

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaire
Filière : Science Alimentaire
Option : Biotechnologie, Agro ressources, Alimentaire et Nutrition



Réf :.....

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

MASTER

Thème

*Evaluation de l'activité antioxydante
des huiles essentielles de Calamintha
officinalis et Abies numidica*

Présenté par :

KHIMA Souhila & MERABTI Celia

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^r. BOUKHALFA Farid

M^{me}. BRAHMI Fatiha

M^{me}. FELLA Samira

MAA

MAA

MAA

Président

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice **M^{lle} BRAHMI F.** pour avoir accepté de nous encadrer, pour la confiance qu'elle nous a faite, pour les conseils qu'elle nous a accordés tout au long de la réalisation de ce modeste travail. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et l'expression de notre vive reconnaissance.*

*Nos remerciements vont aussi à **M^r BOUKHALFA F.** d'avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.*

*Nous remercions également **M^{me} FELLA S.** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nos Vifs remerciement pour **M^{me} DIBE S.** pour son aide et ces précieux conseils.*

Sans oublier les membres du laboratoire de Technologie Alimentaire et 3BS pour leur disponibilité, leur sympathie et leur gentillesse, ainsi que tous les enseignants qui ont contribué a notre formation, qu'ils retrouvent à travers ce mémoire le fruit de leurs longues années de travail.

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Souhila & Celia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*A mes très chère parents, symboles de courage et de volonté, qui ont consacré et sacrifié
leurs vie pour mon bien être ;*

A mes très chères et adorables sœurs :Aida, Nassima et Melissa ;

A mes anges chaima et Assma ;

A mes oncles et tantes ;

A ma très chère binôme CELIA et sa famille ;

A Namir qui m'a aidé le long de parcours, à qui J'adresse tous mes respects ;

A mes amie :Amina, Nedjma, Rbiha et Karima ;

Toute la promotion de biotchnologie 2014/2015 ;

Et à tous les êtres chers à mes yeux que je n'est pas évoqués.

Souhila

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études et que je remercie chaleureusement ;

A ma grand-mère pour ses précieux conseils et ses encouragements ; sans oublier mon grand-père « que Dieu l'accueille dans son vaste paradis » ;

A mon frère Juba ;

A mes sœurs Chinez et Soussa ;

A mes tantes Safia, Hakima, Fouzia, ainsi que leurs familles ;

A mes collègues et amis plus particulièrement Karima, Saida, Siham, Nawel, Lamia, Celia, Chanez et Yamina pour les moments sympathiques qu'on a partagés, et surtout ;

A Namir, Monia & Dodo qui ont toujours été à mes côtés pour m'apporter leurs aides et leurs encouragements ;

A ma binôme Souhila et sa famille ;

A Noria et Cylia, pour les bons et les mauvais moments qu'on a passé et enduré ensemble.

Celia

Liste des abréviations

- **ABTS⁺**: 2, 2-Azinobis 3-éthyle-Benzo Thiazoline-6-Sulphonate.
- **BHA** : Butyl Hydroxy Anisole.
- **DMPD** : Balayage du radical cation N, N-Diméthyl-p-Phénylnediamine.
- **DPPH**: 2' 2-Di Phényl-1-Picryl hydrazyl.
- **DTHMP** : Di-Terbutyl-4-Hydroxy Méthyl Phénol.
- **FPP** : Farnesyl di Phosphate.
- **FRAP** : Potentiel Réducteur Ferriques d'Antioxydants.
- **GPP** : Geranyl di Phosphate.
- **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène.
- **HE** : Huile Essentielle.
- **HOCl** : acide hydro chloreux.
- **IPP** : Isopentényle Pyro Phosphate.
- **NDGA** : Acide Nor Dihydro Guai Aretique.
- **NO** : Oxyde nitrique.
- **O[•]** : l'oxygène singulet.
- **O⁻²** : anion super oxyde.
- **OG** : Gallate d'Octyle.
- **OH** : radicale hydroxyle.
- **ORAC** : Capacité d'Absorbance du Radical de l'Oxygène.
- **PCL** : photochiminescence.
- **PG** : Gallate de Propyle.
- **RESLA** : Recherche en Science Appliqués à l'Alimentation.
- **ROO** : radical peroxide.

- **ROS:** Reactive Oxygen Species.
- **TAEC :** Capacité Antioxydante Equivalente de Trolox.
- **TBHQ:** Tertiary Butyl Hydro Quinone.
- **THBP:** 2, 4, 5-Tri Hydroxy Butyro Phenone.
- **TRAP:** Paramètre du Piégeage du Radical Total.
- **VMHD:** Vacuum Microwave Hydrodistillation.

Liste des figures

- Figure 1** : Structure de la molécule d'isoprène.
- Figure 2** : Structure chimique de certains monoterpènes.
- Figure 3** : Structure de quelques composés aromatiques.
- Figure 4** : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes via la voie d'IPP.
- Figure 5** : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.
- Figure 6** : Montage d'extraction assisté par micro-onde.
- Figure 7** : Illustration schématique de la méthode de distillation par la vapeur d'eau.
- Figure 8** : Schéma du système d'extraction par CO₂ supercritique.
- Figure 9** : Structure chimique de quatre antioxydants synthétiques.
- Figure 10** : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.
- Figure 11** : Photographie de *Calamintha officinalis*.
- Figure 12** : Photographie d'*Abies numidica*.
- Figure 13** : Sites d'échantillonnage des plantes.
- Figure 14** : Montage d'Hydrodistillation Clevenger.
- Figure 15** : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant.
- Figure 16** : Formation et piégeage du radical d'ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•].
- Figure 17** : Rendement en huile essentielle des deux plantes (*A* ; *numidica*, *C.officinalis*).
- Figure 18** : Activité anti-radicalaire au DPPH[•] des huiles essentielles et des standards.
- Figure 19** : Activité scavenging du radical ABTS^{•+} des huiles essentielles et des standards.
- Figure 20** : Pouvoir réducteur au fer des huiles essentielles et des standards.
- Figure 21** : Activité antioxydante totale des huiles essentielles et des standards.
- Figure 22** : représentation graphique de la corrélation entre différents paramètres étudiés.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des Abréviations	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographiques	
I. Huiles essentielles	3
I.1. Historique et définition	3
I.1.1. Historique	3
I.1.2. Définition	3
I.2. Composition chimique	4
I.2.1. Composés terpéniques.....	4
I.2.2. Composés aromatiques	5
I.3. Localisation.....	5
I.4. Propriétés physico-chimiques	6
I.5. Biosynthèse des huiles essentielles	6
I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	7
I.6.1. Extraction par distillation	7
a. Hydrodistillation.....	8
a.1. Hydrodistillation sous pression	8
a.2. Hydrodistillation assistée par micro-onde.....	9
b. Hydrodiffusion	9
c. L'entraînement à la vapeur d'eau	10
d. Extraction au CO₂ supercritique	10
I.7. Intérêt thérapeutique, écologique et économique	11
II. Radicaux libres et stress oxydatif	12
II.1. Radicaux libres	12
II.1.1. Définition.....	12
II.1.2. Principaux radicaux libres.....	12
II.2. Stress oxydatif	13
II.3. Activité antioxydante	13
II.3.1. Définition	13

II.3.2. Classification des antioxydants	13
II.3.2.1. Antioxydants synthétiques	13
II.3.2.2. Antioxydants naturels.....	14
II.3.3. Mécanisme d'action	14
II.4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	15

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes.....	17
I.1. Matériels	17
I.1.1. Appareillages et produits chimiques	17
I.1.2. Matériel végétal	17
I.1.2.1. <i>Calamintha officinalis</i>	17
I.1.2.2. <i>Abies numidica</i>	18
I.1.2.3. Récolte et séchage	19
I.2. Méthodes :.....	20
I.2.1. Extraction des huiles essentielles	20
I.2.2. Calcul des rendements	21
II. Détermination de l'activité antioxydante	21
II.1. Activité scavenger de radical DPPH' :.....	22
II.2. Activité scavenger de radical ABTS ⁺⁺	23
II.3. Test de pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium	24
II.4. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium	25
III. Etude statistique	26

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Rendement des huiles essentielles.....	27
II. Pouvoir anti-radicalaire au DPPH	28
III. Activité scavenging du radical ABTS ⁺⁺	30
IV. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium	31
V. Activité antioxydante totale (test au phosphomolybdate)	33
VI. Corrélation entre les différents paramètres d'activités antioxydants.....	35
Conclusion.....	38

Référence bibliographies

Annexes

Introduction

Introduction

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits « bio » naturels, sans conservateurs a conduit l'industrie à envisager l'incorporation de substances considérées comme « non synthétiques ». Ainsi de nombreux composés phytochimiques y compris les huiles essentielles, commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles ont fait l'objet de plusieurs études pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et anticancéreux (**Benyahia, 2015**).

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles telles que les plantes médicinales et aromatiques (**Sanchez-Moreno., 2002**).

Parmi les métabolites secondaires extensivement étudiés figurent les huiles essentielles qui possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques telle que la propriété antioxydante (**Lemaoui., 2011**), soit en bien-être, il est de plus en plus fréquent que les industries ajoutent ces huiles essentielles pour parfumer leurs produits : savons, détergent..., mais aussi désodorisants ou parfum d'intérieur ou encore au denrées alimentaires, ces huiles essentielles sont aussi des composés puissants, qui nécessitent des précaution et des recommandations d'usage (**Pibiri, 2005**).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**De gauljac et al., 1999**).

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

- Les huiles essentielles (définition, localisation, biosynthèse, l'utilisation et les méthodes d'extractions) ;
- La caractérisation des espèces étudiées (description botanique, la récolte et classification), et enfin ;
- Généralité sur le stress oxydatif, les radicaux libres et l'activité antioxydante.

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

- L'extraction par Hydrodistillation les huiles essentielles des parties aériennes de deux plantes médicinales *Calamintha officinalis* et *d'Abies numidica* ;
- Evaluer l'activité antioxydante *in vitro* de ces huiles essentielles et les comparer avec trois standards : le Thymol, la Carvone et le Géraniol. en utilisant les quatre méthodes suivantes :
 - ✓ Piégeage des radicaux libres **DPPH^{•+}** (diphenyl-picrylhydrazyle) ;
 - ✓ Piégeage des radicaux d'**ABTS^{•+}** (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ;
 - ✓ test de pouvoir réducteur ou appeler aussi méthode de **FRAP** (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), et enfin ;
 - ✓ L'activité antioxydante totale au **phosphomolybdate d'ammonium**.

*Synthèse
bibliographique*

I. Huiles essentielles

I.1. Historique et définition

I.1.1. Historique

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au Nord de l'Afrique et en Europe. (Franchomme et *al.*, 1990). Les hydrolats (eaux aromatiques) étaient utilisés en Inde il y a plus de **7000 ans**. Les plantes aromatiques figurent dans un traité publié en Chine par Shen Nung il y a environ **4500 ans**. Entre **3000 et 2000 ans** avant notre ère, les Egyptiens faisaient un usage important des plantes aromatiques et aussi des plantes pour soigner les malades. Les premiers à avoir utilisé l'Hydrodistillation semblent être les perses, **1000 ans** avant notre ère (Franchomme et *al.*, 1999).

L'utilisation des huiles essentielles était une pratique courante chez les Grecs et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet. Les arabes ont apporté une amélioration significative dans la chimie et dans la distillation des huiles essentielles. Vers la fin du XVI^{ème} et du XVII^{ème} siècle, plus de 100 huiles essentielles sont utilisées. Louis XIV se parfumait de ces huiles. Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante (Lardy et Heberkorn, 2007).

En **1928** le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En **1964** le docteur français Jean Valunet a connu succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. Actuellement, Nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'Homme (Garneau, 2002).

I.1.2. Définition

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, 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 et les bois. Elles sont présentes en petite quantités par rapport à la masse du végétal et sont odorantes et très volatiles (Pdrini et *al.*, 1996).

I.2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes dont les constituants sont presque exclusivement de deux types : des composés terpéniques d'une part et des composés aromatiques, d'autre part (Ghestem et *al.*, 2002). Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatiles (Bruneton, 2009).

I.2.1. Composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) (Figure 1) reconnu par Reverchon et ses collaborateurs dès 1995. Cet isoprène est la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 2002 par Judd et complétée par Julsing et *al* en 2006. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle, désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoides sous lequel on les désigne également (Bruneton, 2009).

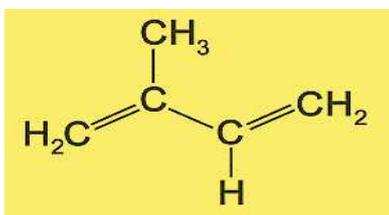


Figure 1 : Structure de la molécule d'isoprène (Lamarti et *al.*, 1994).

Les composés terpéniques sont représentés principalement par les terpènes, les plus volatils : des monoterpènes (C_{10}) (Figure 2) et des sesquiterpènes (C_{15}) dont l'unité de base étant une molécule d'isoprène. Plusieurs milliers de composés ont été décrits et sont classés selon leur nombre de cycle (composés acycliques, mono- et bicycliques) et selon la nature des fonctions qu'ils portent (alcool, aldéhyde, cétone, ester, éther-oxyde...) (Ghestem et *al.*, 2002).

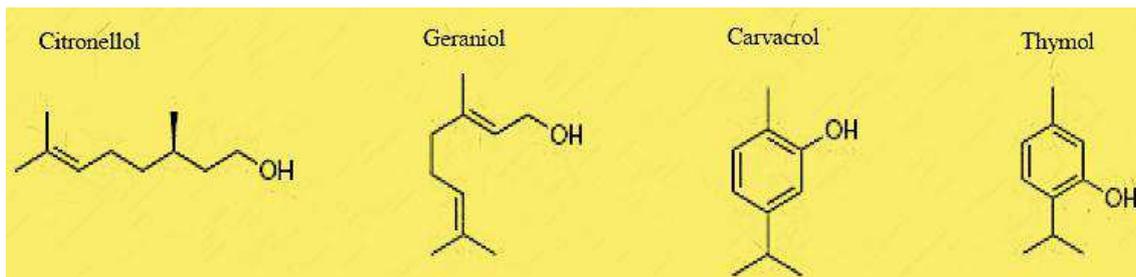


Figure 2 : Structure chimique de certains monoterpènes (Bakkali et *al.*, 2008)

I.2.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) et beaucoup moins fréquents. Ce sont très souvent des allyles et des propénylphénols parfois des aldéhydes. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en (C_6-C_1) comme le Benzène, Toluène ou comme l’Ethyl-benzène (Figure 3) (Ghestem et *al.*, 2002).

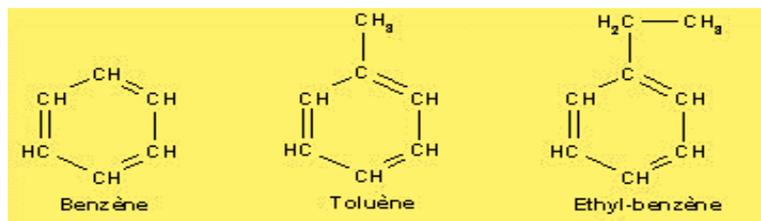


Figure 3 : Structure de quelques composés aromatiques (Bruneton, 2009).

I.3. Localisation

Les huiles essentielles sont produites dans les cellules glandulaires spécialisées recouvertes d’une cuticule. Elles sont alors stockées dans les cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberceae), dans les poils sécréteurs (Lamiacées), dans des poches sécrétrices (Rutaceae) ou dans les canaux sécréteurs (Apiacidae). Elles peuvent aussi être transportées dans l’espace intracellulaire lorsque les poches à essence sont localisées dans les tissus internes (Iskender et *al.*, 2009 ; Bruneton, 2009).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d’huiles essentielles sont entourées de membranes spéciales constituées d’ester, d’acide gras hydroxylés hautement polymérisés,

associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et de leur perméabilité extrême réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (Iskender et *al.*, 2009 ; Bruneton, 2009).

I.4. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bernard et *al.*, 1988 ; Bruneton, 2009). Leurs principales caractéristiques sont :

- Liquide à température ambiante.
- Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Volatiles et très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpène et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpène donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air (Bernard et *al.*, 1988; Bruneton, 2009).

I.5. Biosynthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles, se composent généralement de :

- Matériaux volatiles synthétisés via le précurseur IPP (Figure 4), consistent en des mélanges complexes se composant des mono-sesquiterpènes hydrocarbonés et des matériaux oxygénés dérivés d'eux. La biosynthèse des terpénoïdes dans cette voie implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le geranyl diphosphate (GPP, C10), condensé avec une autre unité IPP forment le diphosphate de

farnesyl (FPP, C15) à l'origine des sesquiterpènes. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et /ou d'autres transformations donnent une variété de terpénoïdes (Dubey et al., 2003),

- Phényl-propanoïdes qui sont des métabolismes secondaires issus de la voie de l'acide shikimique, spécifique du règne végétal. à partir de la phénylalanine, à la synthèse d'une grande variété de composés phénoliques tels que la lignine, les flavonoïdes et les coumarines. (Hatanaka et al., 1987).

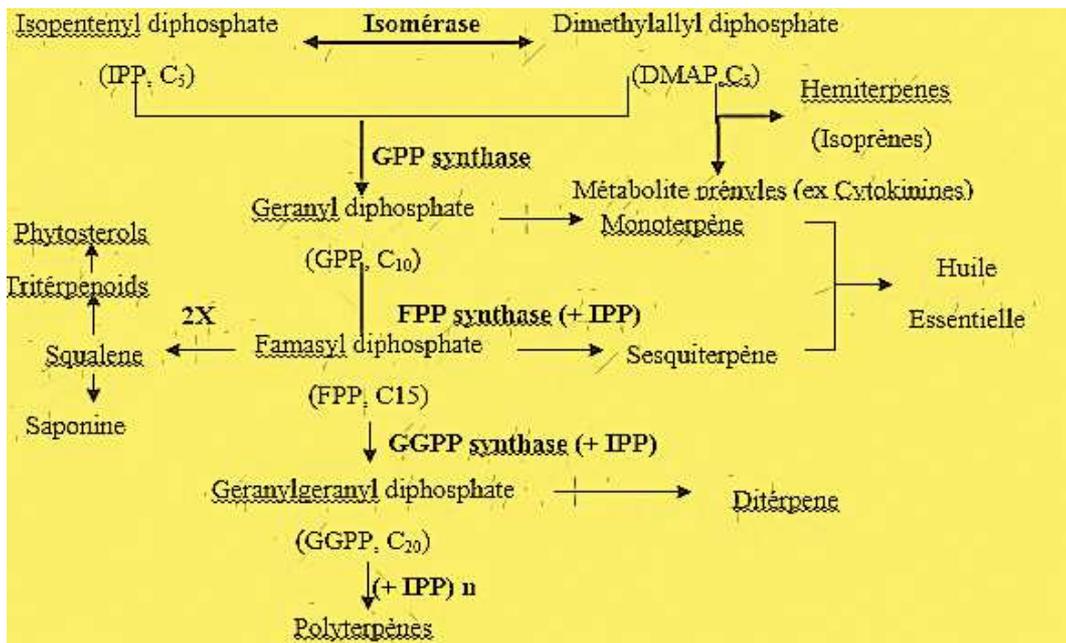


Figure 4 : Synthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes via la voie d'IPP (Dubey et al., 2003).

1.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hellal, 2011).

1.6.1. Extraction par distillation

Selon Benjilali (2004), il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'Hydrodistillation, l'Hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

a. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition (Figure 5). Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât. Cependant, l'Hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Bruneton, 2009; Hellal, 2011).

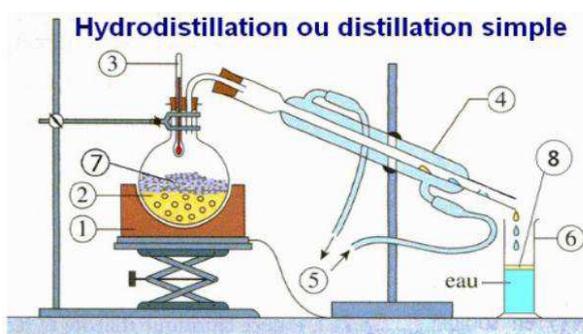


Figure 5 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

1 : Chauffe ballon, 2 : ballon, 3 : thermomètre, 4 : réfrigérant, 5 : entrée et sortie d'eau, 6 : erlenmeyer, 7 : matière à extraire, 8 : la couche d'HE

a.1. Hydrodistillation sous pression

C'est une technique de choix pour les essences difficilement distillables. Certaines matières premières dont les constituants ne peuvent être entraînés par la vapeur à la pression atmosphérique sont ainsi traités du fait de leur masse moléculaire élevée, par exemple le girofle, les rhizomes de gingembre ou encore d'iris. Bien que le procédé sous pression conduit à une amélioration du rapport d'entraînement, donc, à des économies d'énergie, l'influence d'une température élevée (supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artéfacts (Lagunez-Rivera, 2006).

a.2 Hydrodistillation assistée par micro-onde

Le procédé d'extraction par micro-onde appelé : Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD), consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-onde d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats (Figure 6) (Bruneton, 2009).

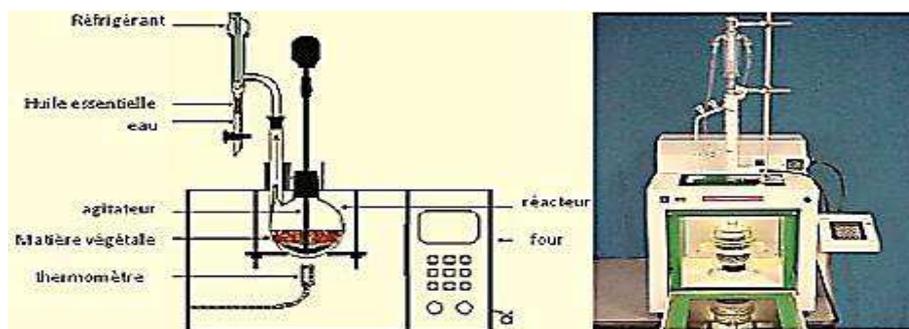


Figure 6 : Montage d'extraction assisté par micro-onde (El Haib, 2011).

b. Hydrodiffusion

Elle consiste à pulvériser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas, Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur et d'énergie (Legast et al., 1983 ; Bassereau, 2007).

c. L'entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Figure 7). La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Padrini et Lucheroni, 1996 ; Benjilali, 2004 ; Lucchesi, 2005).

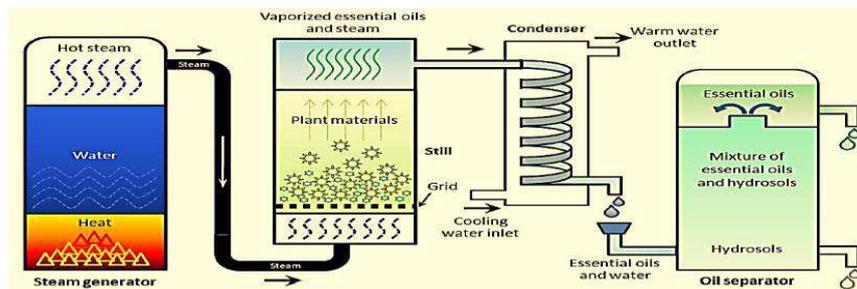


Figure 7 : Illustration schématique de la méthode de distillation par la vapeur d'eau

(Tongnuanchan & Benjakul, 2014)

d. Extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid, des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique sous pression, à température supérieure à 35°C, le dioxyde de carbone est employé principalement comme un fluide supercritique parce que c'est un dissolvant sain, non-combustible, peu coûteux, inodore, sans couleur, insipide, non-toxique, et aisément disponible. Sa viscosité basse lui permet de pénétrer la matrice pour atteindre le matériel à extraire, et sa basse chaleur latente d'évaporation est un moyen élevé de volatilité qui peut être facilement enlevé sans laisser un résidu dissolvant (Khajeh *et al.*, 2005).

Le gaz carbonique se trouve dans un état « supercritique », la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, la matière première ainsi obtenue est proche du produit naturel d'origine contenant aucune traces résiduelles de solvant (Figure 8) (Khajeh *et al.*, 2005).

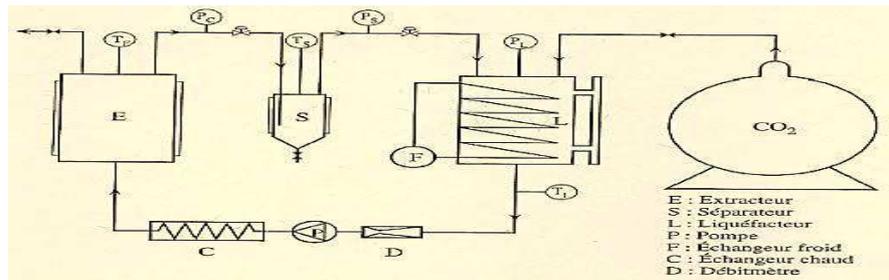


Figure 8 : Schéma du système d'extraction par CO₂ supercritique (Lagunez-Rivera, 2006).

I.7. Intérêt thérapeutique, écologique et économique

L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (Pillecuer et *al.*, 1976). Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires ou au niveau de la microflore vaginale et d'origine fongique contre les dermatophytes. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Sivropoulou et *al.*, 1996).

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Kurita & Koike, 1982 ; Mangena et *al.*, 1999).

Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing-gum, chocolats, bonbons...) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. Elles sont aussi utilisées dans la nourriture pour animaux, dans la préparation des sprays insecticides, la fabrication des adhésifs (colle, scotch ...), et dans l'industrie automobile (Beylier-Maurel, 1976 ; Deboucheberg et *al.*, 1976 ; Pellecuer et *al.*, 1976 ; Bakkali, 2008).

En outre, les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs. En effet, elles contribuent à l'équilibre

des écosystèmes, attirent les abeilles et les insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs (Kurt & Torsselle, 1983).

II. Radicaux libres et stress oxydatif

II.1. Radicaux libres

II.1.1. Définition

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (Hubert, 1998).

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ROS) (Aurousseau, 2002).

II.1.2. Principaux radicaux libres (Hadi, 2004)

- ✓ **L'anion super oxyde (O_2^-)** : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion super oxyde (O_2^-) : cet anion intervient comme facteur oxydant de nombreuses réactions.
- ✓ **Le radical hydroxyle (OH)** : Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- ✓ **Le radical peroxyde (ROO)** : Il est classés par sur la base de leur structure chimique et de la teneur du mélange en oxygène actif et en peroxyde d'hydrogène.
- ✓ **L'oxygène singulet (O_2^*)** : Forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

II.2. Stress oxydatif

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives oxygénées (ROS), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défendre des antioxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies, cancer, diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

II.3. Activité antioxydante

II.3.1. Définition

Nous distinguons deux sortes d'activité antioxydante selon le niveau de leur action. Une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Bouhadjra (2011) En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène...etc (Madhvi *et al.*, 1996).

II.3.2. Classification des antioxydants

II.3.2.1. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Plusieurs antioxydants synthétiques comme le BHA, le TBHQ, le THBP, le DTHMP, le PG, l'OG et l'NDGA, sont utilisés dans les cosmétiques et les huiles végétales (Guo *et al.*, 2006).

Le PG et le BHA (Figure 9) sont des antioxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant la peroxydation des acides gras insaturés (Xiang *et al.*, 2007).

Malgré la puissance de leur activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, responsable de mutagenicités et peut même présenter un danger pour la santé humaine (Williams, 1993).

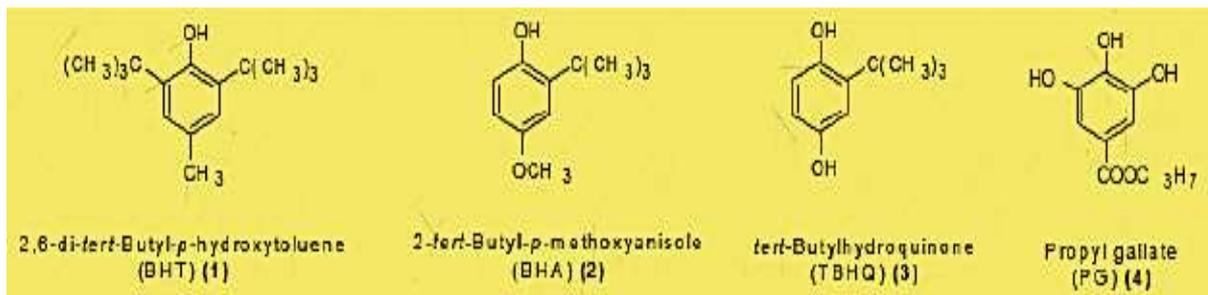


Figure 9 : Structure chimique de quatre antioxydants synthétiques (Bakkali *et al.*, 2008).

II.3.2.2. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels apportés par l'alimentation comprennent, généralement, de l'ascorbate, des tocophérols, des caroténoïdes et des phénols végétaux bioactifs. Les effets bénéfiques sur la santé des fruits et légumes sont largement dus aux vitamines antioxydantes présentes par un grand nombre de composés phytochimiques (Caillet et Lacroix, 2007).

Les plantes les plus étudiées et utilisées dans ce domaine sont les épices et les herbes aromatiques. La plus part des espèces qui ont une forte activité antioxydante appartiennent à la famille des lamiacées. Mise à part les composés cités précédemment, les huiles essentielles sont douées également d'un pouvoir antioxydant (Barlow, 1990).

Des études des équipes de Laboratoire de Recherche en Sciences appliquées à l'Alimentation (RESLA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation directe des huiles essentielles dans les aliments (viande hachée, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où leur application par vaporisation en surface (viande, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

II.3.3. Mécanisme d'action

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme « capteurs » de radicaux libres. Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus au moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire stabilisé de ses structures mésomères conjuguées (figure 10).

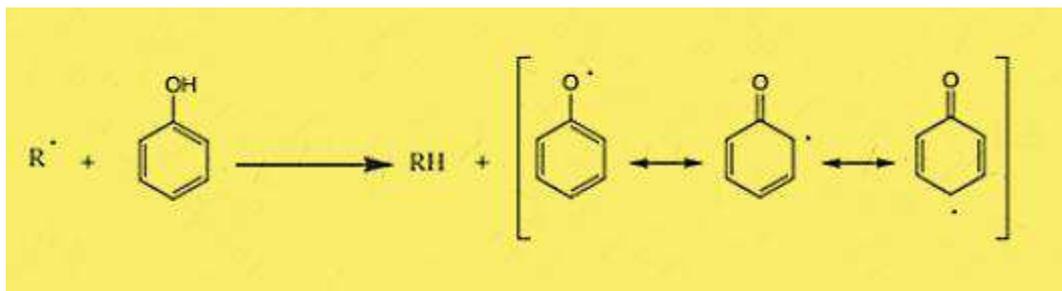


Figure 10 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (Berset et Cervelier, 1996))

II.4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro*

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et des systèmes biologiques (Ali et *al.*, 2008; Scherer et Godoy, 2009). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'un simple électron (Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang et al., 2005).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est réprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Alors que, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hydrochlorique (HOCl), de l'hydroxyle (HO), des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), de peroxyde (ROO) et de l'oxyde nitrique (NO) (Sanchez-Moreno, 2002). Parmi ces techniques, nous citons :

- La méthode d'ORAC (Capacité d'Absorbance du Radical de l'Oxygène) (Cao et *al.*, 1993) ;
- La méthode d'ABTS⁺ ou TAEC (Capacité Antioxydante Equivalente de Trolox) (Re et *al.*, 1999) ;
- La méthode FRAP (Capacité Réductrice Ferrique d'Antioxydants) (Benzie e& Strain, 1996) ;
- La méthode du radical DPPH (Brand-Williams et *al.*, 1995) ;

- La méthode de DMPD (Effet scavenger du radical cationique N, N-Diméthyl-p-Phénylnediamine) (Li *et al.*, 1994) ;
- La méthode TRAP (Paramètre du Piégeage du Radical Total) (Wayner *et al.*, 1985) ;
- La méthode PCL (photochiménescence) (Popov *et al.*, 1987) ;
- La méthode d'hémolyse (Charfi, 1995).

Matériels
&
Méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériels

I.1.1. Appareillages et produits chimiques (Annexe I)

Les différents appareils et les produits chimiques utilisés sont mentionnés en annexe I.

I.1.2. Matériel végétal

I.1.2.1. *Calamintha officinalis*

▪ Présentation de La famille des lamiacées :

La famille des lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (Gherman et al 2000 ; Hilan et al., 2006). Les huiles essentielles caractérisent cette famille qui comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres. (Miller et al., 2006). Les labiées sont des arbustes, sous arbrisseaux, ou plante herbacées, en générale odorantes, à tige quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules. Fleurs pentamères en générale hermaphrodites. Calice à cinq divisions. Corolle en générale bilabée longuement tubuleuse parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre, Ovaire super à carpelles originellement bi-ovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison. (Quezel et santa, 1963).

Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des source riches en terpénoïdes, flavonoïdes et composés phénoliques (Naghibi et al., 2005).

▪ Systématique

Règne : Plante

Division : Spermaphytes

Subdivision : Angiospermes

Classe : Dicotylédone

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : calamintha

Espèce : *calamintha officinallis*

▪ Description botanique

Le *Calamintha officinalis* se décrit comme étant une plante vivace de 60 cm de hauteur constitué de feuilles velues, denté, pétiolées, opposées et de fleurs pourpre ou rose, toutes les parties aériennes de la plante sont utilisés. Ses racines donnent des ramifications jusqu'à 30 cm. C'est une plante qui appartiennent à la famille des lamiacées, il possède un parfum menthe, il comprend de l'huile essentielle, des phénols... ect, il est classé dans la catégorie des plantes aromatiques car il contient d'huile essentielle. C'est une plante qui croît dans des endroits secs, ombragés, les régions montagneuses et sur les bords des routes (Salhi et *al.*, 2014).



Figure11 : Photographie de *Clamintha officinalis*.

I.1.2.2. *Abies numidica*

▪ Présentation de la famille des pinaceae

La famille des pinacées comprend 7 genre, *Abies* (sapin), *cedrus* (le cèdre), la rix (le mélèze), *picea* (le pin)...ect, Ils s'agit d'arbre monoïques à fleur unisexuée qui sont pour la plupart des plantes. la floraison du sapin a lieu au mois de mai. Les fleurs unisexuées sont groupées en cône formés d'un grand nombre d'écailles disposées le long d'une spirale (Salhi et *al.*, 2014).

▪ Systématique

Règne : plante

Division : Trachebionta

Classe : pinosida

Ordre : pinales

Familles : pinaceae

Genre : *Abies*

Espèce : *Abies numidica*

▪ Description botanique

Abies numidica n'apparaît que sur les sommets des monts Babor et Ta babort en Petite Kabylie, où ses forêts ne couvrent que quelques centaines d'hectares. (Quezel et Santa, 1963).

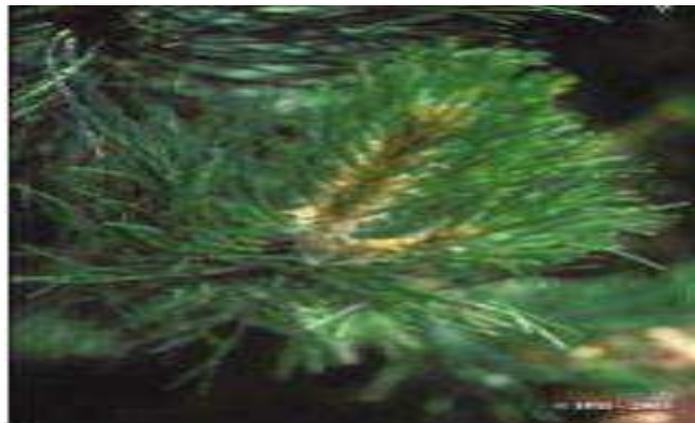


Figure 12 : Photographie d'*Abies numidica*.

I.1.2.3. Récolte et séchage

La partie aérienne de *C. officinallis*, est récoltée dans la région d'Adekar et celle d'*A. numidica* dans la région de Darguina ; Bejaïa ; la collecte des échantillons de ces espèces est réalisée lors des phases végétatives et de floraison du cycle de développement de la plante, *A. numidica* est récolté en mois de mai 2014, par contre *C. officinallis* en mois de juillet 2014.

Le matériel végétal, fraîchement récolté, a été débarrassé des mauvaises herbes, séché à l'ombre dans un endroit aéré, sec et loin de toute pollution, puis coupé en parties grossière.

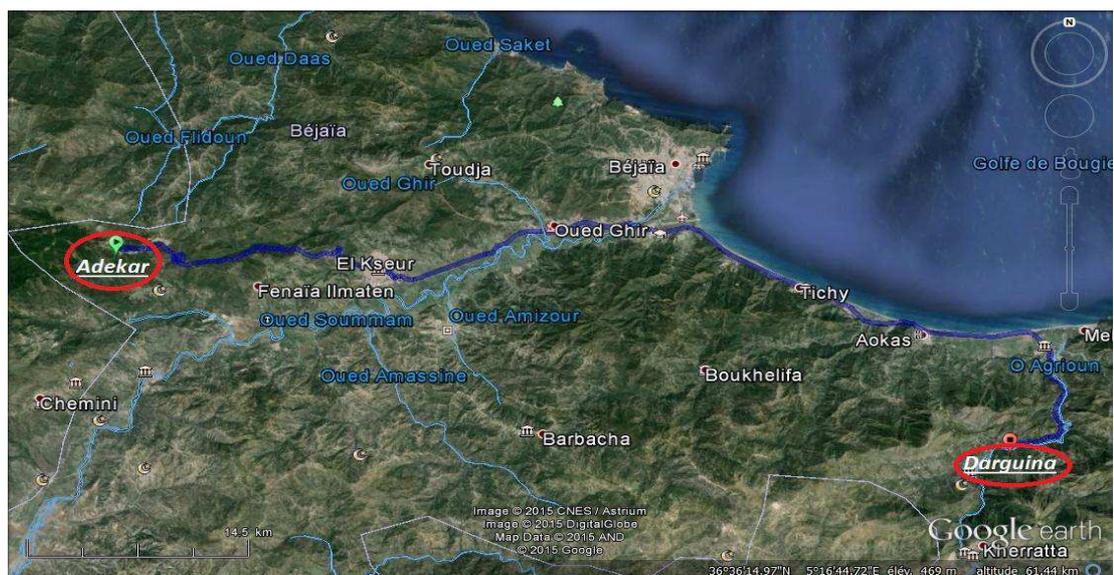


Figure 13 : Sites d'échantillonnage des plantes

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction des huiles essentielles

L'obtention des huiles essentielles a été effectuée par Hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. La méthode appliquée consiste à introduire 100g du matériel végétal dans un ballon en verre avec une quantité d'eau distillée suffisante pour recouvrir la matière. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon.

Les vapeurs d'huiles qui se dégagent passent à travers le serpentín de refroidissement en verre où aura lieu la condensation. L'huile ainsi obtenue est récupérée à l'aide d'une seringue. L'eau et l'huile essentielle (HE) se séparent par différence de densité. Enfin, l'huile obtenue est conservée dans des flacons opaques bien scellés à basse température (4°C). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début de l'ébullition (Figure 13).



Figure 14 : Montage d'Hydrodistillation Clevenger

I.2.2. Calcul des rendements

Le rendement des huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter.

$$R(\%) = \frac{m_{HE}}{m_S} \times 100$$

R : Rendement en HE en g /100g de matière sèche.

m_{HE} : Quantité d'extrait récupérée exprimée en g d'huile essentielle.

m_S : Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

II. Détermination de l'activité antioxydante

Quatre tests ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles des deux plantes étudiées et des trois standards (Thymol, Carvone et Géraniol). Il s'agit de l'activité scavenger de radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) et de radical cationique ABTS^{•+} (acide 2',2', azino-bis-(3-éthylebenzothiazoline)-6-sulfonique), du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium et de test au phosphomolybdate d'ammonium.

II.1. Activité scavenger de radical DPPH[•] :

▪ Principe

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical instable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorbance spectral maximal à 517 nm. En présence d'antioxydants, l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet foncé (forme radicalaire DPPH) au violet claire (forme réduite DPPH-H) (Figure 15). Cette décoloration est dû à la capacité d'échantillon de piéger ce radical (Ramadan, 2010).

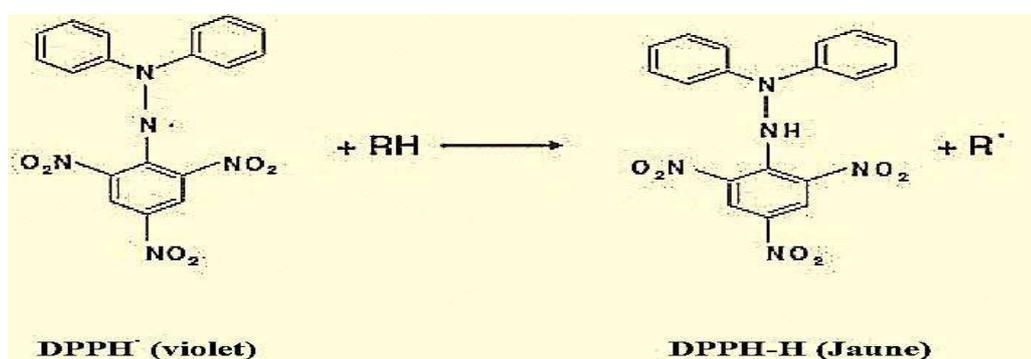


Figure 15 : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (Ramadan, 2010).

▪ Mode opératoire

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant ce test a été effectuée selon le protocole décrit par Bougateg et *al.*, (2009). La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 1×10^{-3} M dans l'éthanol. Un volume de 0,15 mL est ajouté à 2 mL de chaque échantillon à différentes concentrations. Le mélange est ensuite soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui est donné par la formule suivante :

$$\% I = \frac{Abs_{ctl} - Abs_{éch}}{Abs_{ctl}} \times 100$$

Abs_{ctl} : absorbance de contrôle.

Abs_{éch} : absorbance de l'échantillon.

% I : pourcentage d'inhibition.

En se référant aux courbes d'étalonnage (Annexe II), le pourcentage d'inhibition est utilisé pour calculer la valeur d'IC₅₀ qui est défini comme étant la concentration qui cause 50% de réduction de la concentration du radicale libre DPPH• (Petlevski et *al.*, 2013).

II.2. Activité scavenger de radical ABTS^{•+}

▪ Principe

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans (1993) puis améliorée en 1999. elle consiste à la réduction du radical-cation coloré (acide 2' 2 azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) connu sous le nom d'ABTS^{•+}. Le développement de sa concentration est suivi à 734 nm au cours de sa réaction avec les antioxydants (Figure 16).

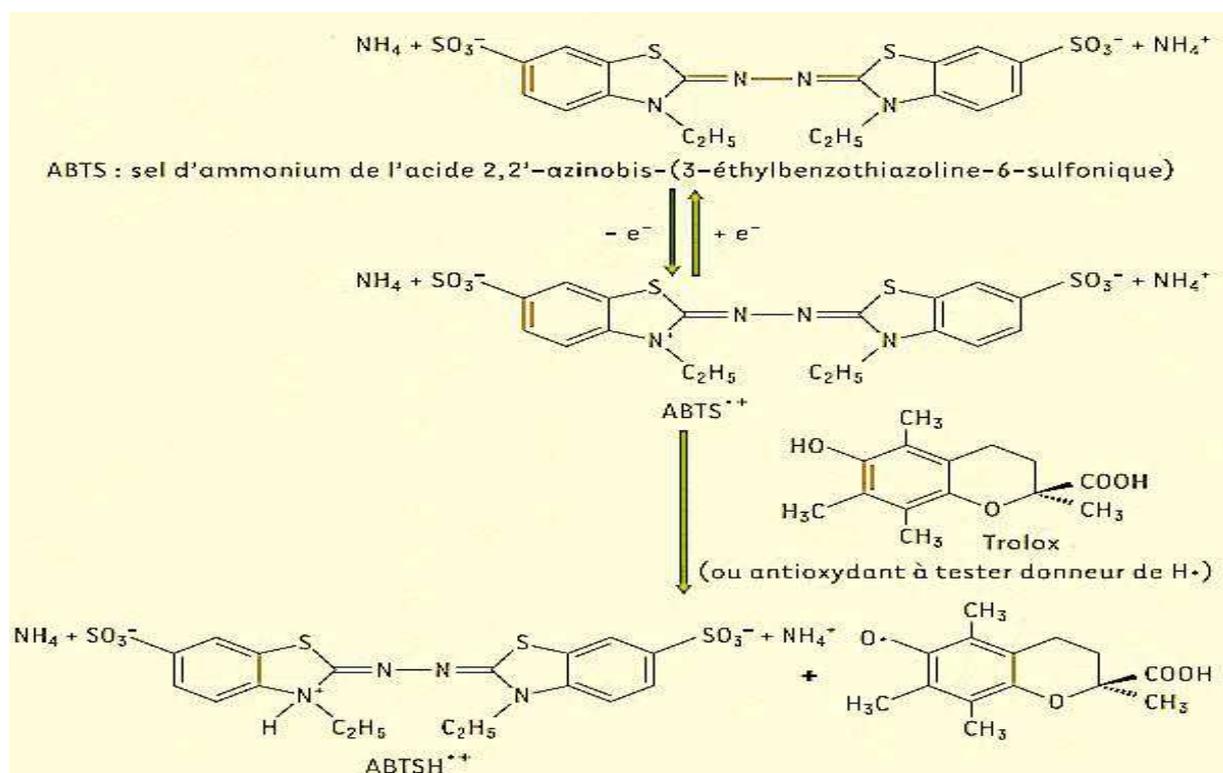


Figure 16 : Formation et piégeage du radical d'ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H•

(Marc et *al.*, 2004)

▪ Mode opératoire

Le protocole de détermination de la capacité d'antioxydants à piéger la radical cationique ABTS^{•+} adopté par Karaçelik et *al.*, 2015 est le suivant :

La solution stock d'ABTS (ABTS à 7 mM et persulfate de potassium à 2,45 mM) est incubée à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 heures. Cette solution stock est ensuite diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance finale de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. Les échantillons, à des différentes concentrations (10 µL) sont mélangés avec 990 µL de la solution diluée d'ABTS.

Le mélange est soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 734 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule suivante :

$$\% I = \frac{Absctl - Abséch}{Absctl} \times 100$$

Absctl : absorbance de contrôle.

Abséch: absorbance de l'échantillon.

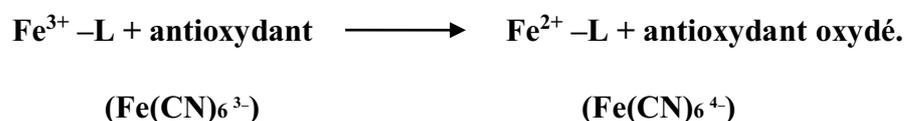
% I : pourcentage d'inhibition.

Après le calcul des pourcentages d'inhibition, les IC₅₀s sont calculées à partir des courbes d'étalonnage (Annexe III) de la même manière que le test au DPPH.

II.3. Test de pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

▪ Principe

La réduction de l'ion Fe³⁺ est toujours utilisée comme indicateur des substrats donneurs d'électrons. La présence de réducteur dans les extraits cause la réduction du complexe Fe³⁺/ferricyanure en fer ferreux (Fereira et *al.*, 2007).



▪ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur de nos échantillons a été déterminé par la méthode d'Oyaizu (1986). Le tampon phosphate (1 mL, 0,2M, pH 6,6) est ajouté à un volume de 0,5 mL de chaque échantillon à des différentes dilutions et 1 mL de ferricyanure de potassium (1%) est ajouté. Les mélanges sont incubés à 50°C dans un bain Marie pendant 20 minutes. Par la suite, 1mL d'acide trichloracétique (1%) est ajouté. L'eau distillée (1 mL) est ajoutée à un ml de mélange, puis, 0,2 mL de la solution de chlorure ferrique (0,1%) est ajoutée. Les tubes à essais ont été incubés à l'obscurité et à une température ambiante pendant 10 minutes. La lecture a été réalisée à 700 nm.

Des courbes d'étalonnages (Annexe IV) sont utilisées pour déterminer la concentration effective à 50% (IC₅₀), qui est une concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5.

II.4. Activité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium

▪ Principe

La méthode utilisant le phosphomolybdate d'ammonium est un test antioxydant important basé sur la réduction de Mo⁺⁶ en Mo⁺⁵ par un composé antioxydant. Ceci conduit à la formation d'un complexe de phosphate /Mo⁺⁵, de couleur verte, avec une absorption maximale à 695nm. (Nagavani et *al.*,2010).

▪ Mode opératoire

L'activité antioxydante des échantillons est évaluée par la méthode utilisant le phosphomolybdate telle qu'elle est décrite par Brahmi et *al.* (2014). Un volume de 200 µL d'échantillons à différentes dilutions est mélangé avec 2 mL de la solution contenant les réactifs suivants : acide sulfurique à 0,6 mM, phosphate de sodium à 28 mM et molybdate d'ammonium à 4 Mm. Les tubes à essais ont été incubés dans un bain Marie à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, l'absorbance de mélange est mesurée à 695 nm.

Les IC_{50S} sont calculées à partir des courbes d'étalonnage (Annexe V), de la même façon que le test précédent (pouvoir réducteur).

III. Etude statistique

Le calcul des moyennes et des écarts types sont réalisés à partir des résultats de trois essais avec Microsoft Excel 2013.

L'analyse de la variance (ANOVA/MANOVA) utilisant le test LSD (Least Significant Difference) est effectuée à l'aide du logiciel STATISTICA 9.9. La détermination des coefficients de corrélation est réalisée également par STATISTICA 9.9. afin de comparer les résultats obtenus à partir des différents tests réalisés sur les deux plantes et les trois standards étudiés.

Résultats
&
Discussion

I. Rendement des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles extraites par la méthode d'Hydrodistillation de nos plantes (*Abies Numidica* et *Calamintha officinalis*,) est exprimé en pourcentage massique par rapport à la matière sèche. Il est représenté au niveau de la figure (17). D'après cette dernière, nous avons constaté que la partie aérienne de *Calamintha officinalis* a donné un rendement élevé (**0,37%**) par rapport à celle d'*Abies numidica* (**0,29%**).

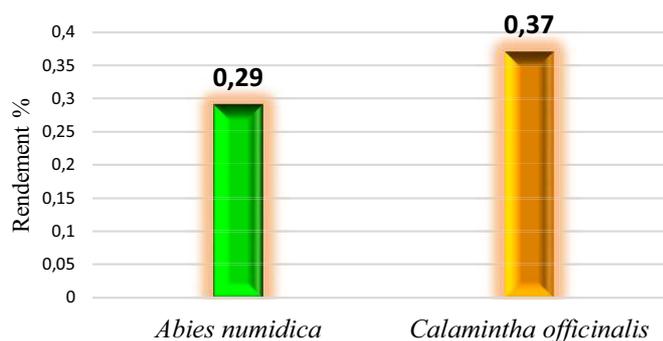


Figure 17 : Rendement en huile essentielle des deux plantes (*Abies numidica*, *Calamintha officinalis*)

D'après nos connaissances, aucun travail n'a été effectué afin de déterminer le rendement en huiles essentielles des deux plantes étudiées. Tandis que, plusieurs recherches ont été menées sur d'autres plantes de la même famille que *Calamintha*. Ech-Chahad et al(2013) ont étudié une autre plante du genre *Calamintha* de la région de Sefrou (sud-est de Fès au Maroc). Ils ont noté un rendement nettement inférieur à celui de *C. officinalis* qui est de 0,082%.

Par ailleurs, EL-Ajjouri et al. (2010), ont évalué le rendement de *Thymus algeriensis* récolté dans la région de Rchida (Maroc). Ils ont rapporté un taux d'extraction avoisinant nos résultats qui est de 0,3%.

Néanmoins, des taux élevés ont été rapportés pour *Thymus longicaulis* de la Turquie (1,83%) (Cengiz et al., 2010), *Thymus ciliatus* de Maroc (1,2%) (EL-Ajjouri et al. ; 2010), *Salvia officinalis* récoltée en France (2,05%) (Bentaarit et al., 2009), et *Origanum minutiflorum* (4,4%) de (Rocha et al., 2007).

En se référant à la littérature, les résultats obtenus pour *Abies numidica* diffèrent largement de notre résultat. Jeong et al. (2007) ont évalué le rendement d'*Abies koreana* de

la Corée du sud qui est de 0,9%. Alors que Dayisoğlu et *al.* (2009), ont trouvé un pourcentage très élevé pour *Abies cilicia* récoltée au niveau de la zone de Baskonus (Turquie) qui est de 3,47%.

D'après ces résultats, nous avons constaté que c'est la famille des Lamiacées qui donne un rendement important par rapport à celle des Pinaceae. Ces variations pourraient être attribuées, non seulement, à l'origine de la plante et à la technique d'extraction, mais également, à la période de la cueillette et l'âge de la matière végétale. D'autre part, la composition chimique, le patrimoine génétique et l'espèce de la plante peuvent influencer sur la quantité et la qualité des huiles essentielles extraites (Kokkini et *al.*, 1997 ; Russo et *al.*, 1998 ; Thompson et *al.*, 2003 ; Karousou et *al.*, 2005 ; Fellah, 2006).

II. Pouvoir anti-radicalaire au DPPH

Le DPPH est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin et *al.*, 2008, Kouami et *al.*, 2009).

Les résultats de la capacité scavenger de radical DPPH[•] des huiles essentielles de *A.numidica* et *C. officinalis* ainsi que des standards utilisés (Carvone, Géraniol et Thymol) sont donnés sur la figure 18.

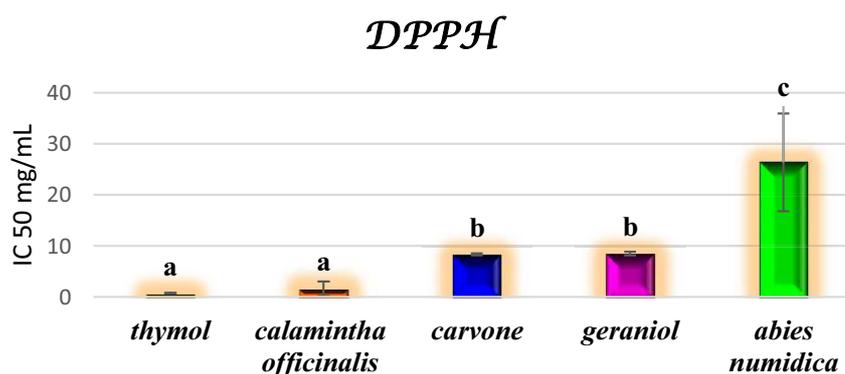


Figure 18 : Activité anti-radicalaire au DPPH[•] des huiles essentielles et des standards

Note : les barres verticale représentent les écarts types, **a, b** etc représentent les différences significatives.

Les échantillons ayant une faible valeur d'IC₅₀ possèdent une meilleure activité antioxydante (Pokorny et al., 2009).

Selon les résultats enregistrés, les huiles essentielles sont dotées d'une différente activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH• qui diminue de la manière suivante : Thymol >*C.officinalis*> Carvone > Géraniol >*A. numidica*. Leurs valeurs d'IC₅₀s respectives sont de 0,72±0.02 ; 1,63 ±1.38 ; 8,35±0.17 ; 8.50±0.33 et 26.37±9.6mg / mL.

L'étude statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative (p<0,05) d'une part entre *C. officinalis* et thymol, et d'autre part entre la cavone et le géraniol, mais il existe une différence hautement significative entre ces derniers et *A. numidica* (Annexe VI).

Cette différence observée peut être expliquée par :

Le thymol a montré une meilleure activité scavenger de radical DPPH• (Aeschbach et al., 1994). Les travaux effectués par Mastelic et al. (2008), ont montré que le thymol qui est un composé de nature phénolique possède une capacité anti-radicalaire importante. De plus, Tepes et ses collaborateurs (2007), ont prouvé que l'un des principaux constituants responsables de l'activité antioxydante des huiles essentielles est le thymol qui est capable de piéger significativement le radical DPPH•.

Alors que, les huiles essentielles de *C. officinalis* viennent en deuxième position. Les huiles essentielles des plantes de la famille des Lamiacées sont connues par leur forte activité antioxydante. D'ailleurs, Bozin et al. (2008) ont mené une étude sur l'activité antioxydante des huiles essentielles de cette famille. Ils ont constaté que les composés responsables de la réduction de radical DPPH• sont les monoterpènes oxygénés et le mélange des mono- sesquiterpènes hydrocarbonés. Cependant, *A. numidica* qui appartient à la famille des Pinaceaea a présenté une faible activité avec une valeur très élevée d'IC₅₀. Cette différence est probablement en relation avec leur composition chimique.

Minica-Dukic et al (2004), ont montré que les composés les plus actifs pour la neutralisation des radicaux DPPH sont les monoterpènes, les sesquiterpènes, les aldéhydes et les cétones. Singh et ses collaborateurs (2009), ont évalué l'activité antioxydante de deux

monoterpènes importants (citronellal et β -citronellol) et ont montré une forte activité antioxydante. Ces composés peuvent être parmi les constituants de nos huiles essentielles.

D'autre part, cette activité peut être également liée à la présence des composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol dans ces huiles essentielles qui ont un rôle principal comme réducteurs des radicaux libres (Vallano *et al.*, 2007). D'après, Economon *et al.* (1991) la présence de ces standards même à de faibles concentrations dans les huiles essentielles peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH.

D'une manière générale, ce sont les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables d'une forte activité antioxydante. Toutefois, les composés minoritaires peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Lu *et al.*, 2001 ; Sing *et al.*, 2006).

En outre, ces résultats du pouvoir antioxydant peuvent être fortement influencée non seulement par la composition chimique, mais également par les conditions de l'essai (température de réaction, rapport antioxydant/DPPH, type de solvant, pH, concentration en échantillon) (Popovici *et al.*, 2009 ; Noipa *et al.*, 2011 et Costa *et al.*, 2012).

III. Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Dans ce test, l'ABTS est oxydé par les antioxydants à son radical ABTS^{•+}, qui a une couleur intense. La neutralisation de ce dernier, pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire, se traduit par la décoloration de la solution, qui considérée comme étant la capacité des composés à diminuer directement la couleur de radical ABTS^{•+} (1999 ; Gulcin, 2010). Les valeurs des IC₅₀ de nos échantillons sont représentées dans la Figure 19.

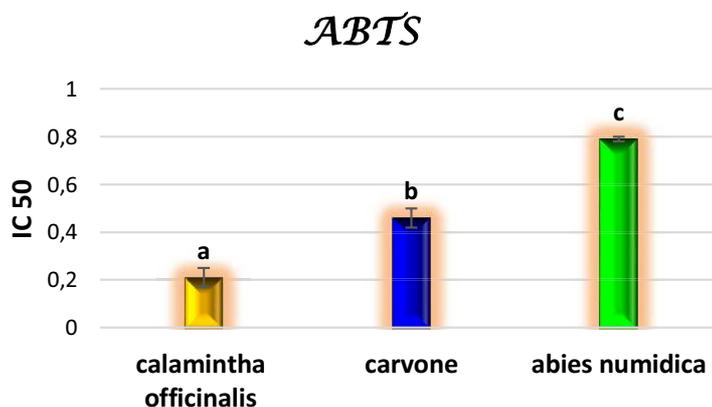


Figure 19 : Activité scavenging du radical ABTS^{•+} des huiles essentielles et des standards.

D'après les résultats illustrés dans la figure 17, nous remarquons que les valeurs d'IC₅₀ varient entre 0,21 et 0,79 mg / mL. Un fort pouvoir anti-radicalaire est noté pour les huiles essentielles de *C. officinalis* comparativement à celles d'*Abies numidica* et de la carvone utilisé comme standard.

L'étude statistique montre également, l'existence d'une différence significative ($p < 0,05$) entre les différents échantillons (Annexe VII).

Ces différences peuvent être influencées par la composition chimique des huiles, (Emani et al (2007), ont trouvé que les principaux constituants de *Calamintha sativum* comme β -terpinène et α -pinène une bonne activité anti-radicalaire. Cependant, elle peut être également expliquée par une faible interaction entre le cation d'ABTS^{•+} et les composés des échantillons, la nature et la vitesse de complexation (Jovanovic et al., 1986 ; Strube et al., 1997).

Dorman et al. (2003), ont montré que dans la plupart des analyses des huiles essentielles, quand ces dernières ont un taux élevé en composés phénoliques se traduit par une forte activité antioxydante, mais également elle dépendrait de la nature et la structure chimiques de ces composés.

Peltoketo et al. (2001), ont constaté lors de l'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles des herbes de la famille des Lamiacées, que ce sont les l'activité antioxydante des monoterpènes tels que le thymol, la carvone et le géraniol peuvent être influencé par le procédé d'extraction (Yildirim et al., 2000). Montoro et ses collaborateurs ont déduit que l'activité anti-ABTS^{•+} des échantillons dépend de leurs polarités, c'est les échantillons les plus polaires qui ont présentés les meilleures capacités antioxydantes, cela peut être justifiée par la présence de composé polaires doués d'un grand potentiel antioxydant, qui agissent comme des donneurs d'hydrogène ou d'électron. Elle dépend aussi de la structure chimique des composés phénoliques de nombre de OH ainsi que leur position (Montoro et al., 2004).

IV. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

Des études antérieures ont montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong et al., 2004).

L'aptitude d'un échantillon de donner un électron reflète son pouvoir antioxydant, et la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron (Gholivand et al., 2010). Dans ce test le pouvoir antioxydant des huiles essentielles de nos plantes se manifeste via le changement de la couleur du milieu réactionnel de jaune au bleu, un changement qui est due à la réduction de (Fe^{3+}) à la forme fer ferreux (Fe^{2+}) qui est quantifiée par la mesure de l'absorbance de la couleur bleu formée aux différentes concentrations utilisées (Figure 20) . Le pouvoir réducteur de ces échantillons est exprimé par la concentration effective à 50% (IC_{50}) qui est une concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5 (Razali et al., 2008 ; Lin et al., 2009 ; Gourine et al ., 2010).

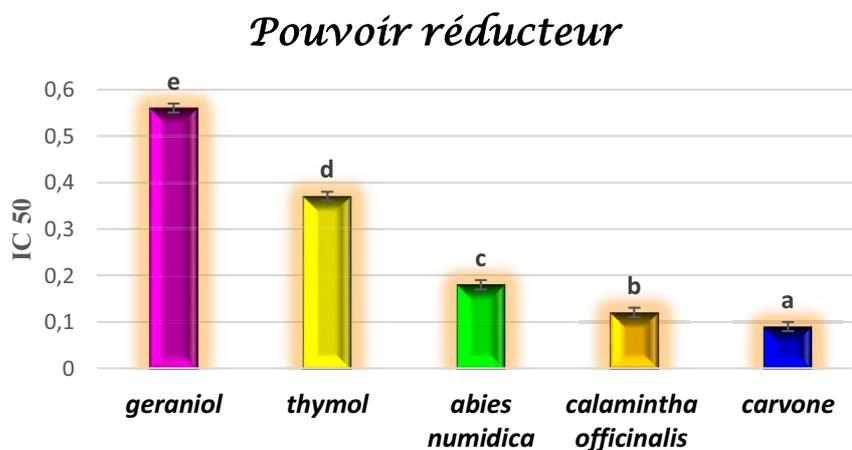


Figure 20: Pouvoir réducteur au fer des huiles essentielles et des standards

Nous constatons que la carvone a présenté une faible valeur d' IC_{50} (0,09 mg / mL) ce qui signifie une meilleure capacité à réduire le fer qui est un monoterpène acétonique (Elmastas et al., 2006), suivi des huiles essentielles de *C. officinalis* et celles d'*A. numidica* qui ont donné des valeurs proches et qui sont respectivement de (0,12 et 0,18 mg / mL). Le thymol et le géraniol ont montré le pouvoir le plus faible avec des valeurs d' IC_{50} très élevées qui sont respectivement de 0,37 ; 0,56 mg/ mL . Cela peut être expliqué par une faible affinité entre leurs fonctions et les ions métallique de fer ferrique (Fe^{3+}).

L'analyse statistique a montré qu'il existe une différence significative entre les différentes huiles essentielles analysées (Annexe VIII).

En se référant à la littérature le pouvoir réducteur de *Satureja calamintha* a donné une valeur d'IC₅₀ de 0,24 mg / mL qui diffère légèrement de celle de *C. officinalis*.

Siddhuraju et Becker (2007), ont montré que cette forte activité peut être probablement due à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. (Jeong et al., 2004).

Hinneburg et al (2006), ont mis en évidence que la réduction de Fe⁺³ est corrélée avec le taux phénolique du matériel testé. D'autre part, il a été démontré dans une étude réalisée sur différents types d'huiles essentielles que celles qui sont riches en thymol et carvacrol qui possèdent des groupements hydroxyles ont un pouvoir réducteur plus élevé que les huiles qui sont pauvres en phénols (Hazzit, 2009).

En outre, d'autres composés tels que les alcools (linalool et 1,2-cineol), les cétones (menthone et isomenthone), les aldéhydes (neral et citronellol), les esters et les hydrocarbures (α -terpinène et α -terpinène) peuvent contribuer à l'activité antioxydante des huiles essentielles en agissant en synergie (Edris et al., 2007). Cependant, dans notre étude le thymol qui est de nature phénolique a donné une faible activité. Cela est probablement dû soit à la conservation du produit ou par le fait que les composés majoritaires présents dans les huiles sont plus actifs. Une éventuelle synergie entre les composés majoritaires et minoritaires peut être aussi à l'origine de cette différence (Wang et al., 2008).

V. Activité antioxydante totale (test au phosphomolybdate)

Le test au phosphomolybdate est très utilisé et adéquat pour déterminer l'activité antioxydante totale (AAT) des extraits de plantes. Par conséquent, nous l'avons appliqué dans cette étude pour déterminer l'AAT des huiles essentielles de *C. officinalis*, et *A. numidica*) et deux standards (la carvone et le géraniol). D'après les résultats obtenus (Figure 21), l'efficacité des échantillons à réduire Mo⁺⁶ à Mo⁺⁵ est variable. Les huiles essentielles des deux plantes ont montré une meilleure activité comparativement aux standards utilisés.

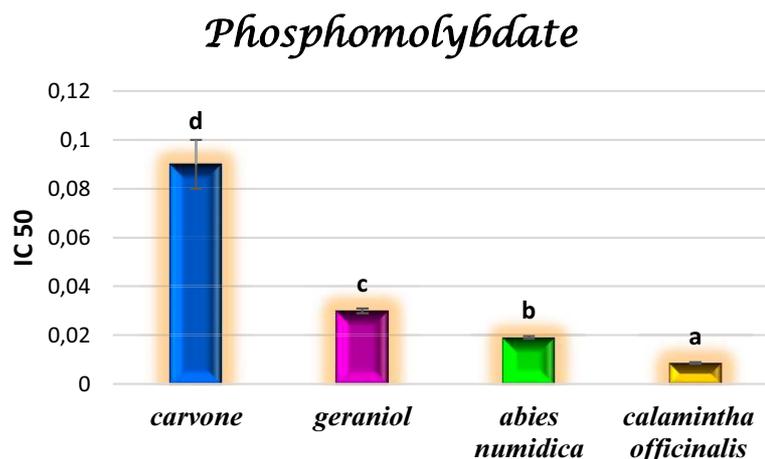


Figure 21 : Activité antioxydante totale des huiles essentielles et des standards

L'investigation des banques de données scientifiques, n'a relevé aucune étude portant sur l'activité antioxydante totale par le test au phosphomolybdate d'ammonium des huiles essentielles de *C. officinalis* et *A. numidica*.

L'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les différents échantillons étudiés (Annexe IX).

En se référant aux travaux effectués sur d'autres échantillons nous avons trouvé que les études effectuées par Jayaprakaska et al (2008) ont montré que le pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium dépend de la teneur en composés phénoliques des échantillons et de la position ainsi que du nombre de groupements hydroxylés.

Scalbert (1991), a montré que cette différence peut être due à l'existence des polyphénols qui pourrait être liée au degré d'oxydation. En effet, ces derniers sont des composants très susceptibles d'auto-oxydation en présence de l'oxygène de l'air.

En outre, Gohari et al (2011), ont constaté que l'ensemble de la partie aérienne des huiles essentielles des plantes *Salvie macrosiphon* et *Tragioides pimpinelle* possèdent bonne activité antioxydante totale qui peut être dû à la présence en plus des polyphénols des mono- et des sesquiterpènes.

Wojdylo et al (2007) ; Falleh et al (2008), signalent que la plupart des espèces de la famille des Lamiacées possèdent une activité antioxydante totale en raison de présences de ces polyphénols et la fraction phénolique n'incorpore pas toutes les activités antioxydantes synergiques entre les antioxydants dans un mélange, de fait que l'activité antioxydante

dépend non seulement de la concentration mais également de la structure et la nature de ces antioxydants.

VI. Corrélation entre les différents paramètres d'activités antioxydants

L'analyse statistique des résultats de la présente étude indique l'existence d'une corrélation significative ($p < 0.05$) d'une part entre le pouvoir anti-radicalaire au DPPH et l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et d'autre part, entre le pouvoir réducteur du fer et l'activité antioxydante totale (test au phosphomolybdate) (figure 20) avec des coefficients de corrélation 0.93 et 1 respectivement(Annexe X).

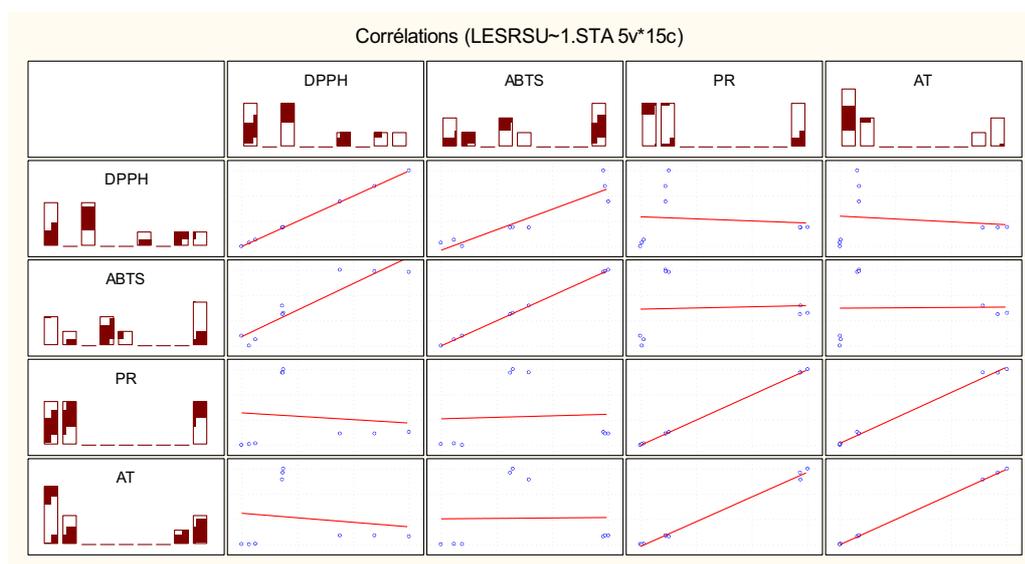


Figure 22 : représentation graphique de la corrélation entre différents paramètres étudiés

La corrélation existante entre le DPPH et l'ABTS peut être expliquée par le fait que ces deux méthodes utilisent des mécanismes d'action similaires.

Dudonne et *al* (2009), ont montré dans leurs études qu'il existe une corrélation positive avec un coefficient $r = 0,949$ entre ces deux paramètres. Cela peut être expliqué par l'analyse d'ABTS qui est basée sur l'application des systèmes antioxydants hydrophiles ou lipophiles, alors que l'analyse de DPPH emploie les radicaux dissous dans des solvants organiques, s'applique à des systèmes hydrophobes (Kim et *al.*, 2003).

L'Ao et *al* (2008), ont trouvé lors de l'évaluation de l'activité antioxydante des divers extraits des fruits, l'existence d'une forte corrélation entre le DPPH et l'ABTS. Ces résultats indiquent qu'il existe un rapport entre la concentration des composés phénoliques

des échantillons et leurs capacités antioxydantes. Par conséquent, la présence de ces composés contribuent de manière significative à leur potentiel antioxydant (Dudonne et *al.*, 2009).

En outre, cette corrélation modérée entre ces deux tests peut être le résultat de la présence des composés qui ont une activité antioxydante mais ne sont pas des composés phénoliques ou bien la présence de ces derniers avec une plus grande capacité antioxydante que d'autres, mais également peut être dû à des effets antagonistes ou synergiques entre ces composés présents dans la matrice (Nattela et *al.*, 1999 ; Giovanelli et *al.*, 2009).

Cependant une forte corrélation existe entre la capacité à réduire le fer et l'activité antioxydante totale, ce qui s'accorde avec celle de Beretta et *al* (2005) qui ont trouvé une corrélation fortement significative avec un coefficient égale à 0,90. Cette corrélation a été , expliquée par la puissance de réduction des entités phénoliques / polyphénoliques qui peuvent ramener le Fe^{+3} en Fe^{+2} de même Mo^{+6} en Mo^{+5} .

Par contre les résultats ont montré une faible corrélation significative positive ($p < 0,05$), d'une part entre l'activité scavenging du radical ABTS et le pouvoir réducteur des ions de fer et, d'autre part, entre ABTS et l'activité antioxydante totale avec un coefficient de corrélation de $r = 0,05$ et $r = 0,02$, respectivement.

Nos résultats s'accordent avec ceux des travaux effectués par Co et Prior (1998). En effet, leurs résultats montrent une faible corrélation entre le pouvoir réducteur et l'ABTS et entre ce dernier et le phosphomolybdate, mais contraire, à celle trouvée par Katlinic et *al* (2005). Cela peut être justifié par la différence des échantillons étudiés et leurs conservations.

Selon Garcia-Aguilar et *al* (2007), qui ont constaté lorsque l'analyse de la capacité antioxydante de poudre de riz, qui a une très faible corrélation entre l'ABTS et le pouvoir réducteur, probablement dû aux composants principaux des antioxydants de l'échantillon.

Cependant, cette faible corrélation est expliquée par le fait que le pouvoir réducteur est sensible au transfert d'électron, tandis que l'ABTS en plus de sa sensibilité au transfert d'électron, elle est aussi sensible au transfert d'atome d'hydrogène (Hung et *al.*, 2005).

D'autre part cette analyse a montré une corrélation significativement négative ($p < 0,05$) entre le test de pouvoir réducteur et DPPH, mais également entre le DPPH et le phosphomolybdate avec des coefficients de corrélation $r = - 0,11$, $r = -0,14$ respectivement.

Selon Clark et *al* (2013), il existe une corrélation négative entre ces trois tests, cela peut être expliqué par l'existence d'une différence entre ces derniers, le DPPH qui est le piégeage des radicaux libres. Par contre, le pouvoir réducteur et le phosphomolybdate c'est la réduction des ions, en plus de ça chaque analyse reflète un aspect différent du comportement antioxydant d'un échantillon.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de la présente étude est double. Le premier objectif étant l'extraction et l'estimation de rendement des plantes médicinales, *Calamintha officinalis* et *Abies numidica* qui appartiennent, respectivement, à la famille des Lamiacées et Piniaceae et qui sont importantes dans la flore algérienne. Le second objectif est l'évaluation de l'activité antioxydante de ces dernières et les trois standards : thymol, carvone et géraniol en utilisant quatre méthodes tel que DPPH^{*}, ABTS^{**}, pouvoir réducteur et phosphomolybdate.

La détermination de rendement de ces deux espèces a montré la richesse de *C. officinalis* en huiles essentielles (**0,37%**) par apport à *A. numidica* (**0,29%**).

Les conditions expérimentales nous a permis le calcul des IC₅₀ pour chaque échantillon et pour les différents tests afin d'exprimer ces résultats.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage de radical libre DPPH des huiles essentielles a montré que nos échantillons qui possèdent des valeurs des IC₅₀ modérées sont classés dans l'ordre suivant : thymol (**0,7 ± 0,02**), *C. officinalis* (**1,63 ± 1,38**), carvone (**8,35 ± 0,17**), géraniol (**8,50 ± 0,33**) en fin *A. numidica* (**26,37 ± 9,6**).

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode d'ABTS nous a permis de mettre en évidence les valeurs des IC₅₀ de nos échantillons qui sont respectivement, *C. officinalis* (**0,21 ± 0,04**), carvone (**0,46 ± 0,04**) et *A. numidica* (**0,79 ± 0,01**) mais par manque d'extraits, nous n'avons pas pu déterminer les valeurs de thymol et géraniol.

En plus de ces tests, nous avons effectué le test de pouvoir réducteur qui nous a donné les résultats suivantes : thymol (**0,09 ± 0,01**), *C. officinalis* (**0,12 ± 0,01**), *A. numidica* (**0,18 ± 0,01**), géraniol (**0,37 ± 0,01**) et la carvone (**0,56 ± 0,01**).

Enfin, ce travail a été complété par la détermination de l'activité antioxydante totale par le phosphomolybdate d'ammonium qui nous a donné les valeurs des IC₅₀ comme suit : *C. officinalis* (**0,0086 ± 0,0003**), *A. numidica* (**0,019 ± 0,0006**), géraniol (**0,03 ± 0,001**) et la carvone (**0,09 ± 0,01**).

En s'appuyant sur ces différents résultats, ainsi que sur l'analyse statistiques, nous avons constaté que l'huile essentielle *C. officinalis* possède une meilleure activité antioxydante par apport à celle d'*A. numidica*.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de :

- ❖ Etudier les différents facteurs influençant la variabilité de la composition en différents constituants.
- ❖ Elargir l'étude sur d'autres organes des plantes étudiées afin de déterminer l'organe le plus riche en composés antioxydants.
- ❖ Mesurer l'activité antioxydante en utilisant d'autres tests.
- ❖ Identifier des composés antioxydants des deux plantes, par des techniques plus avancées tel que HPLC.
- ❖ Orienter les chercheurs scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante.
- ❖ Effectuer d'autres dosages comme le dosage des polyphénols.
- ❖ Etudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes à savoir les propriétés antifongiques, anti-inflammatoire, antimicrobienne et d'autres.

*Références
bibliographiques*

Aesschbach R, Loliger, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B et Aruoma OI. (1994). Antioxidant action of thymol carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol.* 32. 31-36.

Ali SS, Kasoju N, Luthr A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A et Bora U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.

Ao C, Li A, Elzaawely AA, Xuan DT et Twata S. (2008). Évaluation des activités antioxydantes et antibactériennes d'extrait de suffisance du microcarpa L. de Ficus. *Commande de nourriture*, 19, 940-948.

Aurousseau B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la quantité de leurs produits, INRA Prod. Anim, Vol 15, PP67-82.

Bakkali F. (2008). Biological effects of essential oils- A review, *Food and Chemical, Toxicology*.46, 446-475.

Barlow SM. (1990). Toxicological aspects of antioxydant used as food addives. in : *Food Antioxydants*, Hudson B.J.F. (ed), Elseveir, Amsterdam, 253-307.

Bassereau M, Chaintreau A, Duperrex S, Joulain D, LeijSh LG, Owen N, Sherlock A, Schippac TPJ et Vey M. (2007). GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. Data treatment stratégies and method performance. *J. Agric Food Chemistry*, 55 :25-31.

Benjilali B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'antraiement à la vapeur d'eau et ses équipements. *Institut agronomique et vétérinaire, Maroc*, 2, 515-527.

Ben-Taarit M, Msaadaa K, Hosni K, Hammami M et Elyes MKBM. (2009) . Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis L.*) fruits cultivated under salt stress conditions ,*Industrial Crops and Products* , 30, 333–337.

Benyahia S. (2015). Activités antimicrobiennes et insecticides de *thymus capitalus*, *Daucus crinitus* et *tetraclinis articulata* sur la mineuse *Tuta absoluta* (Myrick) et la microflore pathogène de la tomate *lycopersicum esculentum*, thèse de Doctorat. p2

Benzie I FF et Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power : the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

Bernard HREC, Johnsen PD, Killworth et Robinson S. (1989). Estimating the size of an average personal network and of an event population. In: *The Small World*, M. Kochen, Ed., 159–175.

Berset C et Cervelier ME. (1996). Methods of estimating the degree of lipide oxidation and of measuring antioxidizing power. *Science des Aliments*, 16, 219-245.

Beylier-Maurel F. (1976). Activités bactériostatique des certains matières premières de parfumerie. *Rivista taliana EPPOS*, 58, p283-286.

Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Allouz Y et Nasir M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) Muscle protein hydrolysate obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* 114: 1198-1205.

Bouhadjra K. (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge p45, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A et Lgic R. (2008). Phenolic as antioxydants in garlic (*Allium sativum* l., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, P. 925-929.

Brand-Williams W, Cuvelier ME et Berset C. (1995). Use of fre radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensm wiss Technology*, 28: 25-30.

Bretta G, Dranata P, Frrero M, Orioli M et Facino RM. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey bay a combination of spectrophotometric / Fluorimetric assay and chemometrics. *Analytica Chimica*, 533, 185-191.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3eme éd. Paris : Edition médicales internationales. Edition *Tec & Doc* Lavoisier 1120p.

Caillet S et Lacroix M. (2007). Les huiles essentiellesleur propriétés antimicrobienne et leur applications potentielles en alimentaire. *INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER*, p,1-8.

Cao G et Prior RL. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*, 44, 1309-1315.

Cao GH, Alessio HM, Cutler RG. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.

Cengiz K, Ashraf M, Osman S, Aydemir S, Levent AT et Cullu M. A. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horti culturae*, 121, 1–6.

Charfi D. (1995). Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. De Sfax.

Clark G, Ting KN, Wiart C et Jeffrey F. (2013). High correlation of 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical scavenging, Ferric reducing activity potential and total phenolic content indicates redundancy in use of all three assay to screen for antioxidant activity of extracts of plant. From the Malaysian Rainforest antioxidant, 2, 1-10.

Costa P, Goncalves S, Valentao P, Andrade PB, Coelho N et Anabela R. (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro culture produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1253-1260.

Dayisoğlu K et Alma M. H. (2009). Chemical analysis oils from cone's rosin of cilician fir (*Abies cilicica* sp *cilicica*), *Afr. J. Biotechnol*, 15, 3502-3505.

De Bouchebeg MS, Allegrini J, Bessvere C, Ahisso M, Passet J et Granger R. (1976). propriétés microbiologique des Huiles essentielles de chimiotype de *Thymus vulgaris* linnalul. *Rivista Italiana.Eppos*, P 58-527-536.

De-Gaulejac SC, Provost N et Vivas N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,425-431.

Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R et Tikkonen MJ. (2003). Caractérisation of the antioxidant properties of de-odourise aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83,255-262.

Dubey VS, Bhalla R et Luthra R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.* 28(5), 637-646.

Dudonne S, Vitrac X, Coutière P, Woitiez M et Merillon JM. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *J. Agric. C. Food Chemistry*, 57, 1768-1774.

Ech-chahad AF et Bouyazza L. (2013), Composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* (L.). *Scheele du Maroc Afrique SCIENCE 09(3) (2013) 77 – 81.*

Economon L, Venskutonis R et Van-Beek TA. (1991). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedure from some aromatic herbs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140-146.

Edris AE. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy Research*, Vol.21, pp.308-323.

El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Amarti F, Rahouti M, Aafi A, Ismaili R et Farah A. (2015). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus Algeriensis* Boiss. & *Reut.* et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois *Acta Botanica Gallica: Botany Letters* Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK.

El Haib A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytique. thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Elmastas M, Dermirtas I et Isilalk O. (2006). Antioxidant activity of s-lavone isolated from spearmint (*Mentha spicata* L. Fam Lamiaceae). *Journal of liquid Chromatography & related Technologies*, 29, 1465-1475.

Emami S A, Javadi B et Hassanzadh MK. (2007). Antioxidant activity of the Essential oils of different parts of *Juniperus communis* subsp. *Hemisphaerica* and *juniperus oblonga*. *Pharm. Biol*, 45(10): 769-776.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Fellah S, Romdhane M et Abderraba M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, 16, 193-202.

Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-BOAS M et Barros L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511-1516.

Franchomme P, Jollois R et Pénoel D. (1990). in « L'aromathérapie exactement ».pp44-48. Roger. Jollios, éditeur. limoge. france.

Garneau FX. (2002). Le matériel végétal et les huiles essentielles. LASEVE-UQAC, chicoutimi, Québec.

Gherman C, Culea M, Cozar O. (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. 53 :253-62.

Ghestem A, Seguim E, Paris M et Chioni AM. (2002). Le préparateur en pharmacie : Botanique phytothérapie-Homéopathie. Ed Tec et Doc Lavoisier. Paris. P 275.

Gholivand BM, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H et Ebrahimabadi A. H.(2010) Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 24–28.

Giovanelli G et Buratti. (2009). Comparaison des composés phénolique et et l'activité antioxydante des myrtilles itaiennes sauvage et quelques variétés cultivées. *Chimie alimentaire*. V. 112, P 903-908.

Gohari AR, Saeidnia S, Hajimehdipoor H, Shekarchi M et Hadjiakhoondi A. (2011). Isolation and quantification of rosmarinic acid from *hymenocrater calycinus*, *J Herbs, Spices & Medicinal plant*, 17(2), 132-138.

Gourine N, Bombarda I, Yousfi M et Gaydou EM. (2010). Chemotypes of *Pistacia atlantica* leaf essential oils from Algeria. *Natural product of communication*, vol. 5, N°1, 115- 120 .

Grcia-Aguilar C, Guvino G, Barogano MM, Hevia P et Gavino CV. (2007). Corralation of tocopherol, tocotrienol, gama-oryzanol and tatal plyphenol content in rice bran with *Chemistry*, 102, 1228-1232.

Gulcin I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 11:210–218. Gülçin İ (2009). Antioxidant activity of L-Adrenaline: A structure-activity insight. *Chem. Biol. Interac.* 179:71–80.

Guo L, Xie MY, Yan AP, Wan YQ et Wu YM. (2006). Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC- MS analytical and bioanalytical and bioanalytical. *Chemistry*, 386(6), 1881-1887.

Hadi M. (2004). La quercitrine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et application thérapeutique. Thèse présentée en vue de l'obtention de grade de Docteur en Science de l'Université Louis Pasteur Domaine pharmacochimie. P 155.

Hatanaka A, Kajiwara T et Sekiya J. (1987). Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chen phys lipids.* 44, 341-361.

Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, Faleiro ML et Miguel MG. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry*, 116, 714–721.

Hellal Z. (2011). contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites p134.

Hilan, C., Sfeir, R., Jawich, D. et Aitour, S. (2006). *Journal Scientifique Libanais*, 7: 13-22.

Hinneburg I, Dorman DHJ et Hiltunen R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97, 122–129.

Huang D, Ou B et Prior RI. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841-1856.

Huang, D, OU B, et antérieur, RL. (2005). La chimie derrière des analyses antioxydantes de capacité. *Journal de la chimie agricole et alimentaire*, 53, 1841-1856.

Hubert R. (1998). Biochimie de l'aliment, acide amines and oligopeptides ENSIA. activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779.

Iskender NY, Yayli N, Yildrum N, Cansu TB et Terzioglu S. (2009). The volatile Constituents of the Flower, Leaf, and Steam of *Verbascum viedemannianum* Grown in Turkey. *J121. Ournal of Oleo Science*, 58(3): 117-119.

Jayaprakash K et Karthikeyan A. (2008). Ocular myiasis and associated mucopurulent conjunctivitis acquired occupationally: A cause study *Indian J Occup Environ Med*, 12, 20-22.

Jeong ST, Goro-Yamamoto N, Kobayashi S et Esaka M. (2004). Effects of plants hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skin. *Plant Sci*, 167, 247-252.

Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG et Hara Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids: reduction potential and electron transfer reaction of flavonoid, *Flavonoids in health and disease*. New York, 137-161.

Judd WS. (2002). Les arguments taxonomiques: ique caractères structuraux et biochimiques. *In BBtanique systematique : une perspective phelogene*, De Boeck, Paris, PP, 4-88.

Julsing MK, Koulman A, Woedenbag HJ, Quax WJ et Kayser O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolite *Biomlecular Engineering*, 23: 265-279.

Karaçelik AA, Kuçuk M, Iskefixeli Z, Aydemir S, Smet SD, Miserez B, Standra P. (2015). Antioxidant component of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI method. *Food Chimistry*. 175N.p106-114.

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

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined bay 2,2'-azinobis (3-ethylbenzoline 6- sulfonate , ABTS and Ferric feducing antioxidant power (FRAP) assay. *!compative biochemistry and Physiology, Part C*, 140, 47-52.

Khajh M, Yadollah Y, Neader F, Mohammad RP. (2005). Comparaison of essential oils composition of *Ferula assafoetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 91, 639-644.

Kim H. (2003). Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 1586-1591.

Koechlin RC. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition chimique et métabolisme*.20(4) :165-177.

Kokkini S, Karousou R et Vokou D. (1994). Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochem. System. and Ecol.* 22(5):517-528.

Kouami K, Adzo DK et Kossi A. (2010). Application of Ecological Indicators in Forest Management in Africa. In S.E.Jørgensen, R. Costanza and F.L. Xu : Handbook of Ecological Indicators for Assessment of Ecosystem Health, 298- 329.

Kurita N et Koike S. (1982). Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils component. *Agric. Biol. Chem.*, P46-159-165.

Kurt BG. (1985). Torssel, naturel products chemistry. John Willy et sons limited. 401p.

Lagunez-rivera L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermique magnétique directe. Thèse de Doctorats, université de toulouse : p292.

Lamarti A, Badoc A, Deffieux G et Carde JP. (1994). Biogénèse des monoterpènes. *Bull. soc. Pharm. Bordeaux*. 133.69-118.

Lardy JM et Haberkorne V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de kinésithérapie*, 61 : 14-17.

Legast E, Peyron L. (1983). Congrès. International des huiles essentielles. Singapour, p.63.

Lemaoui F. (2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L Algérienne. université Ferhat Abbas –Setif.thèse de Magister.

Li C, Oldham CD et May SWN. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300: 31-36.

Lin L.; Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, Fu Y, French SW, Edwards JE et Spellberg B. (2009). Cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. 29, 1745–1753.

Lu F, Foo LY. (2001). Antioxidant activity of polyphenols from sagz (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197-202.

Lucchesi ME. (2005). Extraction sans solvant assisté par micro-onde conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en science, discipline : Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologie. antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84: 407–412.

Madhavi Vet Lele SS. (2009). Laccase : Properties and application, *Bioresource* 4(4), 1694-1717.

Mangena TNYO et Muyima L. (1999). Application. microbiologique, 28-291.

Marc F, Davin A, Deglene BL, Ferrand C, Baccaunaud M et Fritsch P. (2004). Methode d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments medecine/sciences, 20 :458-463.

Mastelic J, Jerkovic I, Blazevic I, Poljak-Blazi M, Borovic S, Ivancic-Bace I, Smrecki V, Zarkovic N, Brcic-Kostic K, Vikic-Topic D et Muller N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3989–3996.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V et Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the

Miller RE, Mc Conville MJ, Woodrow IE. (2006). *Phytochemistry*. 67 : 43-51.

Mini-Dukic N, Bozin B, Skovic M et Simin N. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis*. *Food Chem*, 52, 2485-2489.

Montoro E, Lemus SD, Echemendia M, Martin A, Portaels F et Palomino JC. (2005). Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 500-505.

Nagavani V, Madhavi YD, Bhaskarrao P, Koteswara R, Raghava-Rao T. (2010). Free radical scavenging activity and qualitative analysis of polyphenols by RP-HPLC in the flowers of *Couroupitaquia nensisabul*. *EJEAF. Chem*, 9(9): 1471-1484.

Naghbi F, Mosaddegh M, Motamed SM, Ghorbani A. (2005). *Iranian Journal of*

Natella F, Nardini M, Di-Felice M et Scaccini C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants structure activity relation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 1453-1459.

Noipa T, Supalax S, Thawatchai T et Wittaya N. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food search International*, 44, 798-806.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions : antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucisamine. *Jpn J Nutr* 103/ 413-419.

Padrini F et Lucheroni MT. (1996). Le grand livre des huiles essentielles. Ed. de Vecchi activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775-779..

Pellecuer J, Allegrini J et De Boucheberg M. S. (1976). Huiles essentielles bactéricides et fongicides *Revue de l'institut Pasteur de Lyon*, P 135-159.

Peltoketo A, Dorman HJD, Ytjonen T, Laakso I, Vuorela H et Hiltunen R. (2001). Antioxidant properties of volatile oils and aqueous fraction of selected aromatic and medicinal plants. 3rd international Conference on Phytomedicine, Munich, Germany, *Phytomedicine, Suppl*, 11-75.

Petlevski RM, Hadzija M, Slijepcevic D et Juretic PJ. (2003). Glutathione S-transferase and malondialdehyde in the liver of mice after short-term treatment with plant mixture extract. *Phytotherap. Res.*, 17: 311-314.

Pibiri P. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse).

Pinto D, Rocha R, Machado G et Giribet G. (2007). Harvestmen - The Biology of Opiliones. *Harvard University Press* ISBN 0-674-02343-9

Pokorny J, Yanishlieva N et Gordon M. (2001). Antioxidants in food, practical application Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

Popov I, Lewin G et Baehr R. (1987). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779.

Popovici C, Saykova I et Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des copposés phénoliques par laréactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie industriel*, 4, 25-39.

Quezel, P et Santa S. (1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S.Paris.

Quzel P. (1985). Les sapins des pourtours méditerranés. *Forêt méditerranéenne*, 1,27-34.

Ramadan MF. (2010). Rapid antiradical method for screening deep fried oils . *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5: 47-50.

Razali N, Razab R, Mat JS et Abdul AA. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, 11, 38–44.

Re R, Pellegrini N, Protrggente A, Pannala A, Yang M et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.

Rocha C, Siqueira CC, Vrcibradic D, Dorigo TA . (2007). Anurans from two high-elevation areas of Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *ZOOLOGIA* 28 (4): 457–464.

Rubin M et Messal JP. (1988). Abrégé de phytothérapie pratique. Ed .Doin.

Russo E. (1998). Cannabis for migraine treatment the once and fture prescription, an historical and scientific review, *Pain*, 76, 3-8.

- Salhi S, Fadli M, Zidane L et Douira A. (2010).** Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales. *Lazoroa*, 31,133-146.
- Sanchez MC. (2002).** Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), 121-137.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food. Agric*, 76: 270–276.
- Scalbert A, Johnson IT et Saltmarsh M. (1991).** Antioxydants et là-bas. *AM. J. Clin. Nutr*, 81, 215S-217.
- Scherer, R et Godoy H. T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, p.654-658, 2009.
- Sherwin HW. (1976).** Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany* 78: 703–710.
- Siddhuraju P et Becker K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L.) seed extracts. *Food Chem.* 101, 10-19.
- Singh AK, Dikshit A et Dixit S.M. (1983).** Fungitoxic properties of essential oil of *menthaarvensisvarpepiraxens*. *Perfumer and Flavorist*, p: 55-58.
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M et Rathinasabapathi B. (2006).** Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* 170, 274–282.
- Singh PH, Mittal S, Kaur S, Batish RD et Kohli K.R. (2009).** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from residues of *Artemisia scoparia*, *Food Chemistry*, 114, 642-645.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolou C, Kokkini S, Lanaras T et Arsenakis Agric. J. (1996).** Evaluation of antioxidant activity, *Food Chemistry*, 44, p1202.
- Strube M, Haenen GRMM, Van Den Berg H, Bast A. (1997).** Pitfalls in a method for measurement of total antioxidant capacity *Free Radic. Res*, 26, 512-521.

Tepes B, O'Connor A, Gisbert JP et O'Morain C. (2012). Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2012. *Helicobacter* 17(1), 36–42.

Thomson GR, Vosloo W et Bastos. (2003). ADS. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res.*;91:145–161.

Tongnuanchan P et Benjakul S. (2014). Essential oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* , Vol 79, p. 1249.

Valnet J. (1984). Aromathérapie-traitement des maladies par les essences des plantes. Ed. Maloine S.A., p10.

Villa no D, Fernandez-Pachon M.S, Moya ML, Troncoso AM et Garcia-Parrilla M. C. (2007). Radical scavenging ability polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230-235.

Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU et Locke S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.

Williams DG. (1993). The chemistry of essential oils. Micelle Press. England.

Wojdylo A, Oszmianski J et Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.

Wong CC, Li HB, Cheng KW et Chen F. A. (2006). Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem*, 97, 705-711.

Xiang Q, Gao Y et Xu YH. (2007). Capillary electrophoresis – amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylate hydroxyanisole in *foods*. *Analytical science*, 23(6), 713.

Yildirim A, Mavi A, Kara A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agr. Food Chem.* 49, 4083-4089.

Annexes

Annexe I : Matériels et réactifs utilisés

1. Matériels

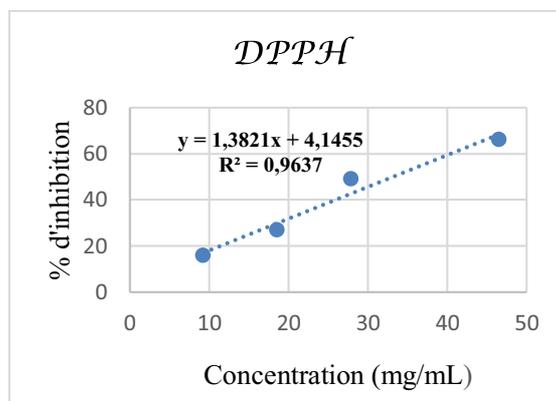
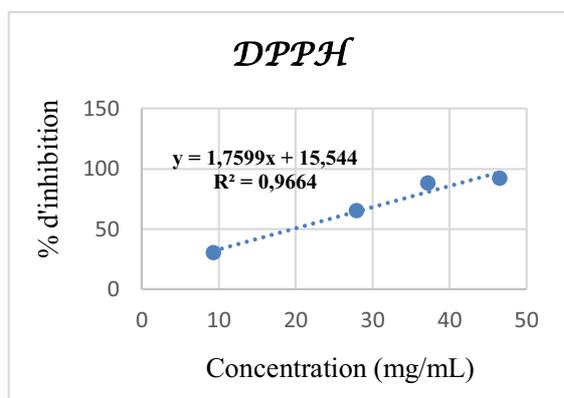
- Bain-Marie (TRADE RAYPA, MEMMERT).
- Balance de précision.
- Balance (RADWAG)
- Cuve.
- Micropipette (Smart).
- Plaque magnétique agitateur (VELP Scientifica)
- Réfrigérateur (LG)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-VIS SPECTROPHOTOMETER).
- Vortex (VELP Scientifica).
- pH mètre (HANNA INSTRUMENTS).

2. Réactifs utilisés

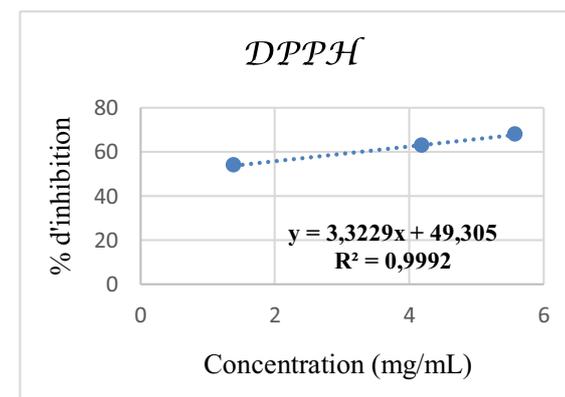
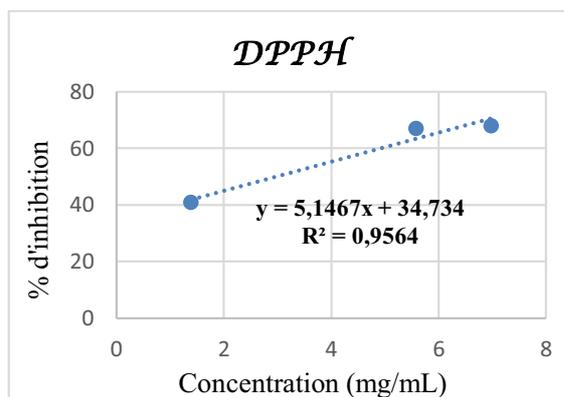
- DPPH (2,2 – DIPHENYL –1- picrylhydrazyl) : $C_{18} H_{12} N_5 O_6$, $M = 394,32 \text{ g/mol}$ (SIGMA-ALORICH).
- Ethanol $C_2 H_5 OH$ à 96% (BIOCHEM Chemopharma).
- Acide sulfurique : $H_2 SO_4$ à 96-98%, $M = 98,07 \text{ g/mol}$ (BIOCHEM Chemopharma)
- Phosphate de sodium : $Na H_2 PO_4, 2H_2 O$, $M = 1561,01 \text{ g/mol}$ (GPR Rectapur)
- Molybdate d'ammonium tétrahydraté : $H_{24} Mo_7 N_6 O_{24}, 4H_2 O$, $M = 1235,86 \text{ g/mol}$ (BIOCHEM Chemopharma)
- ABTS, $M = 514,62 \text{ g/mol}$.
- Persulfate de potassium, $M = 270,31 \text{ mg/mol}$ (BIOCHEM Chemopharma).
- $Na H_2 PO_4$, $M = 156,01 \text{ g/mol}$ (RECTAPUR).
- $Na_2 HPO_4$, $M = 177,99 \text{ g/mol}$ (Ried-de Haen).
- Ferrocyanure de potassium (BIOCHEM Chemopharma)
- Trichloroacetic acid (BIOCHEM Chemopharma)?
- Chlorure ferrique ($Fe Cl_3$) (BIOCHEM Chemopharma).

Annexe II : Les courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH

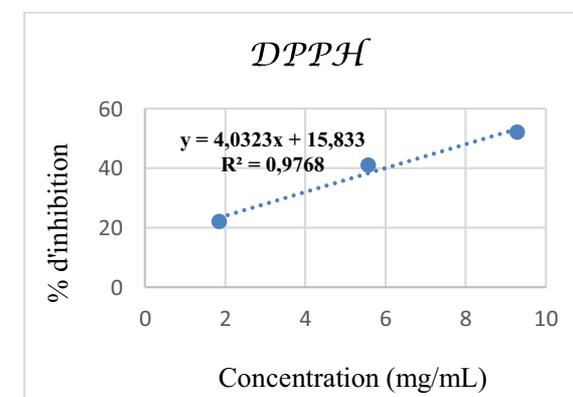
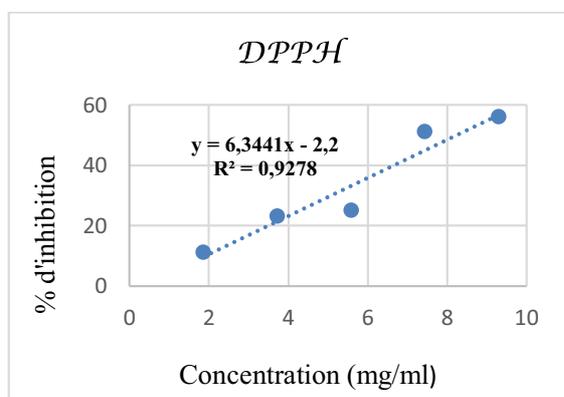
1. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH d' *Abies numidica*



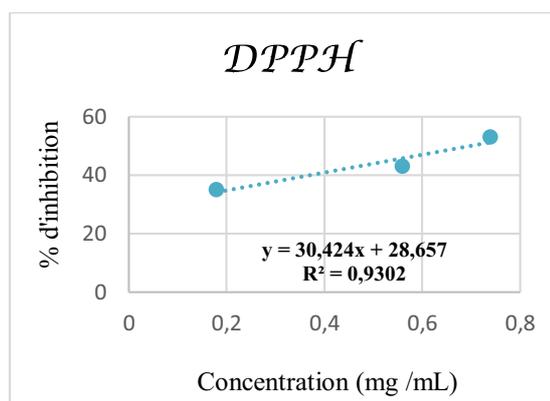
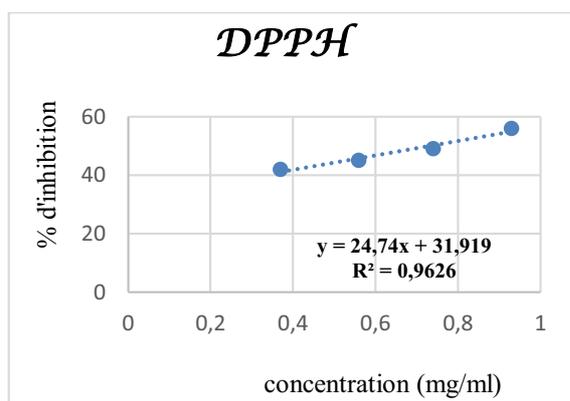
2. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH de *Calamintha officinalis*



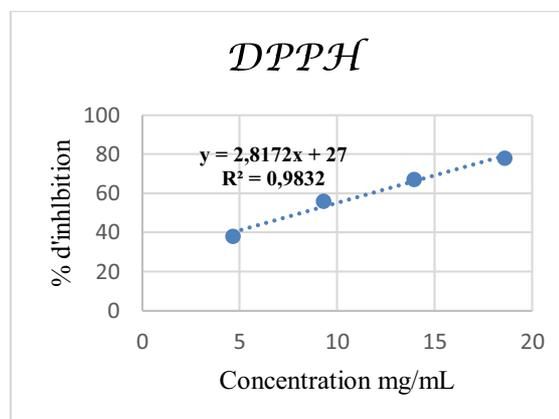
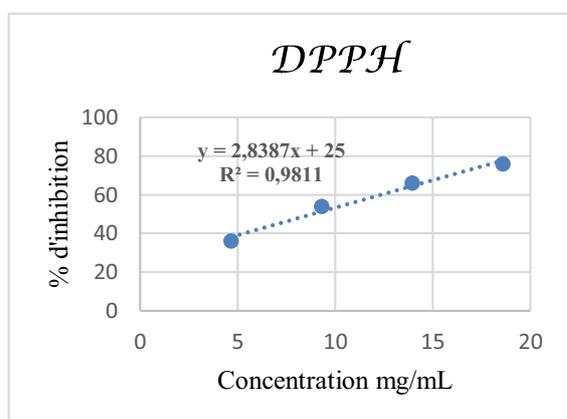
3. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH de CARVONE



4. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH de THYMOLO

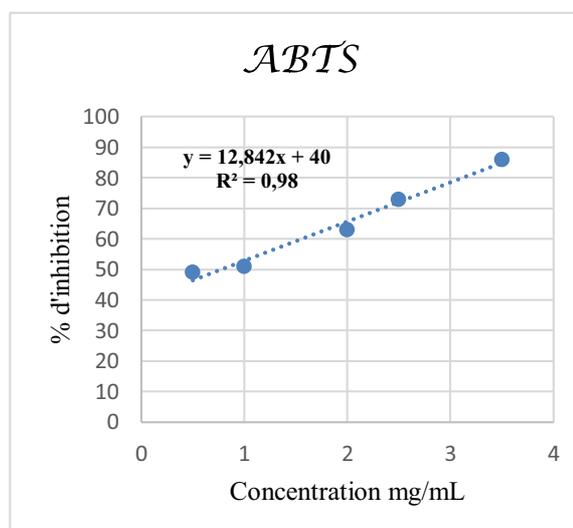
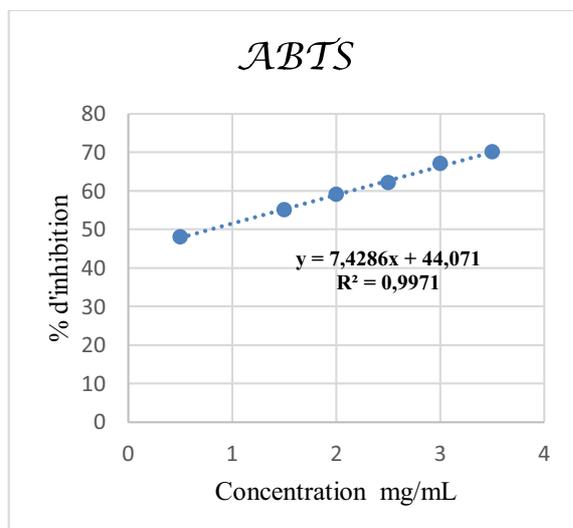


5. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire DPPH de GERANIOL

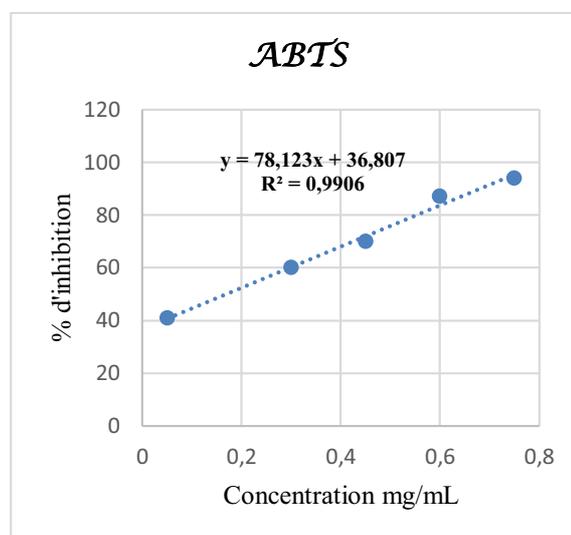
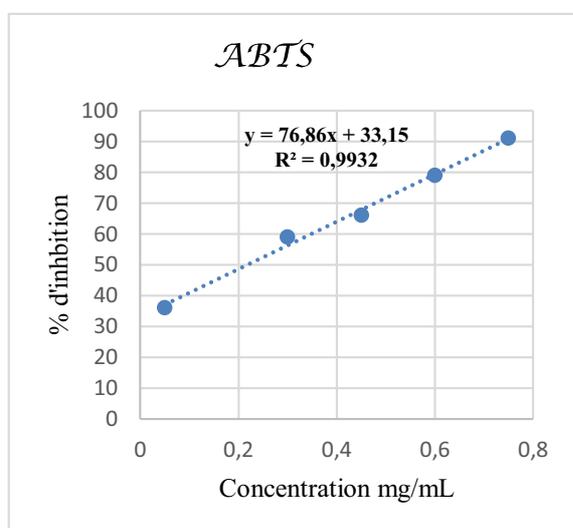


Annexe III : Les courbes d'étalonnage anti-radicalaire ABTS

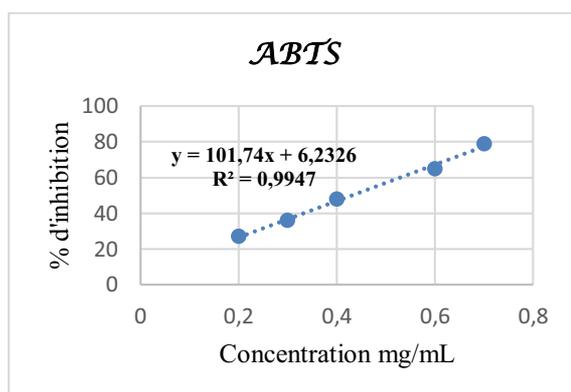
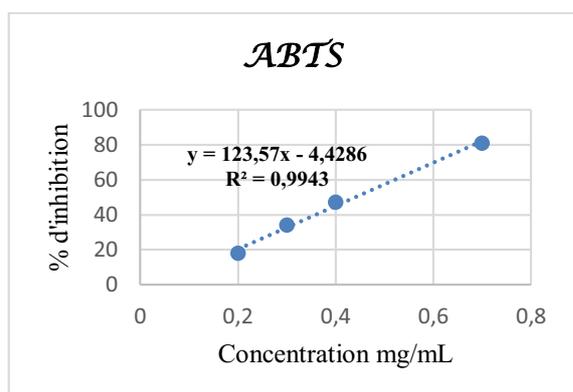
1. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire ABTS d'Abies numidica



2. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire ABTS de *Calamintha officinalis*

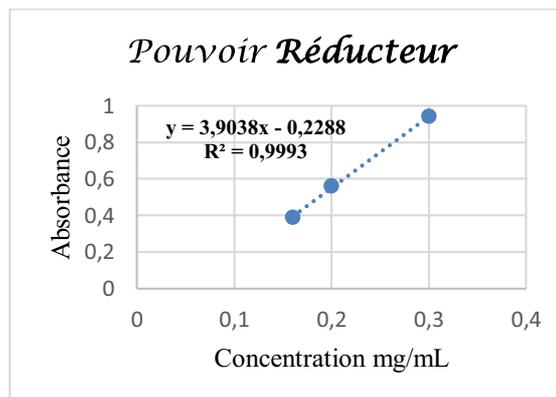
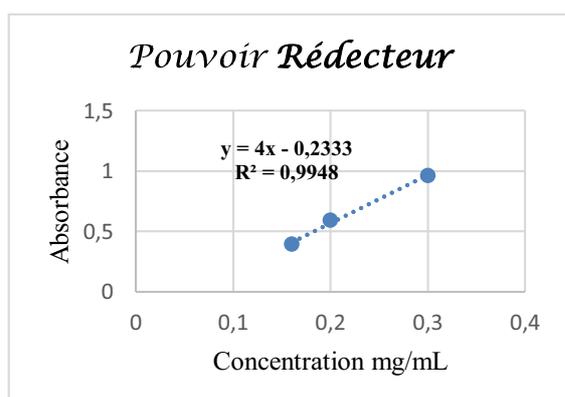


3. Courbes d'étalonnage anti-radicalaire ABTS de *CARVONE*

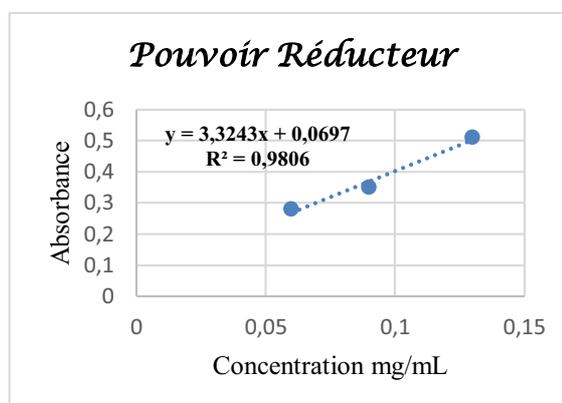
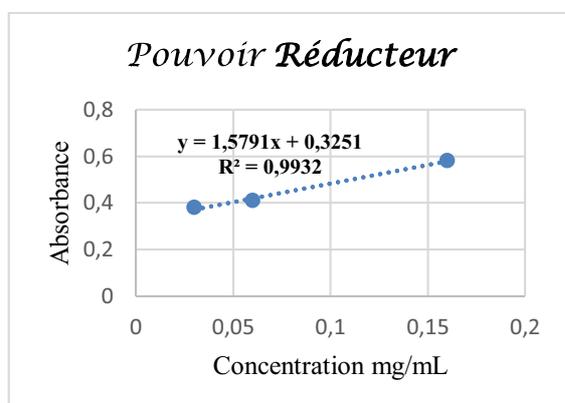


Annexe IV : Les courbes d'étalonnage de pouvoir réducteur

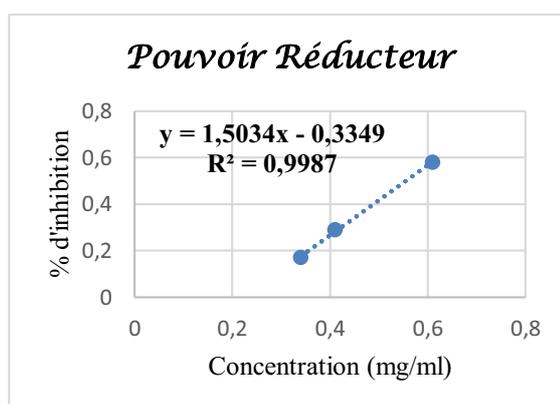
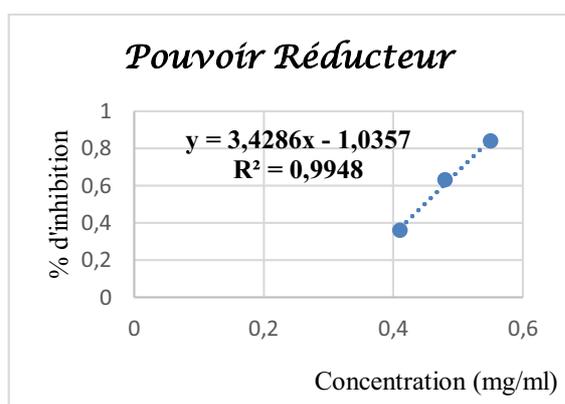
1. Courbes d'étalonnage de Pouvoir Réducteur d' *Abies numidica*



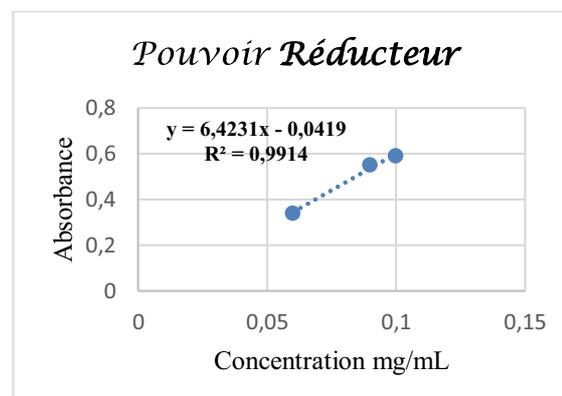
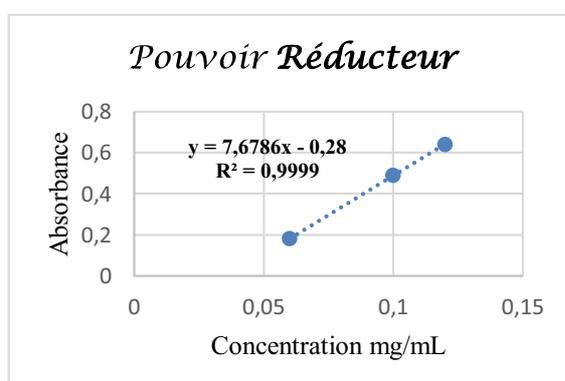
2. Courbes d'étalonnage de Pouvoir Réducteur de *Calamintha officinalis*



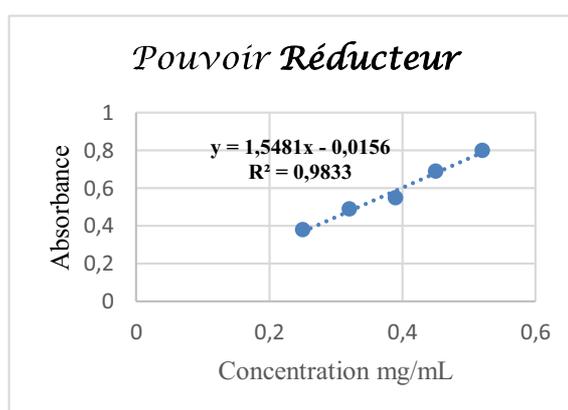
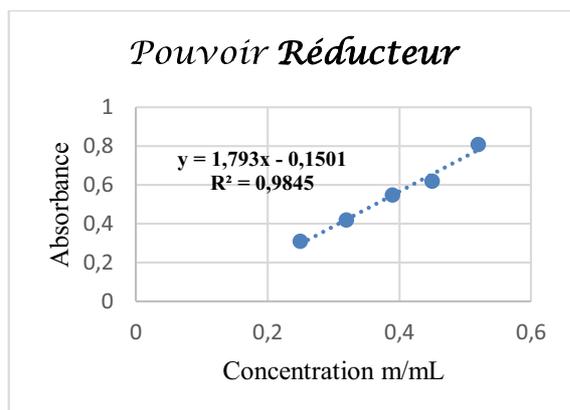
3. Courbes d'étalonnage de Pouvoir Réducteur de CARVONE



4. Courbes d'étalonnage de Pouvoir Réducteur de THYMOL

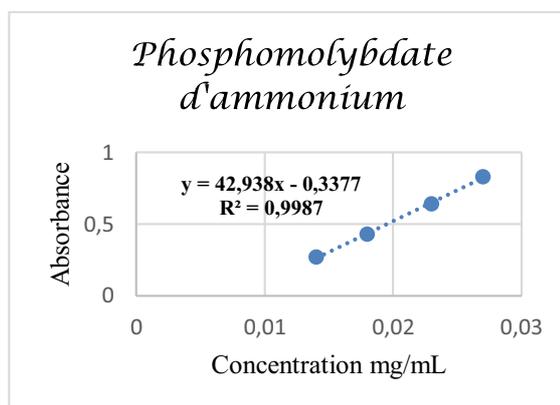
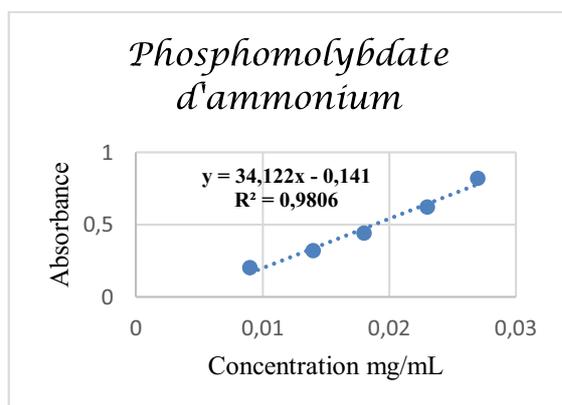


5. Courbes d'étalonnage de Pouvoir Réducteur de GERANIOLE

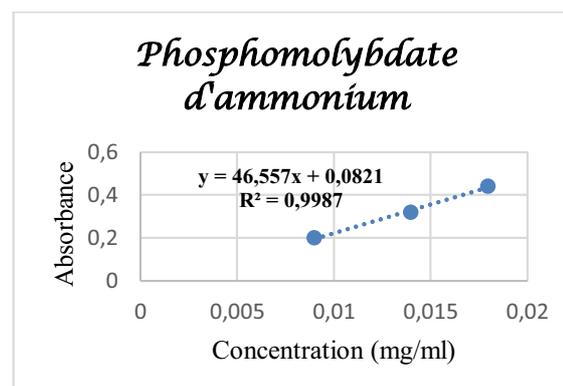
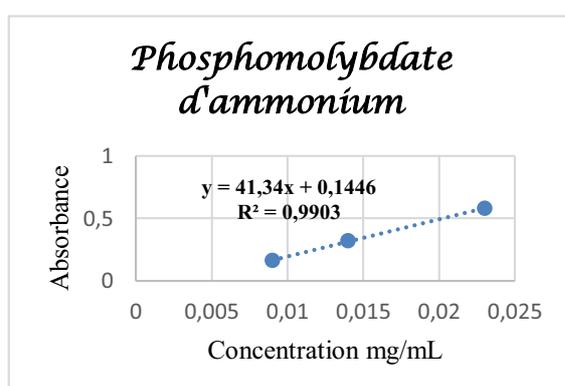


Annexe V : Les courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante totale

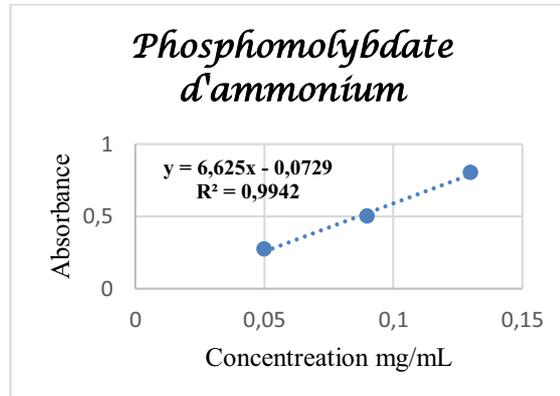
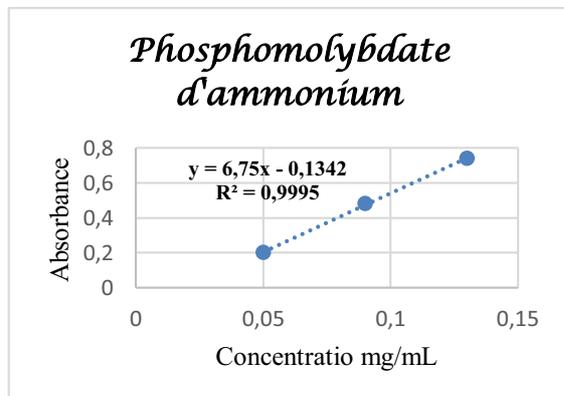
1. Courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante totale d'*Abies numidica*



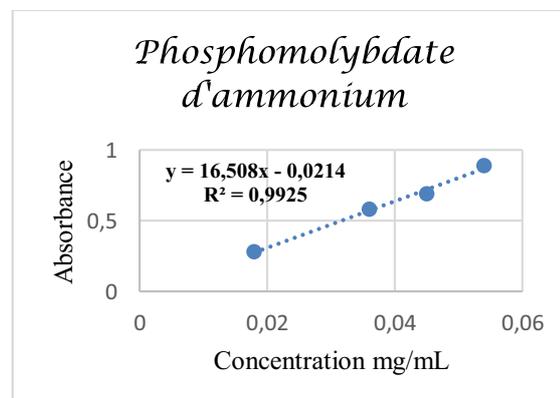
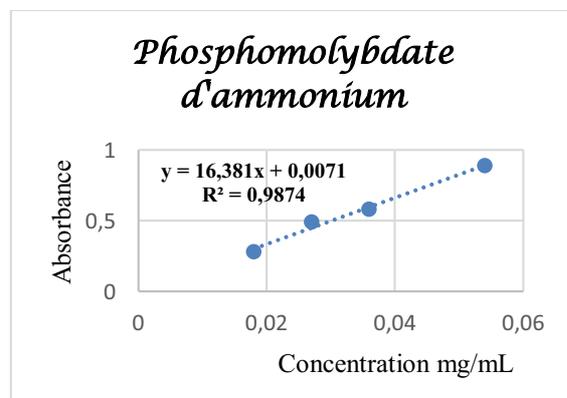
2. Courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante totale de *Calamintha officinalis*



3. Courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante totale de CARVONE



4. Courbes d'étalonnage de l'activité antioxydante totale de GERANIOL



Annexe VI : les résultats entre les échantillon et le DPPH

	1	2	3
Thymol 1	<i>xxxxx</i>		
Calamintha officinalis	<i>xxxxx</i>		
Carvone		<i>xxxxx</i>	
Géraniol		<i>xxxxx</i>	
Abies numidica			<i>xxxxx</i>

Annexe VII : Les résultats entre les échantillons et l'ABTS

	1	2	3	4	5
Thymol 1	<i>xxxxx</i>				
Géraniol		<i>xxxxx</i>			
Calamintha officinalis			<i>xxxxx</i>		
Carvone				<i>xxxxx</i>	
Abies numidica					<i>xxxxx</i>

Annexe VIII : Les résultats entre les échantillons et le pouvoir réducteur

	1	2	3	4	5
Thymol	<i>xxxxx</i>				
Calamintha officinalis		<i>xxxxx</i>			
Abies numidica			<i>xxxxx</i>		
Géraniol				<i>xxxxx</i>	
Carvone					<i>xxxxx</i>

*Annexe IX : Les résultats entre les échantillons et l'activité
antioxydante totale*

	1	2	3	4	5
Thymol 1	<i>xxxxx</i>				
Calamintha officinalis		<i>xxxxx</i>			
Abies numidica			<i>xxxxx</i>		
Géraniole				<i>xxxxx</i>	
Carvone					<i>xxxxx</i>

Annexe X : Corrélation entre les différents paramètres

DPPH	DPPH	ABTS	PR	AT
DPPH	1,00	0,93	-0,11	-0,14
ABTS	0,93	1,00	0,05	0,02
PR	-0,11	0,05	1,00	1,00
AT	-0,14	0,02	1,00	1,00

Résumé

Les huiles essentielles obtenues de deux plantes médicinales de la flore algérienne, notamment *Abies numidica* (Pinaceae) et *Calamintha officinalis* (Lamiacée), sont extraites par la méthode d'Hydrodistillation. L'étude de leurs activités antioxydantes est testée par le pouvoir anti-radicalaire au DPPH, activité scavenging du radical ABTS^{•+}, l'essai du pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium et enfin, avec l'activité antioxydante totale (test au phosphomolybdate). Les résultats indiquent que l'activité antioxydante, la plus efficace, *in vitro*, a été observée par l'huile essentielle de *Calamintha officinalis*. Les molécules de références utilisées sont : le thymol, la carvone et le géraniol.

L'analyse statistique des résultats indique l'existence d'une corrélation significative ($p < 0.05$) d'une part entre le pouvoir anti-radicalaire au DPPH et l'activité scavenging du radical ABTS^{•+}, d'autre part, entre le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium et l'activité antioxydante totale (test au phosphomolybdate).

Mots clés : Activité antioxydante, huiles essentielles, corrélation, DPPH, ABTS^{•+}, pouvoir réducteur, activité antioxydante totale.

Abstract

Essential oil obtained by the hydrodistillation, from two medicinal plants of the Algerian flora including *Abies numidica* (pinaceae) and *Calamintha officinalis* (lamiaceae), are tested for their antioxidant capacity by the anti-radical power DPPH, the radical scavenging activity ABTS^{•+}, reducing power of potassium ferricyanide and total antioxidant activity.

Results showed that the most effective antioxidant activity, *in vitro*, was observed by the essential oil of *Calamintha officinalis*. However, the molecules of references used in this study are Thymol, Carvone and Geraniol.

Statistical analysis indicates the existence of significant correlation ($p < 0.05$), firstly between the anti-radical power DPPH and the radical scavenging activity ABTS^{•+}, and secondly between the iron reducing power and total antioxidant capacity.

Keys word: *Abies numidica*, *Calamintha officinalis*, antioxidant activity, essential oil, correlation, DPPH, ABTS^{•+}, reducing power of potassium ferricyanide and total antioxidant capacity.