Souchard, J. P., & Chatelain, C. (2013). Culinary decoctions: Spectrophotometric determination of various polyphenols coupled with their antioxidant activities. *Pharm. Crop*, 4, 15.

.El Bouzidi, L., Jamali, C. A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., & Abbad, A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products*, 43, 450-456.

.Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., & Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*, 36(1), 35-40.

.Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.

.Francois-Xavier,G.(2001). Le materiel vegetal et les huiles essentielles. *Corporation: LASEVE-UQAC, Chicoutimi (Quebec) G7H 2B1 Huiles essentielles: de la plante à la commercialization*. *Fundamentals in Organic Geochemistry: A Review*. © Springer International Publishing Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-25075-5_3.

.Gazzani, G., Papetti, A., Daglia, M., Berte, F., & Gregotti, C. (1998). 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*, 46(10), 4123-4127.

.Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Smole Možina, S., & Katalinić, V. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 119-127.

.Gonçalves, R. M., Lemos, C. O. T., Leal, I. C. R., Nakamura, C. V., Cortez, D. A. G., da Silva, E. A., ... & Cardozo-Filho, L. (2013). Comparing conventional and supercritical extraction of (-)-Mammea A/BB and the antioxidant activity of *Calophyllum brasiliense* extracts. *Molecules*, 18(6), 6215-6229.

.Guignard J-L. (1996). Métabolites secondaires-Biochimie végétal. Edition MASSON. 169-231 p.

.Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85

.Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142-151

.Haoui, I. E., Derriche, R., Madani, L., & Oukali, Z. (2015). Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(4), 587-590.

.Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*, 116(3), 714-721.

.Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M., & Condoret, J. S. (2013). Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food chemistry*, 141(4), 3537-3545.

.Hussain, A. I. (2009). *Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae* (Doctoral dissertation, University of Agriculture, Faisalabad).

.J. Brunton, (1993). « *Pharmacognosie photochimie, plantes médicinales* », 2ème éd., Lavoisier, Paris.

.Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier.

.Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76(6), 626-631

.Kanko, C., Sawaliho, B. E. H., Kone, S., Koukoua, G., & N'Guessan, Y. T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus chimie*, 7(10), 1039-1042.

.Karousou, R., Koureas, D. N., & Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.

.Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713-3717.

.Kuliscic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640.

.Kutta, G., & Sz, S. (2007). Yield and composition of supercritical fluid extracts of different Lamiaceae herbs. *International Journal of Horticultural Science*, 13(2), 79-82.

.Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2014). Essential oils: from conventional to green extraction. In *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* (pp. 9-20). Springer International Publishing

.Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3), 285-294.

- .Ložienė, K., Venskutonis, P. R., Šipailienė, A., & Labokas, J. (2007).** Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food chemistry*, 103(2), 546-559.
- .Malekitabar, E., & Nickavar, B. (2016).** Identification of volatile components in two *Thymus* species from Iran and their antioxidant properties. *Julius-Kühn-Archiv*, (453), 117.
- .Mamadaliyeva, N. Z., Sharopov, F., Satyal, P., Azimova, S. S., & Wink, M. (2017).** Composition of the essential oils of three Uzbek *Scutellaria* species (Lamiaceae) and their antioxidant activities. *Natural product research*, 31(10), 1172-1176.
- .Masango, P. (2005).** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.
- .Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*, 103(3), 778-786.
- .Merghache, S., Hamza, M., & Tabti, B. (2009).** Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. De Tlemcen, Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(1).
- .Misra, K., Dhillon, G. S., Brar, S. K., & Verma, M. (2014).** Antioxidants. In *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (pp. 117-138). Springer New York.
- .Miura, K., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (2002).** Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1845-1851.
- .Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
- .Morales, R. (2002).** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: the genus Thymus*, 1-43.
- .Nelson, R. R. (1997).** In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(2), 305-306.
- .Nickavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005).** Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90(4), 609-611
- .Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., ... & Soković, M. (2014).** 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*, 52, 183-190.

.Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., & Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 39(3), 167-170.

.Pardini F. ; Lucheroni M.T (1996) : Le grand livre des Huiles essentielles. Ed. de Vecchi.

.Peter, K. V. (Ed.). (2004). *Handbook of herbs and spices* (Vol. 2). Woodhead publishing

.Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., ... & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73-78.

.Pinto, E., Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., & Gonçalves, M. J. (2007). In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 135-141.

.Pirbalouti, A. G., Hashemi, M., & Ghahfarokhi, F. T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43-48.

.Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163(1), 2-24.

.Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O. K., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J. (2013). Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, 2(1), 11-22

.Quezel, P. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).

.Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.

.Rassem, H. H. (2016). Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16), 117-127.

.Reátegui, J. L. P., da Fonseca Machado, A. P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2014). Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 223-233.

- .Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- .Rozzi, N. L., Phippen, W., Simon, J. E., & Singh, R. K. (2002).** Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. *LWT-Food Science and Technology*, 35(4), 319-324.
- .Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000).** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69(2), 167-174.
- .Soare, J. R., Dinis, T. C., Cunha, A. P., & Almeida, L. (1997).** Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free radical research*, 26(5), 469-478.
- .Stahl-Biskup E. (2002),** Essential oil chemistry of the genus *Thymus* D a global view. In: *Thyme D The Genus Thymus* (Stahl-Biskup E. and Saez F., eds.). Francis & Taylor, London, pp. 75D124.
- .Tepe, B., Sihoglu-Tepe, A., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007).** Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, 103(3), 766-770.
- .Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2005).** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of food engineering*, 66(4), 447-454.
- .Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014).** Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- .Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., ... & Tepe, B. (2003).** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 63-67.
- .Villaño D., Fernández-Pachón M-S., Moyà M-L., Troncoso A-M and Garcia-ParillaM-C. (2007).** Radica scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71, p 230-235.
- .Wu, J. H., Tung, Y. T., Wang, S. Y., Shyur, L. F., Kuo, Y. H., & Chang, S. T. (2005).** Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 5917-5921.
- .Xu, W., Chu, K., Li, H., Chen, L., Zhang, Y., & Tang, X. (2011).** Extraction of *Lepidium apetalum* seed oil using supercritical carbon dioxide and anti-oxidant activity of the extracted oil. *Molecules*, 16(12), 10029-10045.

Zambonelli, A., d'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10), 491-494.

Zayyad, N., Farah, A., & Bahhou, J. (2014). Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de Thymus: Thymus zygis, T. algeriensis et T. bleicherianus. Chemical analysis and antibacterial activity of essential oils from three species of Thymus: Thymus zygis, T. algeriensis, and T. bleicherianus. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 83, 118-132.

Résumé :

Ce travail a pour but la détermination des propriétés antioxydante, *in vitro*, des huiles essentielles extraites par hydrodistillation ou CO₂ supercritique, de deux espèces de Thyms, à savoir *T.algeriensis* *T.hirtus* poussant à l'état spontané dans la région de Kabylie. En effet, l'activité antioxydante, *in vitro*, a été déterminée par deux tests « DPPH· et ABTS^{·+} ». Toutes les HEs étudiées présentent des activités antioxydantes à différents niveaux. En effet, une efficacité remarquable de l'HE de *T.algeriensis* de Taourirt-Ighil avec une IC₅₀=102,8±10,5µg/mL (extraite par hydrodistillation) et de *Thymus hirtus* (IC₅₀= 39,4 ± 2,6 µg/mL) de la station Hizer (fluide supercritique) a été révélée. Les mêmes échantillons ont présenté les meilleures activités antiradicalaires de l'ABTS^{·+}. Avec des valeurs IC₅₀ de 76, 1 ± 4,8 et 43, 2 ± 3,4 µg/mL, respectivement. Tandis que les HEs de *T. hirtus* de la région de Tala-Guilef présente l'activité antioxydante la plus faible pour les deux méthodes d'extractions.

Mots clés : Molécules antioxydante, huiles essentielles, *Thymus algeriensis*, *Thymus hirtus*, CO₂ supercritique, Hydrodistillation.

Abstract:

This work aims to investigate antioxidant properties, *in vitro*, of essential oils extracted by hydrodistillation or supercritical CO₂ of two species of Thymus, namely *T. algeriensis* and *T. hirtus* growing spontaneously in the region of Kabylia. In fact, the antioxidant activity, *in vitro*, was determined by two tests, namely DPPH· and ABTS^{·+}. All samples studied show antioxidant activities at different levels. A remarkable efficacy of *T.algeriensis* from Taourirt-Ighil with an IC₅₀ of 102.8 ± 10.5 µg/mL (extracted by hydrodistillation) and *Thymus hirtus* (IC₅₀ = 39.4 ± 2, 6 µg/mL) of the Hizer station (supercritical fluid) was revealed. The same samples showed the best anti-free radical activities of ABTS^{·+} With IC₅₀ values of 76, 1 ± 4.8 and 43.2 ± 3.4 µg/mL, respectively. While essential oils of *T. hirtus* of the Tala-Guilef region exhibit the lowest antioxidant activity for both extraction methods.

Key words: Antioxidant molecules, essential oils, *Thymus algeriensis*, *Thymus hirtus*, supercritical CO₂, hydrodistillation.