

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Domaine : S.N.V

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Option : Interactions micro-organismes, hôtes et environnements

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME
DE DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Par

ABDELLI Wafae

THEME

**Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques
des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris***

Soutenu publiquement le : 29/11/2017

Membres de jury

| | | | |
|---------------------|------------|------------------------------|--------------------|
| DJIBAOUI Rachid | Professeur | Université de Mostaganem | Président |
| BAHRI Fouad | Professeur | Université de Mostaganem | Directeur de thèse |
| MEKHALDI Abdelkader | Professeur | Université de Mostaganem | Examineur |
| BENHASSEINI Hachemi | Professeur | Université de Sidi Bel Abbes | Examineur |
| HADAJI Miloud | Professeur | Université d'Oran | Examineur |

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale

Année universitaire 2017 / 2018

Dédicaces

Je dédie ce travail, tout d'abord à la mémoire de mon très cher père, parti trop tôt, paix à son âme, sans qui ce travail n'aurait pu se faire et qui a attendu ce moment toute sa vie ainsi qu'à ma mère, pour leur soutien, leur dévouement et leur abnégation.

A mes sœurs et mon frère.

A la mémoire de mes grands-mères, paix à leur âme.

A mon grand-père qui a toujours cru en moi.

A ceux, qui me sont chers.

Remerciements

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Je tiens tout d'abord, à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Mr. Bahri F, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir fait l'honneur de diriger avec beaucoup d'attention et de soin ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour la confiance, la bienveillance, l'aide, le soutien, les précieux conseils, la patience et la disponibilité permanente qu'il m'a témoigné dans ce travail ainsi que, pour la grande autonomie qu'il m'a accordé. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma plus profonde gratitude.

Je remercie grandement Mr. Djibaoui R, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse mais aussi, pour tout ce qu'il m'a apporté tout au long de mes études, pour son écoute, sa gentillesse, sa générosité et sa grande disponibilité. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail. A Mr. Mekhaldi A, professeur à l'université de Mostaganem et directeur du laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, pour ses conseils avisés, sa disponibilité et son soutien. A Mr. Benhasseini H, professeur à l'université de Sidi Bel Abbes et à Mr. Hadaji M, professeur à l'université d'Oran, pour le grand intérêt qu'ils ont apporté à ce travail. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Je remercie Mr. Jirovetz L, Mme Höferl M et Mr. Schmidt E, membres de l'université de Vienne (Autriche) ainsi que Mr. Wanner J de l'université de Wallerstein (Allemagne) d'avoir réalisé l'analyse et l'identification de la composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées.

Mes remerciements s'adressent aussi, à Mr. Halbouche M, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir permis de réaliser mon étude pharmacologique dans son laboratoire.

A Mme Boufadi M.Y, maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour sa précieuse aide, ses conseils avisés et l'intérêt porté à mes travaux. A Mr Mansouri T, de m'avoir aidé dans les analyses statistiques des données recueillies au cours de mon étude. Aux techniciens de laboratoires : Djahira, Latifa, Nabil et Nassima pour leur grande aide, leur disponibilité, leur gentillesse, leur patience et leur bienveillance et sans qui, je n'aurais pu avancer dans mes travaux de recherches. Aux ingénieurs du Parc National de Tlemcen et plus particulièrement à Mme Hasnaoui H, qui m'a aidé dans l'identification des espèces végétales sélectionnées pour notre étude. A Mr Romane A, professeur à l'université de Cadi Ayyad Marrakech (Maroc).

Je tiens à remercier mes très chers parents du plus profond de mon cœur, pour leurs innombrables sacrifices et de m'avoir tant aidé, soutenu, réconforté, cru en moi et encouragé dans les moments de doute. Mon père parti bien trop tôt, paix à son âme, avait beaucoup contribué dans ce travail et rêvait tant de le voir enfin achevé. J'espère vous rendre tout deux fières de moi. Tous les mots ne suffiraient pas à vous dire combien je vous aime et combien vous comptez pour moi. Merci à mes proches et plus particulièrement, à mes sœurs et mon frère pour leur soutien et leur présence à mes côtés.

Je voudrais également remercier mes collègues du laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale.

Enfin, je remercie tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet qui compte tant pour moi.

ملخص

تركز هذا العمل على تثمين نوعين من النباتات ينموان بشكل عفوي في شمال غرب الجزائر و هما *Thymus vulgaris* L. و *Juniperus phoenicea* L. بتقييم بعض من خصائصهم البيولوجية. الزيوت العطرية للأوراق الجافة للزعر المحصول بمستغانم (HE.TM) و تلمسان (HE.TT)، أعطت مردود 2.2% و 4.2% في حين زيوت الأوراق الطازجة (HH.FF)، الأوراق الجافة (HE.FS) و التوت (HE.B) للزعر المحصول بمستغانم، أعطت مردود 0.15%، 0.21% و 0.14% على التوالي. أشار التحليل بواسطة CPG – SM إلى أن المكونات الرئيسية كانت thymol (59.5 و 67.3%) ل HE.TM و α -pinene (20.3 و 25.1%) ل HE.FF و HE.FS و β -phellandrene (43.9 و 44.9%) ل HE.TT (43.7%) ل HE.B.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي وجود مختلف مجموعات من الأيضات الثانوية في الأجزاء العلوية للنبات مثل الالكالويد، الفلافونويد، التانن، الانتراكينون، الستيروول و التريتربان، الكومارين و الكروهيديرات أظهر التمعدن أن النباتات الثلاثة كانت غنية بالكالسيوم، البوتاسيوم، الصوديوم، المغنيسيوم و الفوسفور وجد فقيرة من المعادن الثقيلة .

دراسة النشاط المضاد للميكروبات بالاروماتوغرام، اظهر تأثير مثبط كبير من طرف زيوت *T. vulgaris* على السلالات المرجعية السبع المختبرة في حين، تمكنت زيوت *J. phoenicea* الثلاثة من منع نمو سلالتين فقط وهي *Bacillus cereus* ATCC 10876 و *Candida albicans* ATCC 10231. سمحت طريقة الماكرو تخفيف في وسط سائل بالتحصل على CMI، CMB و CMF بقيم تتراوح من 0.312 إلى 5 ميكرو لتر/مل، 0.312 إلى 10 ميكرو لتر/مل و من 0.625 إلى 2.5 ميكرو لتر/مل على الترتيب لزيوت الزعر و بقيم تتراوح من 0.312 إلى 2.5 ميكرو لتر/مل، 0.625 إلى 2.5 ميكرو لتر / مل و عند 10 ميكرو لتر/ مل على الترتيب لزيوت الزعرار.

قيم CE_{50} المحصل عليها باختبار DPPH، هي 34.13 مغ/مل ل HE.TM، 24.89 مغ/مل ل HE.TT و 9980 مغ/مل ل HE.B في حين، لم يمكن تحديدها ل HE.FF و HE.FS. من جهة أخرى، CE_{50} المحصل عليها باختبار FRAP، هي 1.73 مغ/مل ل HE.TM، 1.71 مغ/مل ل HE.TT، 2057 مغ/مل ل HE.FF، 1633 مغ/مل ل HE.FS و 57.75 مغ/مل ل HE.B.

أشارت دراسة السمية الحادة إلى أن الزيوت الخمس التي تم اختبارها كانت آمنة للفئران البيضاء السويسرية اختبار و ذمة المخلب الناجمة عن الكراجينان أظهران بأكبر جرعة مختبرة (400مغ/كغ من وزن الجسم)، تم الحصول على نسب تثبيط 50.4% (HE.TM)، 58.4% (HE.TT)، 16.13% (HE.FF)، 14.52% (HE.FS) و 5.65% (HE.B).

الكلمات المفتاحية: *Thymus vulgaris* L.، *Juniperus phoenicea* L.، زيت عطري، CPG - SM، النشاط المضاد الميكروبي، النشاط المضاد للأوكسدة، السمية الحادة، النشاط المضاد للالتهابات.

Résumé

Ce travail s'est concentré sur la valorisation de deux espèces végétales, poussant à l'état spontané au nord ouest de l'Algérie, à savoir, *Thymus vulgaris* L. et *Juniperus phoenicea* L., en évaluant certaines de leurs propriétés biologiques. Les huiles essentielles des feuilles sèches du thym collecté de Mostaganem (HE.TM) et de Tlemcen (HE.TT), ont donné des rendements respectifs de 2.2% et 4.2% tandis que les huiles des feuilles fraîches (HE.FF), feuilles sèches (HE.FS) et des baies (HE.B) du genévrier collecté de Mostaganem, ont donné des rendements de 0.15%, 0.21% et 0.14%, respectivement. L'analyse par CPG-SM a indiqué que les composés majeurs étaient le thymol (59.5 et 67.3%) pour HE.TM et HE.TT, β -phellandrene (43.9 et 44.9%) et α -pinene (25.1 et 20.3%) pour HE.FF et HE.FS et α -pinene (43.7%) pour HE.B. Le screening phytochimique a révélé la présence de différents groupes de métabolites secondaires dans les parties aériennes des plantes tels que, les alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, anthraquinones, stérols et triterpènes, coumarines et glucides. La minéralisation a montré que les trois plantes étaient riches en calcium, potassium, sodium, magnésium et phosphore et très pauvres en métaux lourds.

L'étude de l'activité antimicrobienne par aromatoigramme, a montré un grand effet inhibiteur des huiles de *T. vulgaris* sur les sept souches de référence testées alors que, les trois huiles de *J. phoenicea* n'ont pu inhiber la croissance que de deux souches, à savoir, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231. La méthode de macrodilution en milieu liquide a permis d'obtenir les CMI, CMB et CMF à des valeurs allant de 0.312 à 5 μ l/ml, 0.312 à 10 μ l/ml et de 0.625 à 2.5 μ l/ml, respectivement pour les huiles du thym et à des valeurs allant de 0.312 à 2.5 μ l/ml, 0.625 à 2.5 μ l/ml et à 10 μ l/ml, respectivement pour les huiles du genévrier.

Les valeurs de CE₅₀ obtenues par le test de DPPH, sont de 34.13 mg/ml pour HE.TM, 24.89 mg/ml pour HE.TT, 9980 mg/ml pour HE.B alors que celles de HE.FF et HE.FS n'ont pas pu être déterminées. Par ailleurs, les CE₅₀ obtenues par le test de FRAP, sont de 1.73 mg/ml HE.TM, 1.71 mg/ml pour HE.TT, 2057 mg/ml pour HE.FF, 1633 mg/ml pour HE.FS et 57.75 mg/ml pour HE.B. L'étude de la toxicité aiguë a indiqué que les cinq huiles testées étaient sans danger pour les souris *Swiss albinos*. Le test de l'œdème plantaire induit par la carragénine a montré qu'à la plus grande dose testée (400 mg/Kg), les pourcentages d'inhibition ont été obtenus à 50.4% (HE.TM), 58.4% (HE.TT), 16.13% (HE.FF), 14.52% (HE.FS) et 5.65% (HE.B).

Mots clés : *Thymus vulgaris* L., *Juniperus phoenicea* L., huile essentielle, CPG-SM, activité antimicrobienne, activité antioxydante, toxicité aiguë, activité anti-inflammatoire.

Abstract

This work focused on the valorization of two plant species, growing in spontaneous state in northwestern Algeria, namely, *Thymus vulgaris* L. and *Juniperus phoenicea* L., by evaluating some of their biological properties. The essential oils of the dried leaves of thyme collected from Mostaganem (HE.TM) and Tlemcen (HE.TT), gave respective yields of 2.2% and 4.2% while the oils of the fresh leaves (HE.FF), dried leaves (HE.FS) and berries (HE.B) of the juniper collected from Mostaganem, gave yields of 0.15%, 0.21% and 0.14%, respectively. GC-MS analysis indicated that the major compounds were thymol (59.5-67.3%) for HE.TM and HE.TT, β -phellandrene (43.9 - 44.9%) and α -pinene (25.1 - 20.3%) for HE.FF and HE.FS and α -pinene (43.7%) for HE.B. Phytochemical screening revealed the presence of different groups of secondary metabolites in aerial parts of plants such as alkaloids, flavonoids, tannins, anthraquinones, sterols and triterpenes, coumarins and carbohydrates. The mineralization showed that the three plants were rich in calcium, potassium, sodium, magnesium and phosphorus and very poor in heavy metals.

The study of the antimicrobial activity by aromatogram, showed a great inhibitory effect of *T. vulgaris* oils on the seven reference strains tested whereas, the three oils of *J. phoenicea* were able to inhibit the growth of only two strains, namely, *Bacillus cereus* ATCC 10876 and *Candida albicans* ATCC 10231. The macrodilution method in liquid medium led to obtain the MIC, MBC and MFC at values ranging from 0.312 to 5 μ l/ml, 0.312 to 10 μ l/ml and from 0.625 to 2.5 μ l/ml respectively for thyme oils and values ranging from 0.312 to 2.5 μ l/ml, 0.625 to 2.5 μ l/ml and at 10 μ l/ml respectively for juniper oils.

The EC₅₀ values obtained by the DPPH test, are 34.13 mg/ml for HE.TM, 24.89 mg/ml for HE.TT, 9980 mg/ml for HE.B whereas, those of HE.FF and HE.FS could not be determined. Furthermore, the EC₅₀ obtained by the FRAP test, are 1.73 mg/ml HE.TM, 1.71 mg/ml for HE.TT, 2057 mg/ml for HE.FF, 1633 mg/ml for HE.FS and 57.75 mg/ml for HE.B.

The study of acute toxicity indicated that the five oils tested were safe for *Swiss albino* mice. The carrageenan-induced paw edema test showed that at the highest dose tested (400 mg/Kg p.o), the inhibition percentages were obtained at 50.4% (HE.TM), 58.4% (HE.TT), 16.13% (HE.FF), 14.52% (HE.FS) and 5.65% (HE.B).

Keywords: *Thymus vulgaris* L., *Juniperus phoenicea* L., essential oil, GC-MS, antimicrobial activity, antioxidant activity, acute toxicity, anti-inflammatory activity.

Table des matières

Table des matières

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| Remerciements..... | i |
| ملخص..... | iii |
| Résumé..... | iv |
| Abstract..... | v |
| Liste des tableaux..... | vi |
| Liste des figures..... | vii |
| Liste des abréviations et symboles..... | ix |
| Introduction..... | 1 |
| Partie 1 : Synthèse bibliographique | |
| Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles | |
| I- Les huiles essentielles..... | 5 |
| I.1- Définition..... | 5 |
| I.2- Répartition botanique..... | 5 |
| I.3- Localisation et lieu de synthèse..... | 5 |
| I.4- Propriétés physico-chimiques..... | 6 |
| I.5- Rôle physiologique..... | 6 |
| I.6- Composition chimique..... | 7 |
| I.6.1- Les terpènes..... | 7 |
| I.6.2- Les composés aromatiques..... | 8 |
| I.6.3- Les composés d'origines diverses..... | 9 |
| I.6.4- Notion de chémotype..... | 10 |
| I.7- Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles..... | 10 |
| I.7.1- Facteurs intrinsèques..... | 10 |
| I.7.2- Facteurs extrinsèques..... | 11 |
| I.8- Domaines d'application..... | 12 |
| I.8.1- Parfums et cosmétiques..... | 12 |
| I.8.2- Santé : Pharmacie et aromathérapie..... | 12 |
| I.8.3- Agro-alimentaire..... | 13 |
| I.8.4- Agriculture..... | 13 |
| I.9- Toxicité des huiles essentielles..... | 14 |
| I.10- Méthodes d'extraction des huiles essentielles..... | 15 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I.10.1- Distillation..... | 15 |
| I.10.1.1- Hydrodistillation..... | 15 |
| I.10.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau..... | 16 |
| I.10.1.3- Hydrodiffusion..... | 17 |
| I.10.1.4- Extraction à froid..... | 17 |
| I.10.1.5- Extraction par solvants organiques..... | 17 |
| I.10.1.6- Enfleurage..... | 18 |
| I.10.1.7- Extraction assistée par micro-ondes..... | 18 |
| I.10.1.8- Extraction par fluide à l'état supercritique..... | 19 |
| I.11- Méthodes d'analyse des huiles essentielles..... | 20 |
| I.11.1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)..... | 21 |
| I.11.2- Spectrométrie de masse (SM)..... | 22 |
| I.11.3- Couplage CPG / SM..... | 22 |
| Chapitre II : Espèces végétales étudiées | |
| II.1- La famille des Cupressacées..... | 24 |
| II.1.1- Le genre <i>Juniperus</i> | 25 |
| II.1.2- Le genévrier de Phénicie (<i>Juniperus phoenicea</i> L.)..... | 25 |
| II.1.2.1- Description morphologique..... | 25 |
| II.1.2.2- Principales caractéristiques botaniques..... | 25 |
| II.1.2.3- Taxonomie..... | 27 |
| II.1.2.4- Habitat..... | 27 |
| II.1.2.5- Répartition géographique..... | 28 |
| II.1.2.5.1- Dans le monde..... | 28 |
| II.1.2.5.2- En Algérie..... | 29 |
| II.1.2.6- Composition chimique..... | 29 |
| II.1.2.7- Usages..... | 30 |
| II.2- La famille Lamiacées..... | 31 |
| II.2.1- Le genre <i>Thymus</i> | 31 |
| II.2.2- Le thym commun (<i>Thymus vulgaris</i> L.)..... | 32 |
| II.2.2.1- Description morphologique..... | 32 |
| II.2.2.2- Taxonomie..... | 33 |
| II.2.2.3- Habitat..... | 33 |
| II.2.2.4- Répartition géographique..... | 33 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| II.2.2.4.1- Dans le monde..... | 33 |
| II.2.2.4.2- En Algérie..... | 34 |
| II.2.2.5- Composition chimique..... | 34 |
| II.2.2.6- Usages..... | 36 |
| Chapitre III : Activités biologiques des huiles essentielles | |
| III- Introduction..... | 37 |
| III.1- Activité antimicrobienne..... | 37 |
| III.1.1- Infections nosocomiales..... | 37 |
| III.1.1.1- Agents pathogènes..... | 38 |
| III.1.1.2- Modes de transmission..... | 38 |
| III.1.1.2.1- Voie endogène..... | 38 |
| III.1.1.2.2- Voie exogène..... | 39 |
| III.1.1.2.3- Patient réceptif..... | 39 |
| III.1.2- Les antibiotiques..... | 39 |
| III.1.3- La résistance bactérienne aux antibiotiques..... | 40 |
| III.1.4- Les huiles essentielles comme agents antibactériens..... | 41 |
| III.1.4.1- Mode d'action..... | 43 |
| III.1.5- Les huiles essentielles comme agents antifongiques..... | 44 |
| III.1.5.1- Mode d'action..... | 45 |
| III.2- Activité antioxydante..... | 45 |
| III.2.1- Le stress oxydatif..... | 45 |
| III.2.2- Les radicaux libres..... | 46 |
| III.2.3- Les antioxydants..... | 47 |
| III.2.3.1- Systèmes enzymatiques..... | 47 |
| III.2.3.2- Systèmes non enzymatiques..... | 48 |
| III.2.3.3- Mécanismes d'action des antioxydants..... | 49 |
| III.3- Activité anti-inflammatoire..... | 50 |
| III.3.1- L'inflammation..... | 50 |
| III.3.2. Les différents types d'inflammation..... | 50 |
| III.3.2.1- Inflammation aigue..... | 50 |
| III.3.2.2- Inflammation chronique..... | 52 |
| III.3.3. Les anti-inflammatoires..... | 52 |
| III.3.3.1- Les anti-inflammatoires conventionnels..... | 52 |

| | |
|-------------------------------------------------------|----|
| III.3.3.2- Les anti-inflammatoires traditionnels..... | 54 |
|-------------------------------------------------------|----|

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.1- Matériel végétal..... | 56 |
| IV.1.1- Récolte..... | 56 |
| IV.1.2- Détermination du taux d'humidité..... | 58 |
| IV.1.3- Screening phytochimique..... | 59 |
| IV.1.3.1- Principe..... | 59 |
| IV.1.3.2- Alcaloïdes..... | 59 |
| IV.1.3.3- Polyphénols..... | 60 |
| IV.1.3.3.1- Tanins..... | 60 |
| IV.1.3.3.2- Flavonoïdes..... | 60 |
| IV.1.3.4- Dérivés anthracéniques..... | 61 |
| IV.1.3.5- Saponosides..... | 62 |
| IV.1.3.6- Stérols et triterpènes..... | 63 |
| IV.1.3.7- Autres caractérisations..... | 64 |
| IV.1.3.7.1- Composés réducteurs..... | 64 |
| IV.1.3.7.2- Oses et holosides..... | 64 |
| IV.1.3.7.3- Mucilages..... | 64 |
| IV.1.3.7.4- Hétérosides cyanogénétiques..... | 64 |
| IV.1.4- Détermination de la composition minérale des plantes..... | 65 |
| IV.1.4.1- Préparation des échantillons..... | 65 |
| IV.1.4.2- Minéralisation des échantillons..... | 65 |
| IV.1.4.3- Analyse des échantillons..... | 65 |
| IV.2- Huiles essentielles..... | 66 |
| IV.2.1- Procédés d'extraction..... | 66 |
| IV.2.1.1- Hydrodistillation..... | 66 |
| IV.2.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau..... | 67 |
| IV.2.2- Calcul du rendement..... | 68 |
| IV.2.3- Méthodes d'analyse des huiles essentielles..... | 68 |
| IV.2.3.1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)..... | 68 |
| IV.2.3.2- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG - SM)..... | 68 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.2.3.3- Identification des composés chimiques..... | 69 |
| IV.3- Procédés d'étude microbiologique..... | 69 |
| IV.3.1- Souches microbiennes testées..... | 69 |
| IV.3.2- Milieux de culture utilisés..... | 70 |
| IV.3.3- Préparation de l'inoculum..... | 70 |
| IV.3.4- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards... | 70 |
| IV.3.5- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles..... | 71 |
| IV.3.5.1- Technique d'aromatogramme (méthode de Vincent)..... | 71 |
| IV.3.5.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 71 |
| IV.3.5.3- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)..... | 72 |
| IV.3.5.4- Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)..... | 73 |
| IV.4- Etude de l'activité antioxydante..... | 73 |
| IV.4.1- Test de DPPH..... | 73 |
| IV.4.1.1- Principe..... | 73 |
| IV.4.1.2- Mode opératoire..... | 74 |
| IV.4.1.3- Expression des résultats..... | 74 |
| IV.4.2- Test de FRAP..... | 75 |
| IV.4.2.1- Principe..... | 75 |
| IV.4.2.2- Mode opératoire..... | 75 |
| IV.4.2.3- Expression des résultats..... | 76 |
| IV.5- Etude pharmacologique..... | 76 |
| IV.5.1- Matériel animal..... | 76 |
| IV.5.2- Préparation des solutions à tester..... | 76 |
| IV.5.3- Toxicité aigue..... | 76 |
| IV.5.3.1- Notion de toxicité..... | 76 |
| IV.5.3.2- Principe..... | 77 |
| IV.5.3.3- Mode opératoire..... | 77 |
| IV.5.4- Etude de l'activité anti-inflammatoire..... | 77 |
| IV.5.4.1- Test de l'œdème plantaire induit par carragénine..... | 77 |
| Chapitre V : Résultats et discussion | |
| V.1- Matériel végétal..... | 80 |
| V.1.1- Taux d'humidité..... | 80 |
| V.1.2- Screening phytochimique..... | 81 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| V.1.3- Composition minérale et teneurs en métaux lourds..... | 85 |
| V.2- Huiles essentielles..... | 88 |
| V.2.1- Rendement en huile essentielle..... | 88 |
| V.2.2- Analyse de la composition chimique..... | 90 |
| V.3- Etude de l'activité antimicrobienne..... | 98 |
| V.3.1- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards..... | 98 |
| V.3.2- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles..... | 100 |
| V.3.2.1- Technique de l'aromatogramme (méthode de Vincent)..... | 100 |
| V.3.2.2- Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)..... | 103 |
| V.4- Etude de l'activité antioxydante..... | 106 |
| V.4.1- Test de DPPH..... | 106 |
| V.4.2- Test de FRAP..... | 109 |
| V.5- Etude pharmacologique..... | 114 |
| V.5.1- Toxicité aigue..... | 114 |
| V.5.2- Activité anti-inflammatoire..... | 115 |
| Conclusion..... | 122 |
| Références bibliographiques..... | 126 |
| Annexes..... | 166 |

Liste des tableaux

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau n°1 : Données géographiques de la récolte des espèces étudiées..... | 56 |
| Tableau n°2 : Liste des souches microbiennes testées..... | 69 |
| Tableau n°3 : Résultats du screening phytochimique de <i>Thymus vulgaris</i> | 81 |
| Tableau n°4 : Résultats du screening phytochimique de <i>Juniperus phoenicea</i> | 83 |
| Tableau n°5 : Résultats de la minéralisation de <i>Thymus vulgaris</i> L. et de <i>Juniperus phoenicea</i> L..... | 85 |
| Tableau n°6 : Les rendements en huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Juniperus phoenicea</i> | 89 |
| Tableau n°7 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> | 90 |
| Tableau n°8 : Composition chimique des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> | 94 |
| Tableau n°9 : Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm..... | 99 |
| Tableau n°10 : Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Juniperus phoenicea</i> exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm..... | 101 |
| Tableau n°11 : Valeurs des paramètres antimicrobiens des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> exprimées en µl/ml..... | 103 |
| Tableau n°12 : Valeurs des paramètres antimicrobiens des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> exprimées en µl/ml..... | 104 |
| Tableau n°13 : Valeurs de la concentration efficace 50 des huiles essentielles des espèces étudiées et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH..... | 109 |
| Tableau n°14 : Valeurs de la concentration efficace 50 des huiles essentielles des espèces étudiées et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP..... | 111 |
| Tableau n°15 : Effet de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> de Tlemcen sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez la souris..... | 115 |
| Tableau n°16 : Effet de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> de Mostaganem sur l'œdème induit par carragénine chez la souris..... | 116 |
| Tableau n°17 : Effet des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez la souris..... | 118 |

Liste des figures

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure n°1 : Formule de l'isoprène..... | 7 |
| Figure n°2 : Représentation de molécules caractéristiques des différentes structures rencontrées chez les mono- et sesquiterpénoïdes..... | 8 |
| Figure n°3 : Exemples de composés aromatiques C ₆ -C ₃ caractéristiques des huiles essentielles..... | 9 |
| Figure n°4 : Exemples de composés aromatiques C ₆ -C ₁ rencontrés dans les huiles essentielles..... | 9 |
| Figure n°5 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation..... | 16 |
| Figure n°6 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau..... | 16 |
| Figure n°7 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion..... | 17 |
| Figure n°8 : Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes..... | 19 |
| Figure n°9 : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique..... | 20 |
| Figure n°10 : Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse..... | 21 |
| Figure n°11 : Principe de la spectrométrie de masse..... | 22 |
| Figure n°12 : Schéma du principe du couplage CPG/SM..... | 23 |
| Figure n°13 : Aspect du genévrier de Phénicie..... | 26 |
| Figure n°14 : Fleurs et feuilles de <i>J. phoenicea</i> | 27 |
| Figure n°15 : Feuilles et fruits de <i>J. phoenicea</i> | 27 |
| Figure n°16 : Aire de répartition des genévriers du groupe <i>phoenicea</i> en région méditerranéenne..... | 28 |
| Figure n°17 : Les principaux monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> | 30 |
| Figure n°18 : Aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> L..... | 32 |
| Figure n°19 : Distribution géographique du thym dans le monde..... | 34 |
| Figure n°20 : Les différents chémotypes de <i>Thymus vulgaris</i> L..... | 35 |
| Figure n°21 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne..... | 43 |
| Figure n°22 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie..... | 47 |
| Figure n°23 : Les étapes de la réaction inflammatoire..... | 52 |
| Figure n°24 : Le genévrier de Phénicie de la forêt de Cap Ivy (Mostaganem)..... | 56 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure n°25 : Situation géographique des stations de collecte des plantes étudiées..... | 57 |
| Figure n°26 : <i>Thymus vulgaris</i> de Mostaganem..... | 58 |
| Figure n°27 : <i>Thymus vulgaris</i> de Tlemcen..... | 58 |
| Figure n°28 : Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> | 66 |
| Figure n°29 : Vapodistillateur de type SPRING A 105 12 Litres utilisé pour l'extraction des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> | 67 |
| Figure n°30 : Séparation de la phase huileuse de la phase aqueuse dans l'ampoule de décantation..... | 67 |
| Figure n°31 : Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant..... | 73 |
| Figure n°32 : (a) Administration orale d'huile essentielle, (b) Injection sub-plantaire de la carragénine..... | 78 |
| Figure n°33 : Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital..... | 78 |
| Figure n°34 : Taux d'humidité de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> | 80 |
| Figure n°35 : Taux d'humidité de l'espèce <i>Juniperus phoenicea</i> | 80 |
| Figure n°36 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les deux huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> | 107 |
| Figure n°37 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les trois huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> | 107 |
| Figure n°38 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique..... | 108 |
| Figure n°39 : Pouvoir réducteur des deux huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> | 110 |
| Figure n°40 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> | 110 |
| Figure n°41 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> | 110 |
| Figure n°42 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique..... | 110 |
| Figure n°43 : Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par les deux huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> et le diclofénac..... | 117 |

Liste des abréviations et symboles

- AFNOR** : Association Française de Normalisation
- AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- AIS** : Anti-inflammatoire stéroïdien
- ATCC** : American Type Culture Collection
- BMR** : Bactérie multirésistante
- CE₅₀** : Concentration Efficace à 50%
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- CMF** : Concentration Minimale Fongicide
- CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- DL₅₀** : Dose Létale 50
- DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle
- ERO** : Espèce réactive oxygénée
- FID** : Détecteur par Ionisation de Flamme
- FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power
- GRAS**: Generally Recognized As Safe
- HE**: Huile essentielle
- IC** : Ionisation Chimique
- IE** : Ionisation Electronique
- IR** : Indice de Rétention
- ISO**: International Standard Organization
- OECD**: Organization for Economic Co-operation and Development
- p.c**: Poids corporel
- PI**: Pourcentage d'inhibition
- ppm**: Partie par million
- p/v** : Poids/Volume
- SM** : Spectrométrie de Masse
- UFC** : Unité Formant des Colonies
- UI** : Unité Internationale
- UV** : Ultra Violet

Introduction

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et ce, pendant de nombreux siècles. Dans diverses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à l'empirisme. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés curatives ou préventives des plantes médicinales qui n'ont d'ailleurs, jamais été démenties par l'usage (**Carillon, 2009**).

Les plantes médicinales sont devenues importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**OMS, 1998**). Ainsi, malgré le développement du médicament de synthèse, le médicament végétal sous ses différentes formes continue à occuper une place de choix. Entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (**Adossides, 2003**), soit un total de 120 composés provenant de 90 plantes différentes (**Kar, 2007**).

La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas pour autant réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaire de 80% de la population mondiale (**OMS, 2013**). En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90% de la médecine traditionnelle dans ce continent (**OMS, 2002**). Cependant, la médecine traditionnelle comporte un certain nombre de risque incluant la toxicité de certaines plantes et l'interaction des plantes avec les médicaments de synthèse ou avec d'autres produits naturels, pouvant occasionner par conséquent, des effets secondaires (**Angell et Kassirer, 1998 ; Slifman et al., 1998**). Certaines plantes contiennent des principes actifs qui peuvent être extrêmement puissants, d'autres sont toxiques à faible dose. Le fait que l'on utilise que des plantes ne signifie pas que cela est sans danger (**Iserin et Vican, 2001**), une plante sur dix est vénéneuse (**Franz-Xaver, 2010**). De plus, les données relatives à

l'innocuité et à l'efficacité ne sont disponibles que pour un nombre restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent (**Heide, 1991**).

L'Algérie, de par sa gamme de climats très variée et sa situation géographique, possède un ensemble considérable d'espèces naturelles qui représentent un patrimoine phytogénétique de très grande importance vu leur mode de répartition spatiale et leur rôle dans l'équilibre écologique (**Snoussi et al., 2003**). La valorisation de ces ressources est devenue indispensable. A cet effet, nous nous sommes intéressés à deux espèces poussant à l'état spontané à l'ouest du pays, à savoir, *Juniperus phoenicea* L. et *Thymus vulgaris* L. et plus particulièrement, à leurs métabolites secondaires ; les huiles essentielles.

Les huiles essentielles constituent un complexe de molécules bioactives qui possèdent diverses propriétés biologiques intéressantes. Elles trouvent application dans divers domaines : médecine, pharmacie, cosmétologie, alimentation et agriculture. L'intérêt suscité pour ces essences s'accroît constamment et connaît d'ailleurs, ces derniers temps un engouement sans précédent. La recherche tendant à découvrir des agents thérapeutiques de plus en plus efficaces et avec le moins d'effets secondaires possible, trouvent en ces huiles essentielles de potentielles alternatives pour remédier à différents problèmes notamment, à l'émergence de la résistance microbienne aux antibiotiques. Ce phénomène se développe de plus en plus rapidement et de manière quasi universelle et est particulièrement marqué pour les germes responsables d'infections nosocomiales (**Hanberger et al., 1999 ; Sieradzki et al., 1999**). Il est essentiellement dû à l'utilisation excessive des antibiotiques. Dans de nombreuses situations, seul un nombre restreint d'antibiotiques demeure efficace (**Goldmann et al., 1996 ; Wise et al., 1998**).

Par ailleurs, le stress oxydatif, un autre problème majeur de santé publique, suscite énormément d'attention. Se définissant comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants dans l'organisme, provoqué par une surproduction de radicaux libres, le stress oxydatif est impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes telles que l'athérosclérose, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le diabète, les rhumatismes et le vieillissement prématuré de la peau (**Roberts et Sindhu, 2009**). L'utilisation des antioxydants commerciaux (synthétiques) tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le tertio-butylhydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG), n'est pas sans risque puisqu'ils ont été suspectés, ces dernières années, de posséder une certaine toxicité et d'être responsables des dommages causés dans le foie et de carcinogénèse (**Pan et al., 2008 ; Atmani et al., 2009**).

Les radicaux libres sont impliqués également dans les processus pro-inflammatoires. Bien que l'inflammation soit un mécanisme de défense non spécifique développée pour protéger les tissus contre les dommages causés par des stimuli nuisibles (**Jain et al., 2014**), elle peut être accompagnée de symptômes indésirables (œdème, érythème et douleur). Son traitement, en particulier, par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), expose aux risques de toxicité gastro-intestinale, rénale et cardiovasculaire. Ces risques sont d'autant plus importants que la posologie est élevée et que le traitement est prolongé (**Wallace et Vong, 2008**).

Face aux différents problèmes encourus par l'utilisation des agents synthétiques, l'attrait pour des sources naturelles est devenu aujourd'hui et plus que jamais important. Notre présente étude s'inscrit dans cette perspective et cherche à approfondir les connaissances sur les espèces *Juniperus phoenicea* L. et *Thymus vulgaris* L. et à les valoriser en évaluant les activités antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires de leurs huiles essentielles mais aussi, leur toxicité afin s'assurer de leur innocuité.

Notre travail est structuré en deux parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres. Le premier chapitre aborde des généralités sur les huiles essentielles, le deuxième est consacré à la description botanique des deux espèces végétales étudiées tandis que le troisième chapitre, s'intéresse aux activités biologiques des huiles essentielles et particulièrement, l'activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire.

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres, le premier (quatrième chapitre) présente le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail, à savoir :

- Screening phytochimique des parties aériennes des plantes sélectionnées;
- Dosage des minéraux et des métaux lourds des parties aériennes ;
- Extraction des huiles essentielles du thym par hydrodistillation et du genévrier par entraînement à la vapeur d'eau ;
- Analyse et identification de la composition chimique des huiles essentielles par CPG-SM ;
- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la méthode de l'aromatogramme et par macrodillution en milieu liquide ;
- Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles par le test de DPPH et le test de FRAP ;

- Etude pharmacologique *in vivo* des huiles essentielles par évaluation de leurs toxicités aiguës et leurs activités anti-inflammatoires par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine.

Le second (cinquième chapitre) est réservé à la présentation et à la discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale qui résumera l'ensemble de ces résultats.

Partie

bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les huiles essentielles

I- Les huiles essentielles

I.1- Définition

Une huile essentielle est un mélange naturel complexe de métabolites secondaires lipophiles, volatils, odorants et souvent liquides contenus dans des tissus végétaux spécialisés (**Bruneton, 1993 ; Kalemba et Kunicka, 2003**). Selon la norme AFNOR NF'T 75-006, « l'huile essentielle désigne le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation « sèche ». Elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**AFNOR, 2000**). Cette définition détermine les huiles essentielles au sens strict. Mais, de ce fait, elle écarte les produits obtenus en employant d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (**Bruneton, 1999**).

Il est important de distinguer huile essentielle et essence. Cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est le résultat d'extraction de l'essence, autrement dit, l'essence distillée (**Carette, 2000**). Et contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, l'huile essentielle ne contient pas de corps gras comme l'huile végétale (**Anton et Lobstein, 2005**).

I.2- Répartition botanique

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales recensées, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont alors dites « aromatiques » (**Bruneton, 1999 ; Degryse et al., 2008**). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent, en particulier les Labiées, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées (**Baser et Buchbauer, 2010**).

I.3- Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de cellules sécrétrices variables selon l'organe végétal considéré. Puis, elles s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées et emmagasinées dans des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, à savoir, des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* et *Zingiberaceae*), des poils glandulaires épidermiques qui

produisent les essences dites superficielles (*Labiaceae*, *Geraniaceae* et *Rutaceae*), des poches sécrétrices (*Myrtaceae*, *Aurantiaceae*, *Rutaceae*) ou encore des canaux sécréteurs (*Apiaceae*, *Ombelliferaeae* et *Asteraceae*) (**Bruneton, 1999 ; Boz et al., 2009**).

Les huiles essentielles peuvent être extraites de divers organes de la plante. Il peut s'agir d'écorces (cannelier, citron, orange, bergamote), de graines (carvi, cardamome, coriandre, fenouil), de feuilles (eucalyptus, mélisse, citronnelle), de racines (angélique, vétiver), de rhizomes (acore, gingembre), de fleurs (origan, ylang-ylang, camomille), de bois (bois de cèdre, santal), de sèves (encens, myrte), de bourgeons (pin), des fruit (badiane)...etc (**Bruneton, 1999**).

I.4- Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**). Elles sont en général liquides à température ambiante, volatiles, inflammables, très odorantes et ne sont que très rarement colorées. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1 sauf pour les huiles essentielles de sassafras (*Sassafras. albidum*), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et de cannelle (*Cinnamomum. zeylanicum*). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (**Bruneton, 1999; Charpentier et al., 2008 ; Desmares et al., 2008**).

Les huiles essentielles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, elles peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol...etc) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (**Bernadet, 2000**).

Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques mais sont peu solubles dans l'eau (**Bruneton, 1999**). Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tendent à se collecter en gouttelettes de grosse taille (**Martini et Seiller, 1999**). Elles sont également très altérables et s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (**Bruneton, 1993**).

I.5- Rôle physiologique

Le rôle exact des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des propriétés biologiques très variées qui leur permettent d'exercer plusieurs effets utiles pour la plante tels que : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, inhibition de la multiplication de la flore microbienne infectieuse (**Mann, 1987 ; Deroin, 1988 ;**

Bakkali, 2008). Comme source énergétique, elles facilitent certaines réactions chimiques (**Bakkali et al., 2008**). Dans les climats désertiques, elles permettent de conserver l'humidité de la plante. De plus, elles peuvent être utilisées comme moyen de compétition aux ressources environnementales par l'inhibition de la germination des graines des autres espèces de plante ou par la limitation de la croissance de certaines espèces voisines (**Fischer et al., 1994 ; Bakkali et al., 2008**).

I.6- Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Lahlou, 2004**). Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (**Senatore, 1996**). L'ensemble de ces constituants appartient, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part (**Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010**). Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

I.6.1- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C_5H_8) (**figure n°1**) (**Hernandez-Ochoa, 2005 ; Fillatre, 2011**).

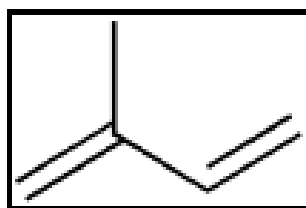


Figure n°1 : Formule de l'isoprène (Fillatre, 2011)

Les terpènes sont subdivisés selon le nombre d'unités isopréniques en : hémiterpènes (1 unité : C_5), monoterpènes (2 unités : C_{10}), sesquiterpènes (3 unités : C_{15}), diterpènes (4 unités : C_{20}), sesterpènes (5 unités : C_{25}), triterpènes (6 unités : C_{30}), carotènes (8 unités : C_{40})

et les polyisoprènes (n unités : C_{5n}) (Hernandez-Ochoa, 2005 ; Fillatre, 2011). Un terpène qui possède un oxygène est un terpénoïde. A noter que le terme terpène, anciennement employé pour caractériser l'ensemble de la classe des terpénoïdes, a une définition aujourd'hui plus restreinte et ne s'adresse qu'aux (mono)-terpénoïdes hydrocarbonés (Baser et Buchbauer, 2010). Dans le cas des huiles essentielles, seuls sont rencontrés les terpénoïdes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, principalement les mono- et sesquiterpénoïdes et, beaucoup plus rarement, les diterpénoïdes. Les monoterpénoïdes représentent à eux seuls environ 90% des huiles essentielles (Richter, 1993 ; Bruneton, 1999 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Les terpénoïdes se caractérisent par une grande variété de structures dont certaines sont regroupées dans la figure suivante (figure n°2) (Fillatre, 2011):

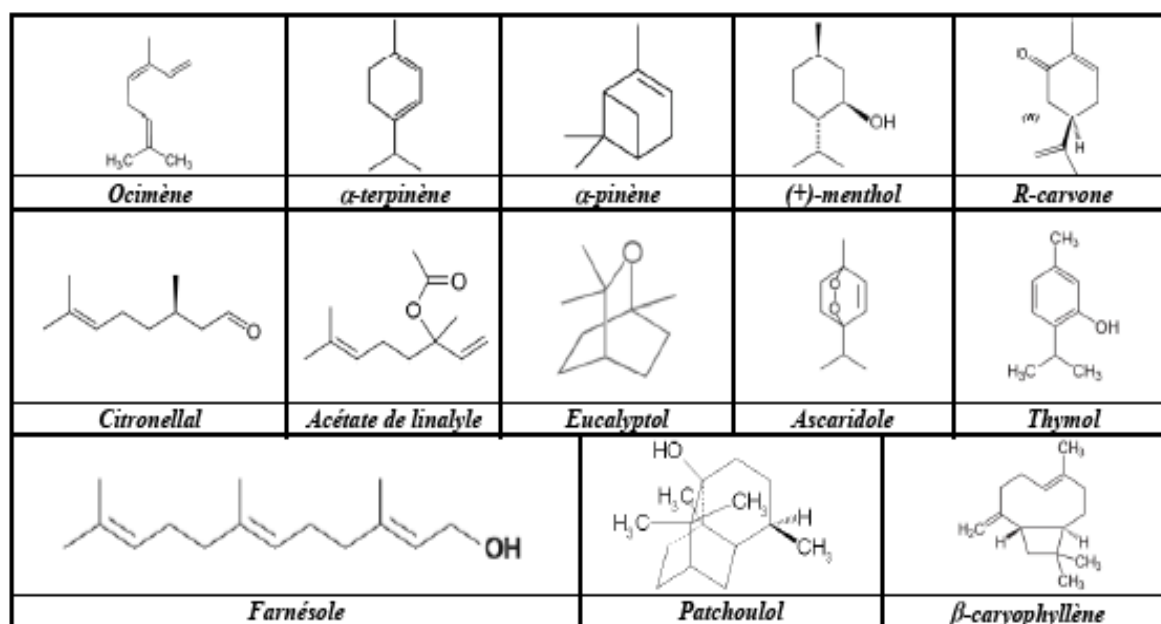


Figure n°2 : Représentation de molécules caractéristiques des différentes structures rencontrées chez les mono- et sesquiterpénoïdes (Fillatre, 2011)

Si les composés terpéniques sont les constituants majoritaires des huiles essentielles, les molécules aromatiques n'en demeurent pas moins des composés importants, à l'exemple du cinnamaldéhyde qui représente environ 75% de l'huile essentielle de cannelle (Garnéro, 1996).

I.6.2- Les composés aromatiques

Les composés aromatiques des huiles essentielles sont principalement des dérivés du phénylpropane C₆-C₃ (figure n°3), parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde),

des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugénol), des dérivés méthoxy (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) (**Bruneton, 1999**).

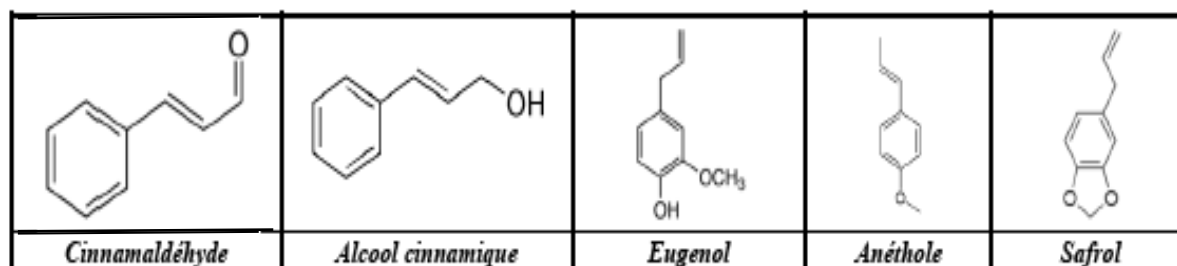


Figure n° 3 : Exemples de composés aromatiques C₆-C₃ caractéristiques des huiles essentielles (Bruneton, 1999)

Il est cependant possible de rencontrer des composés C₆-C₁, comme la vanilline (assez fréquente) et l'antranilate de méthyle (**figure n° 4**), ainsi que des lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines, par exemple) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau (**Bruneton, 1999**).

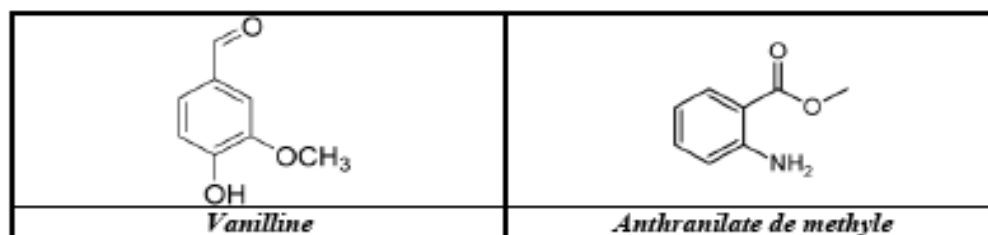


Figure n°4 : Exemples de composés aromatiques C₆-C₁ rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999)

I.6.3- Les composés d'origines diverses

Il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexen-1-ol ou le décane, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléique) (**Bruneton, 1999**).

Si la concentration de ces composés est généralement très faible, ils peuvent cependant avoir une influence considérable à l'exemple de la β -damascenone. Cette molécule, issue de la dégradation des terpènes, ne représente que 0.14% de l'huile essentielle de rose (*Rosa damascena*). Elle est pourtant un contributeur majoritaire de l'odeur de cette huile (**Leffingwell, 2011**).

I.6.4- Notion de chémotype

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'huile essentielle. Cet élément permet de distinguer des huiles essentielles extraites d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2005).

I.7- Facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991 ; Bruneton, 1999). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante (Morin et Richard, 1985).

I.7.1- Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Barry, 2001). Une huile essentielle peut s'extraire de plusieurs parties de la plante. Cependant, la quantité et la qualité diffèrent, d'où la nécessité de spécifier le nom de la partie utilisée (Bruneton, 1999).

Le rendement et la composition chimique d'une huile essentielle varient aussi en fonction du cycle végétatif. En effet, pour une espèce donnée, la teneur des différents composants de l'huile essentielle peut varier de façon remarquable tout au long du cycle végétatif en rapport avec l'âge de la plante et la période de récolte ou la saison. Autrement dit, certains constituants se trouvent en abondance à des périodes précises par rapport à d'autres. Par exemple, suivant le mois de récolte, la *Satureja montana* dont l'essence est utilisée en pharmacie, produit 60% de carvacrol au mois de Janvier contre 10% seulement en Octobre (Razafindrakoto, 1988 ; Dethier, 1996).

L'origine géographique peut également avoir une influence sur la composition chimique des huiles essentielles. C'est le cas du jasmin par exemple, dont la composition diffère selon qu'il est cultivé en France, en Italie ou en Algérie (**Verzele et al., 1988**).

Le polymorphisme chimique « variétés chimiques ou formes physiologiques » est aussi un des facteurs intrinsèques les plus importants. Il est mis en évidence lorsque les mêmes espèces cultivées au même endroit peuvent avoir des compositions chimiques différentes : ce sont des chémotypes. Ce phénomène de variabilité chimique a été observé chez plusieurs espèces telles que *Melaleuca quinquenervia*, ce qui permet la possibilité d'une sélection de la biodiversité (**Razafindrakoto, 1988 ; Ramanoelina et al., 1992 ; Dethier, 1996**).

I.7.2- Facteurs extrinsèques

La composition en huile essentielle dépend des conditions environnementales, plus précisément, du sol et du climat. En ce qui concerne le sol, le développement de la partie aérienne de la plante est fonction de celui du système racinaire et de son activité. Or la forme des racines, leur répartition dans le sol, leur vitesse d'extension, la variation de la composition chimique des huiles essentielles dépendent de la texture du sol, de sa structure, de sa teneur en eau ou de sa température. C'est ainsi, par exemple, que deux plantes de la même espèce récoltées à la même période sur des sols différents, ont une composition chimique et une teneur en huile essentielle variables (**Razafindrakoto, 1988 ; Dethier, 1996**).

Pour ce qui est du climat, l'ensemble température, précipitations et lumière agit non seulement sur la croissance et le développement de la plante mais aussi, sur la qualité des substances élaborées au niveau de la plante (**Bruneton, 1999 ; Aprotosoiaie et al., 2010 ; Olle et Bender, 2010**). D'autres facteurs tels que, les techniques sylvicoles (la densité de plantation, l'irrigation, l'utilisation d'engrais, les traitements phytosanitaires, les techniques de récolte...etc) (**Barry, 2001 ; Lahlou, 2004 ; Stefanini et al., 2006 ; Aprotosoiaie et al., 2010**), les méthodes d'extraction utilisées (**Huang et al., 1995**) ou encore le stockage des matières premières avant distillation peuvent influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. En ce qui concerne ce dernier facteur, des pertes considérables d'huile essentielle peuvent être constatées lors d'un stockage prolongé au congélateur (**Fantino, 1990**). Par ailleurs, le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier leur composition. D'après **Carette (2000)**, les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention car avec le temps leurs propriétés tendent à décroître.

I.8- Domaines d'application

Il existe une grande variété d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles essentielles qui leur confère aussi bien des propriétés odorantes et aromatiques qu'antimicrobiennes, mais aussi, les différentes utilisations possibles et leur coût de production (**Grysole, 2005 ; Fillatre, 2011**). Ces caractéristiques offrent des débouchés importants dans de nombreux domaines industriels, que ce soit dans l'industrie cosmétique, les secteurs de la santé, de l'agro-alimentaire ou de l'agriculture (**Fillatre, 2011**).

I.8.1- Parfums et cosmétiques

Dans le domaine des parfums et cosmétiques, les huiles essentielles sont employées en tant qu'agents conservateurs grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Cependant, c'est surtout pour leurs caractéristiques odorantes en raison de leur forte volatilité et du fait qu'elles ne laissent pas de trace grasse, qu'elles sont utilisées, notamment dans la formulation de parfums, de produits d'entretien personnels ou ménagers domestiques ou industriels (**Aburjai et Natsheh, 2003**).

I.8.2- Santé : pharmacie et aromathérapie

Les vertus thérapeutiques des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis très longtemps, notamment en Asie où ces produits naturels constituent la base de la médecine traditionnelle. Il est donc logique de retrouver les huiles essentielles dans le domaine de la santé avec des applications pharmaceutiques et aromathérapiques. En pharmacie, les huiles essentielles sont majoritairement destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses administrées par voie orale (**Bruneton, 1999**). De même, elles peuvent être utilisées pour leur activité antiseptique, en particulier dans le milieu hospitalier (**Edris, 2007**).

De nombreux produits tels que les pommades, les crèmes et les gels à base d'huiles essentielles permettraient de faciliter l'administration des médicaments par voie transdermique étant donné la propriété de ces huiles à pénétrer aisément dans la peau (principalement due aux terpènes). Ces produits sont généralement destinés à soulager les entorses, les courbatures, les allergies articulaires ou musculaires (**Razafindrakoto, 1988 ; Dethier, 1996 ; Edris, 2007**).

Si les huiles essentielles trouvent des applications importantes dans la médecine dite conventionnelle ou scientifique, leurs bienfaits constituent la base d'un autre domaine de la santé

qui se rapproche plus de la médecine traditionnelle : l'aromathérapie (**Fillatre, 2011**). Cette dernière correspond à l'utilisation des odeurs et des substances volatiles pour soigner, atténuer ou prévenir les infections et les indispositions internes uniquement par le moyen d'inhalation (**Buchbauer et Jirovetz, 1994**) ou encore, à l'utilisation des huiles essentielles pour traiter certaines maladies externes par leur application sur la peau au travers de massages (**Tisserand et Balacs, 1995**). La synergie des différents constituants des huiles essentielles détermine leur effet équilibrant. C'est ainsi que certaines huiles peuvent avoir des actions paradoxales comme par exemple, l'huile essentielle de lavande qui peut avoir un effet à la fois relaxant et stimulant (**Werner, 2002**).

I.8.3- Agro-alimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées en industrie agroalimentaire comme arômes et épices alimentaires pour les boissons gazeuses ou alcooliques, les condiments, les confiseries, les produits laitiers, les produits carnés, les produits de boulangerie mais également pour la nutrition animale (**Bruneton, 1999**). Les plus couramment utilisées sont celles de : menthe, vanille, poivre, basilic, gingembre, eucalyptus...etc (**Mapoli, 2003**).

Actuellement, les huiles essentielles ou leurs composés actifs, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, tout en assurant une qualité organoleptique meilleure, en rehaussant le goût des aliments (**Caillet et Lacroix, 2007 ; Tiwari et al., 2009**). Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme GRAS » ou approuvés comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des aliments et des médicaments FDA (Food Drug Administration). Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments mais des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité sans pour autant être toxique pour l'homme (**Caillet et Lacroix, 2007**).

I.8.4- Agriculture

La volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne en faveur de l'écologie, du développement et de l'aménagement durables, s'est affermie ces dernières années. Concernant les pesticides, l'un des projets de loi vise à réduire la consommation en produits phytosanitaires de 50% en dix ans, l'échéance étant 2018 (**Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008**). Dans ce contexte environnemental, les pesticides naturels basés notamment sur les huiles essentielles, représentent une alternative intéressante

pour la protection des cultures contre les insectes mais également contre les adventices et les champignons (**Isman, 2000 ; Dayan et al., 2009**). Les modes d'application sont très variés soit par fumigation, attractif ajouté aux pièges à phéromones, répulsif ou par contact (**Regnault-Roger et Hamraoui, 1995**). Outre leurs activités biologiques, les huiles essentielles présentent d'autres caractéristiques qui en font des produits adaptés dans la lutte contre les nuisibles. Parmi celles-ci, on peut citer :

- leur prix faible et approvisionnement assurés par une production mondiale importante pour de nombreuses huiles essentielles ;
- leurs multiples modes et sites d'action sur les insectes ;
- leur faible toxicité pour les mammifères (à quelques rares exceptions près) ;
- leur faible persistance dans l'environnement due à leur volatilité (temps de demi-vie en extérieur < 24 heures sur les surfaces, dans les sols ou l'eau) (**Isman et al., 2010**).

I.9-Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentées généralement comme « sans danger » mais sont aussi des composés puissants (**Degryse et al., 2008**). Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie (**Piochon, 2008**). Par leur composition chimique complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation abusive ou aléatoire autonome qui est souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique (**Bruneton, 1999**).

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) (**Smith et al., 2000**) ou photo-toxique (huiles de *Citrus* contenant des furocoumarines) (**Naganuma et al., 1985**). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux) (**Franchomme et Pénoel, 1990**). Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers (**Homburger et Boger, 1968**). C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le saffrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracuncululus*), la β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol (**Guba, 2001**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aigue faible ou très faible par voie orale : une DL_{50} comprise entre 2 et 5 g/Kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle,...etc) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/Kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver,...etc). D'autres ont une DL_{50} inférieure à 1 g/Kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/Kg), l'essence de moutarde (0.34 g/Kg), les essences d'origan et de la sarriette (1.37 g/Kg), les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysope (1.5 ml/Kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**Bruneton, 1999**), reste à savoir si dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (**Bernadet, 2000**).

I.10- Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales (**Sallé, 2004**). En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (les flavonoïdes ou les tanins, par exemple), du rendement en l'huile et de la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Crespo et al., 1991 ; Hellal, 2011**).

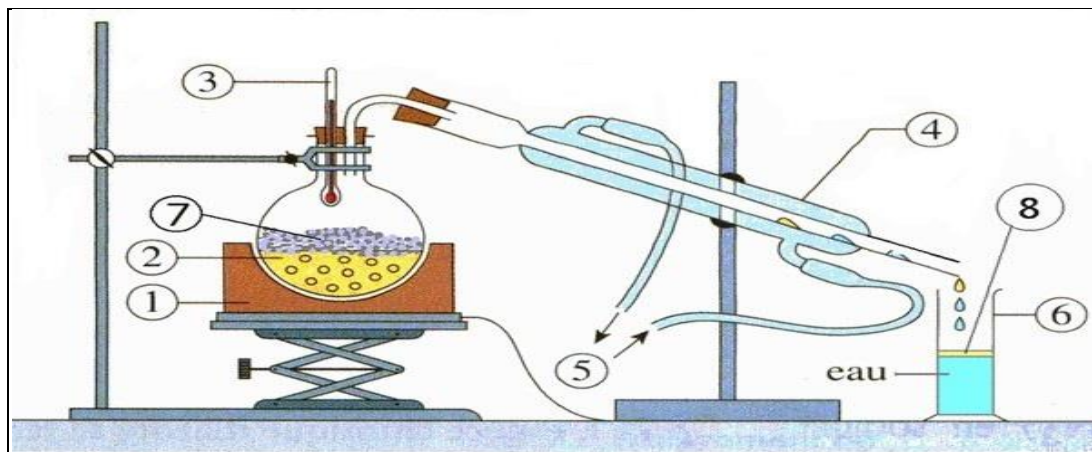
I.10.1- Distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est la plus ancienne et également la plus utilisée (**Franchomme et al., 1990 ; Bruneton, 1999**). La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (**Franchomme et al., 1990**). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion (**Piochon, 2008**).

I.10.1.1- Hydrodistillation

L'hydrodistillation (water distillation) est la méthode la plus simple et de ce fait, la plus anciennement utilisée (**figure n°5**). Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple

différence de densité. Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Bruneton, 1999 ; Lucchesi, 2005).



1- Chauffe ballon ; 2- Ballon ; 3- Thermomètre ; 4- Réfrigérant ; 5- Entrée et sortie d'eau ; 6- Erlenmeyer ; 7- Matière à extraire l'essence ; 8- Couche d'huile essentielle.

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

I.10.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction (steam distillation) (figure n°6), le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau, il est placé sur une grillé perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. Cette dernière 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 ; le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme *et al.*, 1990 ; Richard, 1992 ; Lucchesi, 2005).

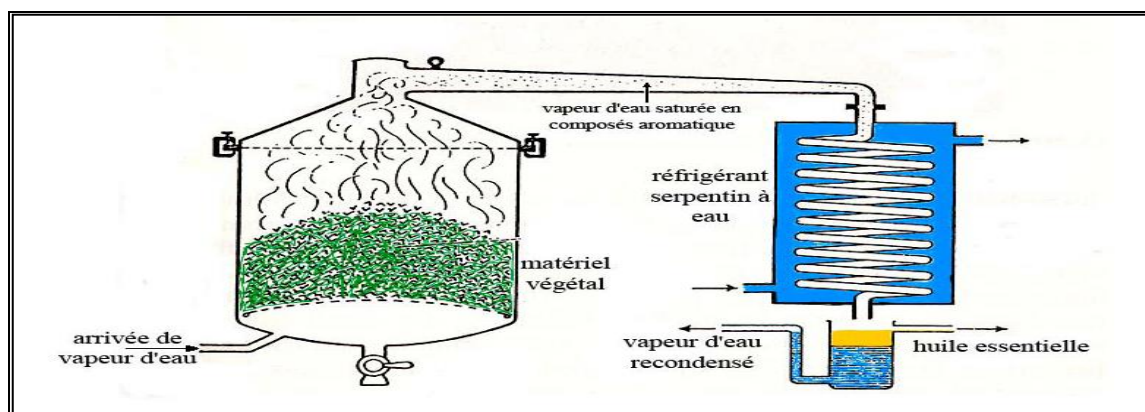


Figure n°6 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau (Lucchesi, 2005)

I.10.1.3- Hydrodiffusion

Cette technique relativement récente, est une variante de l'entraînement à la vapeur. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite (0,02 – 0,15 bar), la vapeur d'eau à travers la matière végétale (**figure n° 7**). L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale « essence de percolation » (**Franchomme *et al.*, 1990 ; Richard, 1992 ; Lucchesi, 2005**).

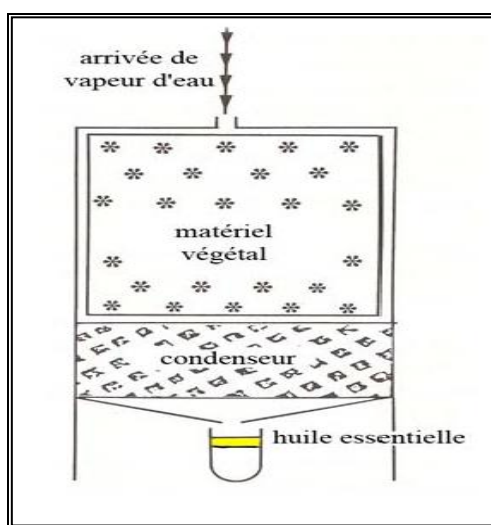


Figure n° 7 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Lucchesi, 2005)

I.10.1.4- Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés mais ne s'applique qu'aux agrumes. Le principe de ce traitement mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en cellules sécrétrices en essences. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau puis est isolée par décantation (**Dugo et Di Giacomo, 2002 ; Roux, 2008**).

I.10.1.5- Extraction par solvants organiques

Dans ce procédé, l'extrait de plantes est obtenu au moyen de solvants non aqueux. Les plus utilisés sont l'hexane, le cyclohexane et l'éthanol, moins fréquemment, le dichlorométhane et l'acétone (**Dapkevicius *et al.*, 1998 ; Kim et Lee, 2002 ; Hernandez-Ochoa, 2005**). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de

composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (**Richard, 1992**). Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu » (**Hernandez-Ochoa, 2005 ; Proust, 2006**). L'emploi de cette méthode est restrictif, ceci se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité ainsi que, la réglementation liée à la protection de l'environnement (**Lagunez Rivera, 2006**).

I.10.1.6- Enfleurage

Cette technique est employée en parfumerie, elle est réservée aux fleurs ou aux organes les plus fragiles des plantes, elle consiste à pratiquer une diffusion des composés odorants dans une masse de matière grasse animale. Si le procédé se fait à froid, il s'agit d'une extraction par enfleurage, si par contre, il se pratique à chaud, les graisses étant fondues au bain-marie (50°C – 70°C), il s'agit alors d'une digestion (**Besombes, 2008**).

Ce procédé classique et ancien n'est plus utilisé ; d'une part, la diffusion est lente et d'autre part, il est nécessaire de renouveler plusieurs fois les pétales pour obtenir des pommades concentrées. De plus, les composés odorants extraits doivent être séparés de leur charge grasse (**Bruneton, 1993**).

I.10.1.7- Extraction assistée par micro-ondes

Cette technique combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils peuvent être recueillis par un solvant ou entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante (**figure n°8**). Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation (**Meredith, 1998 ; Hemwimon et al., 2007**).

L'extraction assistée par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée étant donné les avantages qu'elle présente : technologie verte, économie d'énergie (température plus basse) et de temps (dix fois plus rapide), dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées, mais aussi, utilisation de petites quantités de solvant et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al., 2007 ; Lucchesi et al., 2004 ; Olivero-Verbel et al., 2010**).

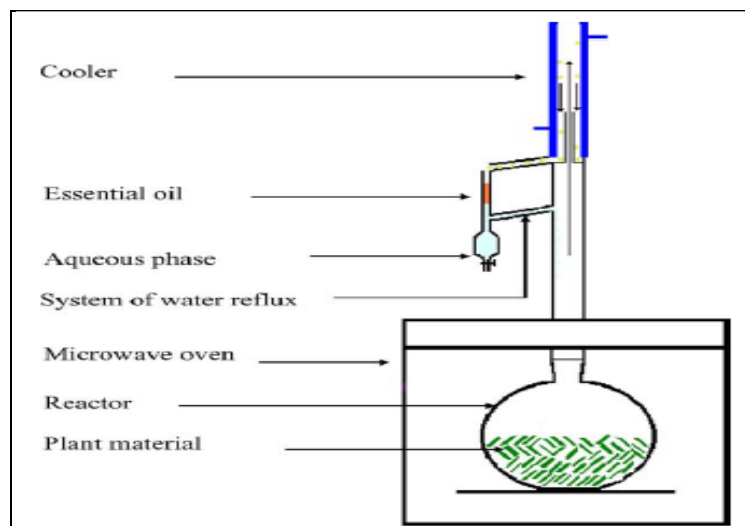


Figure n°8 : Schéma du principe de la technique d'extraction assistée par micro-ondes (Lucchesi *et al.*, 2004)

I.10.1.8- Extraction par fluide à l'état supercritique

Ce procédé utilise généralement le dioxyde de carbone (CO_2) qui au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars et $T= 31,1^\circ\text{C}$), possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (**Khajeh *et al.*, 2005 ; Piochon, 2008**). Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente (**figure n°9**) (**Lagunez Rivera, 2006**).

En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi, obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatiles. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est de 60°C et 60 bars (**Richard, 1992**). D'autres travaux de recherche montrent la possibilité d'utiliser l'eau comme un solvant alternatif au CO_2 (**Ozel *et al.*, 2003 ; Deng *et al.*, 2005**). Toutefois, son utilisation est relativement limitée, ceci est dû à ses conditions d'obtention délicates ($P= 221$ bars et $T= 374^\circ\text{C}$) et à sa nature corrosive (**Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007**).

L'avantage de cette technique d'extraction est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, elle permet d'éviter la dégradation des composés thermosensibles offrant ainsi une huile de qualité supérieure. A ces différents avantages, s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité du CO_2 (**Carlson *et al.*,**

2001 ; Lagunez Rivera, 2006 ; Wood *et al.*, 2006). L'unique point faible de cette méthode est le coût très élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars (Pellerin, 1991 ; Lagunez Rivera, 2006).

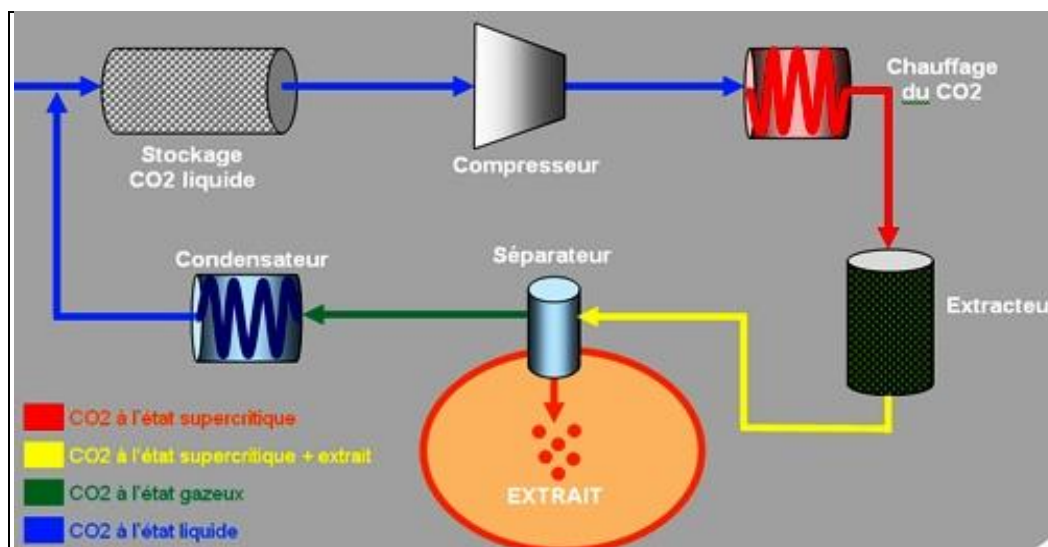


Figure n°9 : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007)

I.11- Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activités tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur d'activité, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante (Cavalli, 2002). En effet, ces dernières doivent répondre à des caractéristiques bien déterminées. Ces critères sont définis dans des normes internationales ISO (International Organisation for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation), ainsi, sont contrôlées les propriétés organoleptiques et physiques telles que la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters. La meilleure carte d'identité qualitative et quantitative d'une huile essentielle reste cependant son profil chromatographique réalisé en chromatographie en phase gazeuse, même si d'autres techniques alternatives sont utilisées. En effet, malgré les importantes innovations instrumentales réalisées ces dernières années, la détection de tous les constituants d'une huile essentielle reste une tâche extrêmement difficile qui nécessite souvent l'emploi de plusieurs techniques analytiques complémentaires (Fillatre, 2011).

I.11.1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer et d'analyser les molécules organiques d'un mélange complexe. Elle s'applique principalement aux molécules aisément vaporisables et thermiquement stables. Elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Arpino et al., 1995**). Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur (**figure n°10**) (**Bouchonnet et Libong, 2002**).

L'échantillon est vaporisé et injecté à haute température en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (hélium, azote, argon ou hydrogène) (**Skoog et al., 2003**). La colonne peut être de deux types : colonne remplie ou colonne capillaire. Dans le cas des huiles essentielles, les colonnes capillaires semblent plus adaptées ; elles sont en métal, en verre ou plus souvent en silice fondue. Les substances traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire (**Hellal, 2011**). Elles sont séparées en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire ou de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et elles sont donc séparées en fonction du temps. Dès qu'elles arrivent à l'extrémité de la colonne, elles sont détectées et enregistrées (**Besombes, 2008**). Les détecteurs utilisés sont généralement des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ou à conductivité thermique (TCD) (**Fillatre, 2011**).

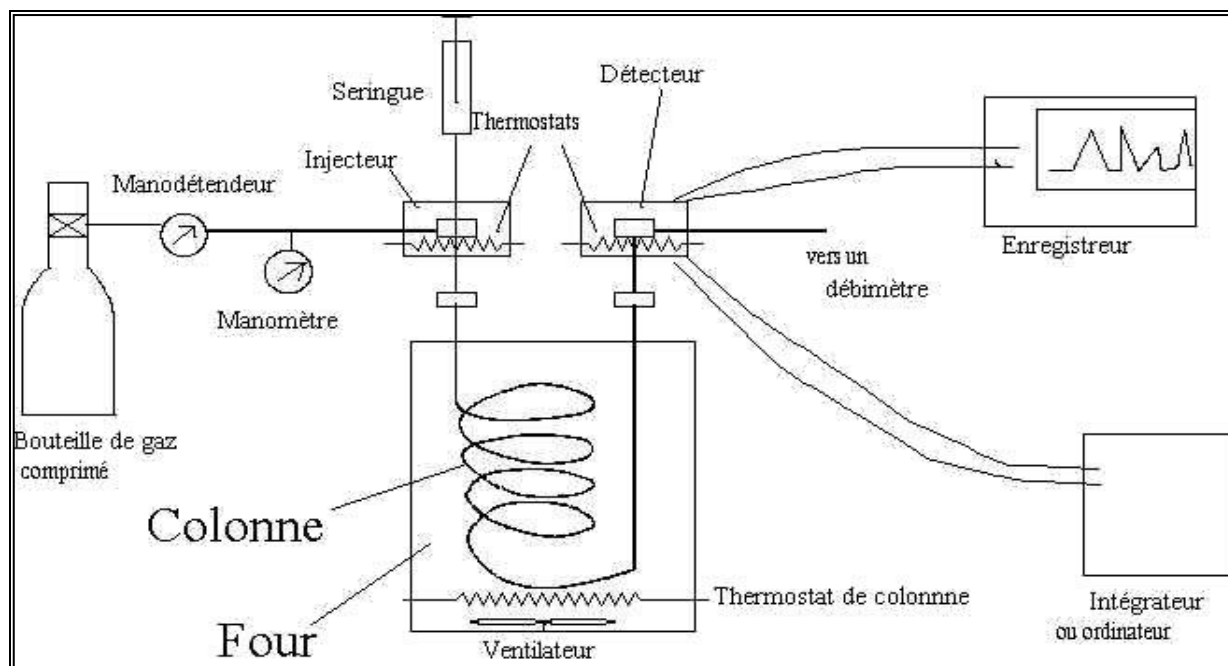


Figure n°10 : Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse (**Besombes, 2008**)

I.11.2- Spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de cet appareil, tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur (**figure n°11**) (**Bouchonnet *et al.*, 1999**). La source est la partie où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. Elle doit être maintenue à température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (**Pradeau et Cohen, 1992 ; Bouchonnet et Libong, 2002**). La technique d'ionisation principalement utilisée dans l'analyse des huiles essentielles est l'ionisation électronique (IE) qui permet d'obtenir des spectres de masses caractéristiques de la molécule avec un nombre important de fragments. L'ionisation chimique (IC), technique d'ionisation plus douce et complémentaire de l'IE, est également employée pour accéder à d'autres informations spectrales, notamment l'observation du pic moléculaire parfois absent des spectres obtenus en IE (**Fillatre, 2011**). Les ions produits sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil (**Besombes, 2008**). Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle », le « piège à ion » ou la « trappe ionique » (**Belaqziz, 2007**). L'analyseur a pour rôle de séparer les ions produits par la source en fonction de leur ration « masse/charge » (**Besombes, 2008**). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable (**Hellal, 2011**).

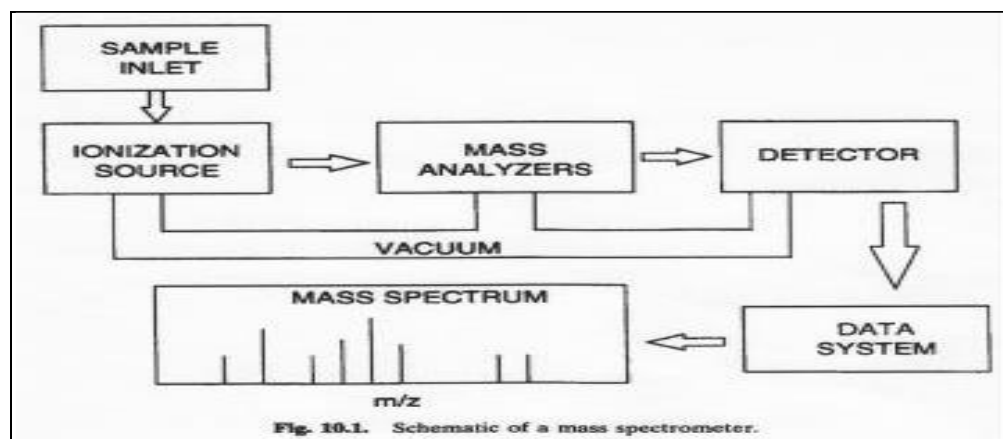


Figure n°11 : Principe de la spectrométrie de masse (Mc Nair et Miller, 1997)

I.11.3- Couplage CPG/SM

Dans le domaine particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est aujourd'hui la technique de référence. En effet, l'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse très performant (**figure n°12**) (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996 ; Hellal, 2011**).

L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nanogramme et la détection par fragmentométrie est possible jusqu'au picogramme. De plus, le couplage permet de connaître très exactement la composition chimique des différents constituants d'un mélange complexe et la recherche d'éventuelles traces de produits indésirables tels que des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Renata *et al.*, 2006 ; Baser et Buchbauer, 2010).

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est la grande différence de pression. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé, ainsi, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles (Cavalli, 2002). Le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (Bouchonnet et Libong, 2002).

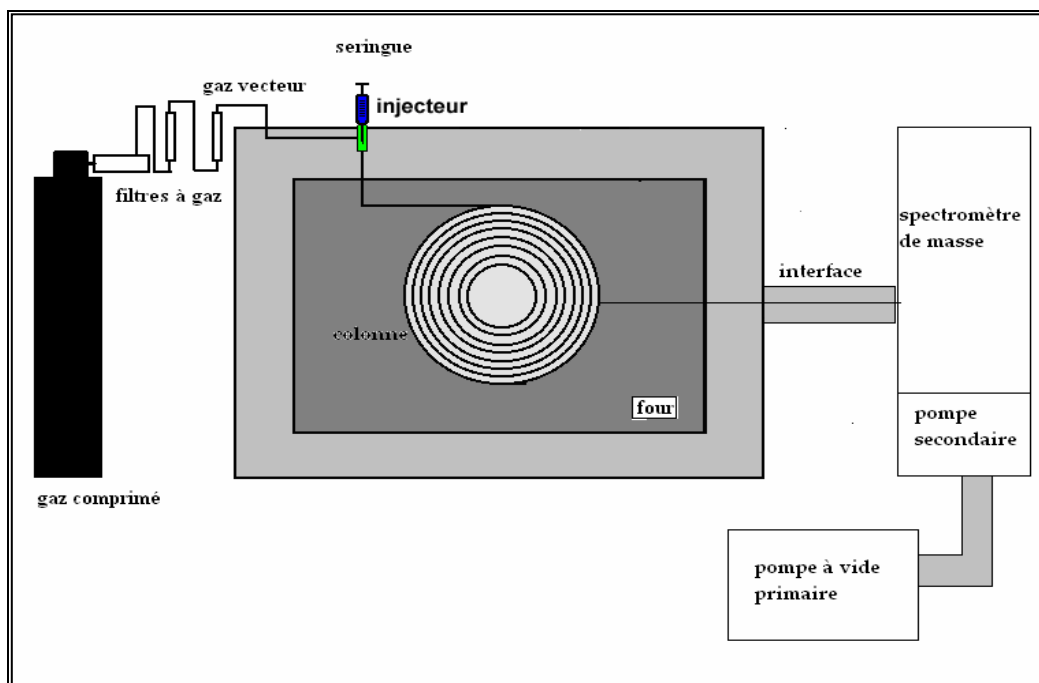


Figure n°12 : Schéma du principe du couplage CPG/SM (Belaqziz, 2007)

Chapitre II

Espèces végétales étudiées

II.1- La famille des Cupressacées

La famille des Cupressacées (*Cupressaceae*) appelée également cupressinées, est une famille de plantes gymnospermes très ancienne dont on trouve des traces dans les couches datant du Jurassique. Elle a été autrefois divisée entre les Cupressacées *sensu stricto* (un genre avec des feuilles opposées dans quatre rangs) et les Taxodiacees (feuilles alternées). Elle représente une des familles les plus vastes et les plus importantes regroupant 142 espèces réparties dans 30 genres (dont 17 sont monotypiques), parmi ces derniers, *Cupressus* (cyprès), *Juniperus* et *Thuja*, sont les plus représentatifs (Achak, 2006 ; Singh, 2006).

La famille des Cupressacées est divisée en 7 sous-familles (Farjon, 2005 ; Singh, 2006):

- *Cupressoideae* : *Thuja*, *Thujopsis*, *Chamaecyparis*, *Fokienia*, *Calocedrus*, *Tetraclinis*, *Microbiota*, *Platycladus*, *Callitropsis*, *Cupressus*, *Juniperus* ;
- *Cunninghamioideae* : *Cunninghamia* ;
- *Athrotaxidoideae* : *Athrotaxis* ;
- *Taiwanioideae* : *Taiwania* ;
- *Sequoioidea* : *Sequoia*, *Sequoiadendron*, *Metasequoia* ;
- *Taxodioideae* : *Taxodium*, *Glyptostrobus*, *Cryptomeria* ;
- *Callitroideae* : *Callitris*, *Actinostrobus*, *Neocallitropsis*, *Widdringtonia*, *Diselma*, *Fitzroya*, *Austrocedrus*, *Libocedrus*, *Pilgerodendron*, *Papuacedrus*.

Les Cupressacées sont des arbres ou arbustes généralement résineux et aromatiques. Ils sont monoïques et rarement dioïques. Leur écorce est fibreuse et sillonnée (lisse ou exfoliante chez certaines espèces de *Cupressus* et de *Juniperus*). Leurs feuilles, généralement en forme d'écaille, sont disposées en spirale ou en paires opposées ou verticillées par 3 à 4. Leurs cônes sont boisés, coriaces et parfois charnus et ressemblant à des baies (cas du *Juniperus*), portant un à plusieurs ovules et parvenant à maturité au bout de 1 à 2 ans (Spencer, 1995 ; Singh, 2006).

Les Cupressacées sont les plus répandus de toutes les familles de conifères, pouvant se trouver dans divers habitats et ce, sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (Sofiev et Bergmann, 2012). Tous les genres autres que *Juniperus* montrent des distributions fortement relictuelles. La majeure partie de la diversité générique est dans l'hémisphère sud, mais le plus grand genre, *Juniperus*, est principalement nord-tempéré (van Royen, 1979 ; Silba, 1986).

II.1.1- Le genre *Juniperus*

Le genre *Juniperus* appartient à la tribu *Junipereae* et à la sous-famille *Cupressoideae* (Vidaković et Soljan, 1991). Il comprend approximativement 75 espèces d'arbustes ou d'arbres persistants réparties en 3 sections : *Caryocedrus* (une seule espèce ; *J. drupaceae* Labill.), *Juniperus* appelé également *Oxycedrus* (14 espèces) et *Sabina* (près de 60 espèces) (Adams, 2014). Il est très répandu dans les régions subtropicales et tempérées de l'hémisphère nord à l'exception de certaines de ses espèces qui s'étendent jusqu'en hémisphère sud notamment en Afrique du Nord et subsaharienne (PROTA, 2008; Mao *et al.*, 2010). En Algérie, cinq espèces indigènes sont énumérées, à savoir, *J. communis*, *J. phoenicea*, *J. oxycedrus*, *J. sabina* et *J. thurifera* (Quezel et Santa, 1963). Ce genre est le plus diversifié de la famille *Cupressaceae* et le deuxième taxon le plus varié en conifères après le genre *Pinus* (Debazac, 1991).

II.1.2- Le genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea* L.)

II.1.2.1- Description morphologique

- Allure générale

Juniperus phoenicea est un arbrisseau touffu ou arbuste dressé de 1 à 8 mètres, pouvant cependant atteindre 10 mètres de hauteur, monoïque, assez rarement dioïque à feuillage persistant et aromatique (Benabid, 2000; Huguet, 2008; Rameau *et al.*, 2008). Il est de forme pyramidale et d'un port buissonnant arrondi (figure n°13), possédant un tronc ordinairement grêle et court, atteignant 2 mètres de circonférence mais aussi, un système racinaire profond, une écorce d'un brun rougeâtre ou grisâtre épaisse et gerçurée, des rameaux fins et arrondis portant des bourgeons nus et des ramilles cylindriques (Le Floc'h, 1983; Ait Youssef, 2006 ; Rameau *et al.*, 2008).

II.1.2.2- Principales caractéristiques botaniques

- Feuilles

Les feuilles sont toutes ou presque squamiformes (de 0.7 à 1 mm), ovales ou rhomboïdales, obtuses, convexes, sillonnées sur le dos, glanduleuses et de couleur vert foncé (figure n°14) (Varlet, 1992 ; Jaume Saint-Hilaire ; 2010 ; Chazel et Chazel, 2012). Elles sont non articulées, groupées par trois et étroitement imbriquées les unes sur les autres sur 4 ou 6 rangées faisant corps avec le rameau (Varlet, 2008).

- **Fleurs**

Les fleurs mâles et les fleurs femelles sont souvent réunies sur les mêmes pieds (rarement sur des individus différents) (**figure n°14**). Les premières forment de très nombreux petits chatons ovales ou arrondis, munis d'écaillés pédicellées, portés sur de courts pédoncules feuillés et disposés latéralement le long des rameaux. Les fleurs femelles sont beaucoup moins nombreuses, leurs écailles sont épaisses, aiguës et disposées sur 4 rangs (**Brochant de Villers et al., 2008**). La floraison s'étend de février à avril et finit par produire de fausses baies sphériques rouge sombre à maturité (**Chazel et Chazel, 2012**).

- **Fruits**

Les fruits, improprement qualifiés de baies, sont d'abord de couleur verte virant au brun rouge luisant à maturité (au bout de 2 ans), de forme globuleuse et charnue, d'un diamètre de 7 à 10 mm, à surface irrégulière (**figure n°15**) (**Brochant de Villers et al., 2008 ; Huguet, 2008 ; Varlet, 2008**). Leur chair est ferme, sèche, fibreuse, jaune teinté de vert puis de brun, à odeur forte et contenant de 4 à 9 graines ovales, aux extrémités aiguës avec une enveloppe dure (**Seigue, 1985 ; Varlet, 2008**). La période de fructaison a lieu de septembre à décembre (**Varlet, 2008**).



**Figure n°13 : Aspect du genévrier de Phénicie
(Achak, 2006)**



Figure n°14 : Fleurs et feuilles de *J. phoenicea* (Bouilet, 2007)



Figure n°15 : Feuilles et fruits de *J. phoenicea* (Nedjimi *et al.*, 2015)

II.1.2.3- Taxonomie

Juniperus phoenicea appartient à la famille des Cupressacées, tribu des junipérées et du genre *Juniperus* (Teibi, 1992). Deux variétés sont connues pour cette espèce: *J. phoenicea* var. *phoenicea* (les graines des cônes sont globuleuses) et *J. phoenicea* var. *turbinata* (les graines des cônes sont turbines) (Achak, 2006).

La classification du genévrier de Phénicie est la suivante (Teibi, 1992 ; Adams, 2004) :

Règne : *Plantae*

Division : *Pinophyta*

Classe : *Pinopsida*

Ordre : *Pinales*

Famille : *Cupressaceae*

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus phoenicea*

Autres noms : Genévrier rouge, Genévrier de Lycie, Araâr (en Arabe), Cade endormi.

Les provençaux l'appellent « morven » ou genévrier à fruits rouges.

L'étiquette *phoenicea* vient du latin *phoenicus* qui signifie rouge éclatant ou rouge pourpre qui décrit la couleur des baies (Rameau *et al.*, 2008).

II.1.2.4- Habitat

Juniperus phoenicea est une espèce pionnière des climats méso- et thermo-méditerranéens (Mazzoleni *et al.*, 2004), présente sur les sols rocaillieux, dans les rivages, les pinèdes, les maquis, les garrigues calcaires, sur les grandes parois des falaises et sur les sommets rocheux (Ghrabi, 2001 ; Varlet, 2008 ; Yaniv et Dudai, 2014). Il se caractérise par sa grande

capacité à se développer et à s'adapter dans des environnements où les conditions écologiques sont difficiles (aridité, vent et pression anthropique, par exemple) (Benabid, 2000 ; Aafi, 2003; Rameau *et al.*, 2008). Il est également indifférent au sol, supporte l'argile, les sables, les sols légèrement salés, calcaires ou dolomitiques, les marnes ou encore, les sols volcaniques (Seigue, 1985). Il paraît se plaire principalement dans les sols meubles et siliceux et il convient très bien pour la fixation des dunes (Mathieu, 2008).

L'espèce est généralement associée à *Pinus halepensis*, *Pinus brutia*, *Quercus ilex*, *Pistacia lentiscus*, *Cistus* spp., *Olea europaea*, *Lavandula* spp., *Artemisia herba-alba* et de nombreuses autres espèces (Yaniv et Dudai, 2014).

II.1.2.5- Répartition géographique

II.1.2.5.1- Dans le monde

Le genévrier de Phénicie est une espèce dont l'aire de répartition est circumméditerranéenne, il se trouve aussi bien dans certaines régions du littoral que sur les basses montagnes dont l'altitude ne dépasse pas 2000 m (Ait Youssef, 2006 ; Gandini, 2006). Au niveau mondial, il se produit en Europe méridionale (sud de la France, l'est du Portugal, Espagne), en Asie tempérée et subtropicale (Turquie, Chypre, l'ouest de l'Arabie Saoudite, Israël, Jordanie), dans l'océan atlantique (îles Canaries) et en Afrique du nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie et Egypte) (figure n°16) (Seigue, 1985 ; Dakki, 2003 ; Mazur *et al.*, 2003 ; Achak *et al.*, 2009).

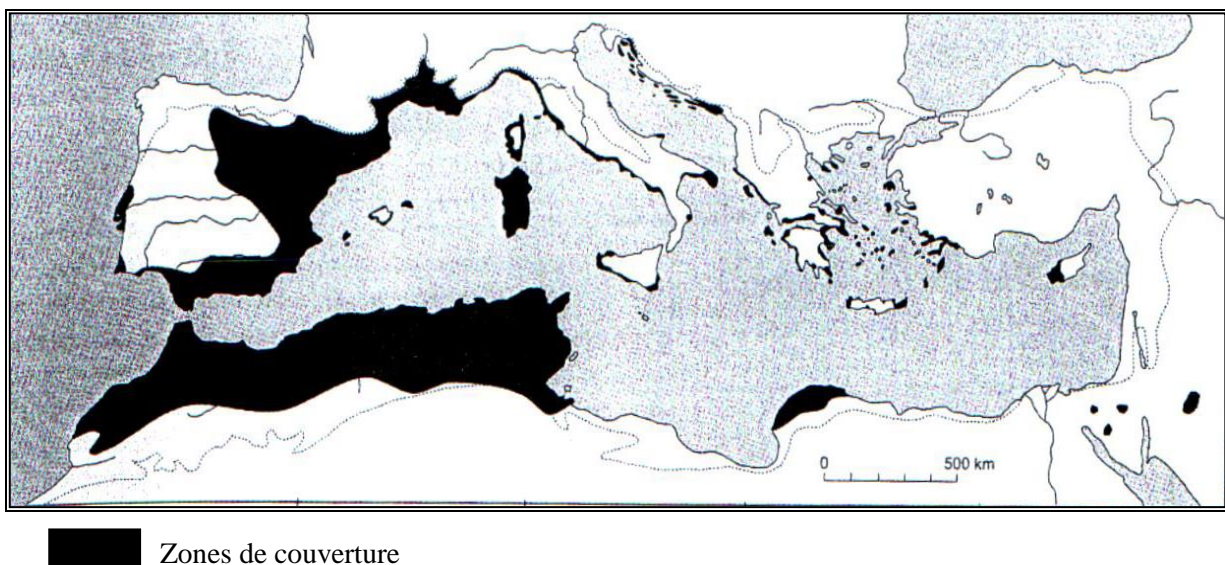


Figure n°16 : Aire de répartition des genévriers du groupe *phoenicea* en région méditerranéenne (Quezel et Medail, 2003)

II.1.2.5.2- En Algérie

Le genévrier rouge occupe une superficie estimée à 227.000 ha, soit 10% de la surface forestière algérienne (Louni, 1994). Il est commun sur l'ensemble du littoral, sur les hauts plateaux et l'Atlas saharien de l'oranais, de l'algérois et du constantinois (Ait Youssef, 2006). Il est assez rare ailleurs, on le trouve surtout sur les dunes littorales, dans les collines, sur les cotes de Barbarie et il constitue au côté du cèdre, la principale couverture végétale dans les montagnes des Aurès, notamment dans le sud de ce massif (régions de Maafa, Beni Fodhala) où il occupe une superficie de 1950 ha (Abdessamed, 1981 ; Dakki, 2003, Ait Youssef, 2006).

Il est souvent en mélange avec *Pinus halepensis*, mais c'est dans l'Atlas saharien bordant le désert, plus particulièrement à Djelfa et Bousaâda, qu'il trouve sa place en grande extension (Frank, 1986 ; Louni, 1994).

II.1.2.6- Composition chimique

La majorité des composants chimiques isolés des feuilles et des cônes (fruits) de *Juniperus phoenicea* (figure 17) sont des huiles volatiles (Angioni *et al.*, 2003 ; Cosentino *et al.*, 2003 ; El-Sawi *et al.*, 2007). En général, les huiles essentielles des espèces *Juniperus* sont composées de 85 – 95% de monoterpènes et près de 0.1 – 12% d'alcools (Angioni *et al.*, 2003).

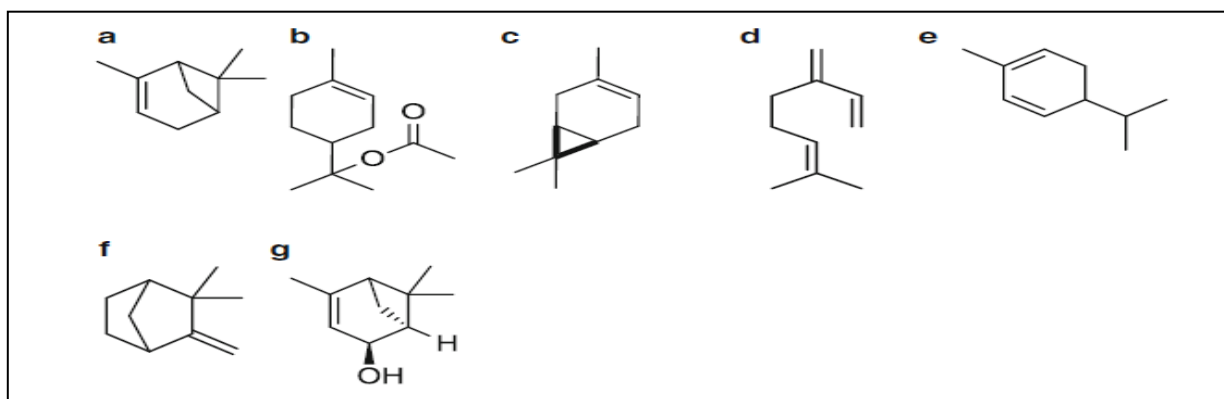
L'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* connaît une grande variation chimique, cependant, un grand nombre de travaux rapporte la prédominance de celle-ci en monoterpènes hydrocarbonés, avec le α -pinène comme constituant majeur, suivi des monoterpènes oxygénés tels que, α -terpinyl acétate, δ -3-carène, myrcène, α -phellandrène et β -phellandrène (Afifi *et al.*, 1992 ; Rezzi *et al.*, 2001 ; Angioni *et al.*, 2003 ; El-Sawi *et al.*, 2007 ; Ennajar *et al.*, 2009 ; Mazari *et al.*, 2010). L'huile essentielle des baies est composée majoritairement de monoterpènes, suivi des sesquiterpènes, le α -pinène étant le constituant caractéristique. Camphène, δ -3-carène et *trans*-verbénol sont également présents à des taux variables (Delitala, 1980 ; Lawrence, 1989 ; Rezzi *et al.*, 2001).

Des études phytochimiques ont montré que l'espèce contient également de la résine, des acides gras, des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols et triterpènes (Medini *et al.*, 2013; Alzand *et al.*, 2014; El-Sawi *et al.*, 2014) et des glucides, notamment, trois phenylpropanes glycosides (juniperosides, rosarin et skimmin) et deux dérivés furanones glucosides (psydrin et phoenicéine) (Aboul-Ela *et al.*, 2005). La présence de phoenicerosides

(un pseudo dimère des deux furanones précédents) et de dérivés phenylisopropanes a aussi été démontrée par certaines études (Comte *et al.*, 1996).

Seulement de faibles quantités de dérivés phénoliques sont présentes; il s'agit des Bisflavones et Lignanes (San Feliciano *et al.*, 1992 ; Comte *et al.*, 1997).

En Egypte, sept nouveaux composants diterpéniques appartenant aux groupes Labdane, Pimarane et Abietane, ont été extraits des fruits de la plante (El-Sawi et Motawe, 2008).



(a) α -pinène ; (b) α -terpinyl acétate ; (c) δ -3-carène ; (d) myrcène ; (e) α -phellandrene ; (f) camphène ; (g) *trans*-verbénol.

Figure 17 : Les principaux monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* (Yaniv et Dudai, 2014)

II.1.2.7- Usages

Le genévrier de Phénicie est très recherché pour son bois de service. Celui-ci est utilisé pour le chauffage et pour fabriquer du charbon de bois. Les feuilles sont parfois utilisées pour l'alimentation du bétail (Seigue, 1985 ; Bellakhdar, 1997). Cette espèce est l'une des plus importantes plantes médicinales du fait qu'elle soit largement employée en médecine traditionnelle (Bellakhdar, 1997). Les branches feuillées sont exploitées pour la production du goudron végétal pour traiter certains cas d'eczéma et en inhalation contre l'asthme, bronchite, maux de tête, étourdissements et pour contrôler l'arthrite (Seigue, 1985 ; Derwich *et al.*, 2010). Les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner diabète, diarrhée, rhumatisme et troubles digestifs (Seigue, 1985 ; Bellakhdar, 1997 ; Allali *et al.*, 2008). Le mélange des feuilles et des cônes est employé comme agent oral hypoglycémique (Amer *et al.*, 1994 ; Mazari *et al.*, 2010). Les feuilles séchées et réduites en poudre peuvent guérir les affections broncho-pulmonaires et agir comme agent diurétique (Bellakhdar, 1997). Les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Le Floc'h, 1983).

II.2- La famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées, anciennement appelée Labiées en raison de la corolle en deux lèvres de ses petites fleurs (**Couplan, 2000**), est l'une des familles les plus larges dans le règne végétal. Elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces (**Harley et al., 2010**) qui sont plus ou moins cosmopolites mais particulièrement répandus depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (**Judd et al., 2002**). Elle est divisée en sept sous-familles : *Ajugoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Prostantheroideae*, *Scutellarioideae*, *Symphorematoideae* et *Viticoideae* (**Harley et al., 2004**).

Les Lamiacées sont des arbustes, sous arbrisseaux ou des plantes herbacées vivaces ou annuelles, en général odorants, rarement arbres ou lianes, à tiges quadrangulaires et à feuilles simples sans stipules, opposées-décussées, rarement pinnées. Les fleurs réunies en inflorescences en cymes axillaires, sont bisexuées et zygomorphes, dotées de calices synsépales plus ou moins bilabiés et de corolles sympétales, typiquement bilabiées, longuement tubuleuses, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. Elles possèdent également quatre étamines ou parfois deux étamines et deux staminodes mais aussi, un ovaire supère à deux carpelles recoupés par une cloison et comprenant ainsi quatre loges à une graine chacune (tétrakène) (**Benabid, 2000; Simpson, 2006; Le Maout et De Jussieu, 2012**).

Un très grand nombre de genres de la famille *Lamiaceae* sont riches en huiles essentielles, ce qui leur confère une importance économique et thérapeutique mais aussi, en composés phénoliques, tannins, flavonoïdes, iridoïdes glycolysés, quinones, coumarines, terpénoïdes, saponines et dans certains cas, des pyridines et des alcaloïdes pyrrolidiniques (**Kuklinski, 2000; Naghibi et al., 2005**). Ils sont également très utilisés dans le domaine culinaire, de la parfumerie et de la cosmétique. Parmi ceux les plus cités dans la littérature : *Salvia*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus*, *Rosmarinus*, *Ocimum* et *Lavandula* (**Simpson, 2006**).

II.2.1- Le genre *Thymus*

Le genre *Thymus* appartient à la tribu *Mentheae* et à la sous-famille *Nepetoideae* (**Morales, 2002**). Il se divise selon **Jalas (1971)** en huit sections : *Micantes*, *Mastichina*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Hyphodromi* et *Serpyllum*. Il représente l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces incluses dans la famille *Lamiaceae*, regroupant entre 250 et 350 taxons de plantes sauvages (**Lawrence et Tucker, 2002 ; Morales, 2002**) répartis dans toutes les régions tempérées de l'hémisphère nord mais qui sont particulièrement fréquents dans la région méditerranéenne qui semble être le centre

de ce genre (Crespo *et al.*, 1991). Du point de vue taxonomique, *Thymus* est l'un des genres les plus complexes en raison de la présence de divers chémotypes concernant les profils d'huiles essentielles associés à plusieurs de ses espèces (Senatore, 1996 ; Napoli *et al.*, 2010).

II.2.2- Le thym commun (*Thymus vulgaris* L.)

II.2.2.1- Description morphologique

Thymus vulgaris L. est un sous-arbrisseau touffu, vivace et aromatique pouvant atteindre de 20 à 30 cm de hauteur (figure n°18). Ses tiges sont dressées, ligneuses, rameuses et tortueuses à la base et ses racines sont assez robustes (Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009; Skaria, 2007). Ses branches sont minces, denses, ramifiées, blanchâtres et courtement velues (Farrell, 1998 ; Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009), portant des feuilles persistantes de couleur vert grisâtre, subsessiles, opposées, oblongues-lancéolées à linéaires et mesurant de 3 à 12 mm de long et de 0.5 à 3 mm de large. Les marges de leurs limbes sont enroulées sur la face ventrale ce qui donne aux feuilles une forme générale d'aiguille (Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009). Les fleurs sont de petite taille (4 à 6 mm de long), de couleur blanche à rose, bilabiées, zygomorphes, regroupées par 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles et rassemblées en glomérules ovoïdes (Chazel et Chazel, 2012; Lemoine, 2005; Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009). Le calice est velu, hérissé de poils durs, vert, souvent avec des taches violettes, en forme de tube ventru à la base, mesurant de 3 à 4 mm de long. Il est formé de 5 sépales soudés en 2 lèvres inégales, celle du haut étant tridentée et celle du bas bilobée, ciliée et arquée (Tiwari et Tandon, 2004 ; Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009). La corolle est bilabée, blanchâtre à violet pâle et de taille variable (Furmanowa et Olszowska, 1992 ; Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009). Le fruit est un tétrakène brun clair à brun foncé qui renferme à maturité 4 minuscules graines (1 mm) (Teuscher *et al.*, 2005 ; Bruneton, 2009). La période de floraison de l'espèce a lieu de mai à août (Hoffman, 2003).



Figure n°18 : Aspect morphologique de *Thymus vulgaris* L.
(Fayad *et al.*, 2013).

II.2.2.2- Taxonomie

La situation botanique de l'espèce *Thymus vulgaris* L. est donnée ci-dessous (**Goetz et Ghédira, 2012**):

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : *Magnoliophytina*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris* L.

Noms vernaculaires : Thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, frigoule, barigoule, thym commun, thym cultivé et saatar ou zaatar (en arabe صعتر ou زعتر) (**Teuscher et al., 2005**).

II.2.2.3- Habitat

Thymus vulgaris est une plante typique des garrigues, qui s'accommode particulièrement des zones calcaires et rocailleuses, ne dépassant pas 2500 m d'altitude (**Pitman, 2004; Polese, 2006**). Elle préfère les sols légers, perméables, secs ou bien drainés, légèrement alcalins, constamment ensoleillés et quelque peu riches en matières organiques et en éléments minéraux fertilisants (**Rey, 1990; Small et Deutsch, 2001; Peter, 2004**). Elle ne survit pas longtemps dans un sol lourd et détrempé. Sa croissance tolère un pH allant de 4.5 à 8.0 et est possible dans n'importe quel climat ayant une température annuelle moyenne de 7 à 20°C (**Small et Deutsch, 2001; Peter, 2004**).

II.2.2.4- Répartition géographique

II.2.2.4.1- Dans le monde

Le thym est réparti entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (**Mabberley, 1997**) (**figure n°19**). Il est très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. Il se trouve également en région Macaronésienne (îles Canaries, Madère et les Açores) et en Himalaya. Il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon.

Dans le nord, il pousse en Sibérie, en Europe nordique jusqu'aux bords du Groenland (**Morales, 1997**).

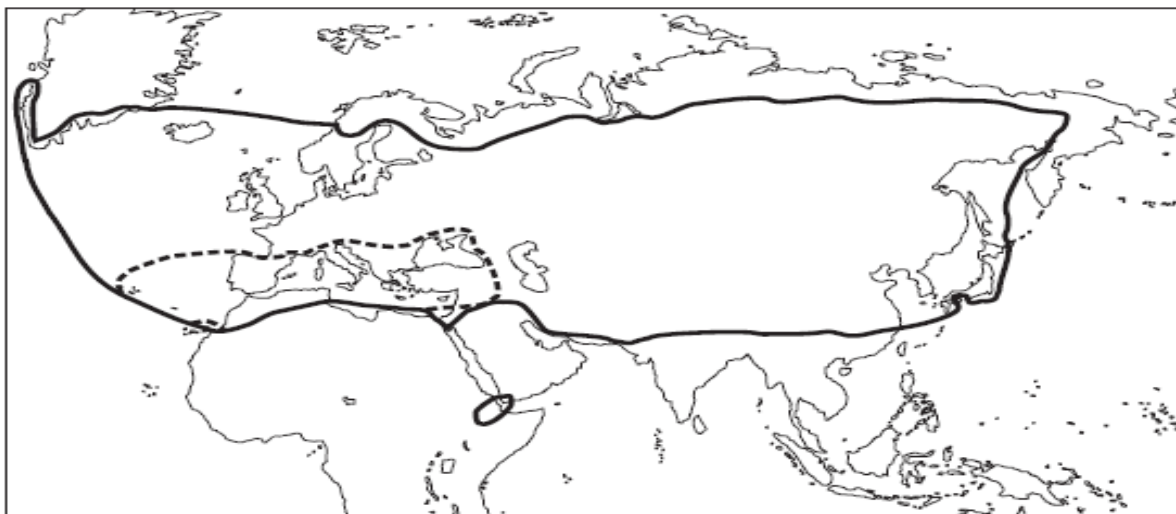


Figure n°19 : Distribution géographique du thym dans le monde (Morales, 1997).

La région de l'ouest méditerranéen est considérée comme étant le centre de l'origine du genre *Thymus* ; l'espèce *T. vulgaris* provient particulièrement du sud de l'Europe, de l'Espagne à l'Italie (**Morales, 1997; Peter, 2004**). Le thym est maintenant très cultivé au Portugal, France, Allemagne, Espagne, Italie, Algérie, Maroc, Tunisie, Egypte, Turquie, Chine, Russie, Angleterre et les Etats-Unis d'Amérique (**Wilson, 2002; Raghavan, 2006**).

II.2.2.4.2- En Algérie

Le thym est représenté par plus de 300 espèces à travers le monde dont 12 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (**Quezel et Santa, 1962**). Ces espèces sont réparties le long du territoire national, du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (**Kabouche et al., 2005**).

II.2.2.5- Composition chimique

Thymus vulgaris renferme une huile volatile de couleur pâle, jaune ou rouge, avec une odeur riche, douce, herbacée et aromatique et un goût persistant, corsé et épicé (**Farrell, 1998**). L'huile est composée d'une quantité très variable en phénols (20 – 80%) (**Díaz-Maroto et al., 2005**) ; thymol (30 – 70%) et carvacrol (3 – 15%) en sont les majeurs constituants (**Kuhn et Winston, 2008**). Elle contient également des alcools tels que linalool (4 – 6.5%) et α -terpinéol (7.8 – 8.9%) (**Skaria, 2007; Goetz et Ghédira, 2012**), des monoterpènes hydrocarbonés tels que *p*-cymène (15 – 20%) et γ -terpinène (5 – 10%). Ces deux derniers sont les précurseurs

biogénétiques du thymol et du carvacrol. D'autres monoterpènes sont également présents mais en faible quantité (0.5 – 1.5%) comme bornéol, camphre, limonène, myrcène, β -pinène, *trans*-sabinène hydrate et terpinène-4-ol (Peter, 2004). Les sesquiterpènes hydrocarbonés ne sont pas très importants dans l'huile, seul β -caryophyllène est quantitativement significatif (1 – 3%) (Peter, 2004; Wichtl, 2004). Certains constituants comme le thymol, le carvacrol et le *p*-cymène apparaissent en partie sous forme de glucosides ou de galactosides (Kitajima *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2004).

L'espèce comprend également des tanins, saponines, flavonoïdes (lutéoline, apigénine et leurs glycosides, quercitine, naringénine, eriodictyol, cirsilinéol, salvigénine, cirsimaritrine, thymonine, thymusine, taxifoline, genkwanine, sakuranétine et vicénine-2), des acides phénoliques (acide caféique, rosmarinique, labiaticque et chlorogénique), des acides terpéniques (acide ursolique et oléanolique) (Furmanowa et Olszowska, 1992; Singh, 2011; Goetz et Ghédira, 2012) mais aussi, de l'hydroxyjasmonone glucoside (Kitajima *et al.*, 2004), des acétophénone glycosides (Wang *et al.*, 1999) et des polysaccharides (Chun *et al.*, 2001).

T. vulgaris est une espèce très connue pour son polymorphisme chimique. Elle est représentée par au moins sept chémotypes différents, définis en fonction du constituant principal de son huile essentielle (figure n°20) (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013). Deux ont une structure phénolique : thymol et carvacrol et cinq ont une structure non phénolique : géraniol, α -terpinéol, thuyanol-4, linalool et 1,8-cinéole (Stahl-Biskup et Sáez, 2002; Bensouilah et Buck, 2006). Cette variabilité chimique dépend de plusieurs facteurs qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais qui peuvent aussi être d'ordres génétiques et saisonniers (stade végétale) (Loziene *et al.*, 2007).

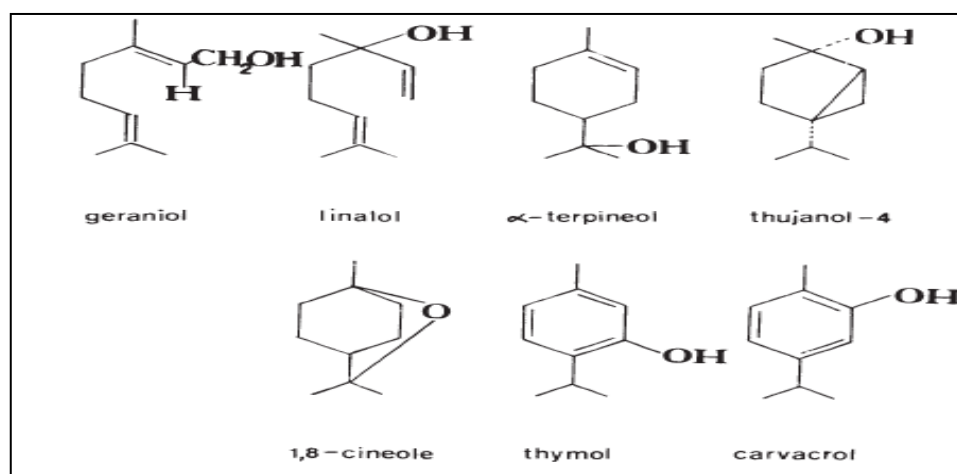


Figure n°20 : Les différents chémotypes de *Thymus vulgaris* L.
(Furmanowa et Olszowska, 1992)

II.2.2.6- Usages

Thymus vulgaris est une des plantes aromatiques les plus populaires utilisées dans le monde entier. Ces applications sont très vastes et touchent particulièrement le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (**Adwan et al., 2006**). Son huile essentielle est exploitée en aromathérapie et dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (**Tisserand, 2014**).

Le thym est consommé en tisane, condiment ou épice (**Stahl-Biskup et Sàez, 2002**). En raison de ses nombreuses propriétés ethnomédicinales, il est utilisé comme stimulant, antiseptique, sédatif, stomachique, antitussive, antispasmodique, antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, antiviral, carminatif, expectorant, athelminthique, diaphorétique et diurétique (**Johnson, 1998; Razzaghi-Abyaneh et Rai, 2013**).

En usage interne, les parties aériennes sont utilisées en décoction ou en infusion dans le traitement de la dyspepsie et autres troubles gastro-intestinaux, de la toux, des irritations de l'appareil respiratoire et des rhumes mais aussi, des infections des voies urinaires (**Hashim et Gamil, 1988; Polese, 2006**). En usage externe, elles traitent les affections liées à l'inflammation telles que les rhumatismes, les gonflements musculaires, les piqûres d'insectes et les douleurs (**Namsa et al., 2009**). Elles peuvent s'employer en gargarismes, inhalations, bains de bouche et comme additif de bain pour stimuler la circulation sanguine soulageant de ce fait, la dépression nerveuse (**Özcan et Chalchat, 2004; Polese, 2006**).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* entre dans les formulations de divers produits pharmaceutiques comme les pommades antiseptiques et cicatrisantes, les émulsions, les cataplasmes et les liniments, ainsi que, les gouttes, les sirops, les élixirs ou les gélules pour le traitement des affections des voies respiratoires ainsi que des préparations pour inhalation (**Zarzuelo et Crespo, 2002; Tiwari et Tandon, 2004**).

Chapitre III

Activités biologiques des huiles essentielles

III- Introduction

Il est connu depuis l'antiquité que les huiles essentielles présentent des propriétés médicinales nombreuses et variées telles que, les propriétés antiseptiques, antimicrobiennes, antitoxiques, antivenimeuses, anti-oxydantes, antiparasitaires, diurétiques...etc. Récemment, on leur reconnaît des propriétés anticancéreuses (**Valero et Salmerón, 2003 ; Bakkali et al., 2008**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et en particulier, avec les groupements fonctionnels des composés majoritaires : les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes et les composés terpéniques et cétoniques (**Dorman et Deans, 2000**). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important en renforçant les effets des composés principaux (**Bassolé et Juliani, 2012**). L'efficacité d'une huile essentielle dépend ainsi de sa richesse en composés phytochimiques ; plus elle est riche en substances actives, plus son activité est importante (**Zhiri, 2006**).

III.1- Activité antimicrobienne

III.1.1- Infections nosocomiales

Une infection est par définition, la pénétration dans l'organisme d'un agent étranger (bactérie, virus, champignon, parasite) capable de s'y multiplier et d'y induire des lésions pathologiques (**Delamare, 1999**). L'infection est dite nosocomiale si elle apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation et si elle était absente à l'admission à l'hôpital (ou plus généralement dans un lieu de soins), ce critère est applicable à toute infection (**Denis, 2002**).

Lorsque la situation précise n'est pas connue à l'admission, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire. Toutefois, il est recommandé d'apprécier, dans chaque cas douteux, la plausibilité du lien causal entre hospitalisation et infection (**Denis, 2002**). Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou celles survenues dans les 90 jours en cas d'infection virale ou encore, celles survenues dans les 365 jours s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant (**Denis, 2002; POPI, 2003**).

Les infections nosocomiales les plus fréquemment rencontrées sont les infections urinaires (44%), des voies respiratoires (20%), du site opératoire (15%), cutanées (11%), les

bactériémies (6%) et les infections sur cathéter vasculaire (4%) (**Jarlier, 2004; Le Loir et Gantier, 2009**).

III.1.1.1- Agents pathogènes

Les germes incriminés sont non seulement les pathogènes classiques mais aussi les germes opportunistes possédant à priori un faible potentiel pathogène qui dans certaines conditions notamment un état fragilisé du patient, induisent des conséquences cliniques majeurs (**Wenzel, 1997**). Les principaux germes responsables des infections nosocomiales sont les bactéries, représentant la cause dans environ 90% des cas (**Stobo et al., 1996**). Il s'agit plus particulièrement des bacilles Gram négatif (60%) dont *Escherichia coli* (25%) et *Pseudomonas aeruginosa* (11%) et des cocci Gram positif (30%) dont *Staphylococcus aureus* (15%) et *Enterococcus* spp. (8%). Les espèces bactériennes suscitées représentent 56% des germes isolés des infections nosocomiales (**Alfandari, 1997 ; Astagneau, 1998; Berrebi, 2009**). Les bacilles Gram positif, les cocci Gram négatif, les germes anaérobies et les mycobactéries peuvent également contribuer dans l'apparition des infections hospitalières (**Kadi et al., 1995**).

Les bactéries ne sont pas les seuls agents responsables, les champignons notamment, *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Cryptosporidium*, les virus tels que ceux de l'hépatite B et C, du HIV, d'Ebola, d'influenza, de l'herpès et de la varicelle, les virus respiratoires syncytiaux (VRS), les rotavirus, les entérovirus et les cytomégalovirus mais aussi, les parasites tels que *Giardia lamblia* et *Sarcoptes scabies*, peuvent également être des agents de transmission des infections nosocomiales (**WHO, 2002**).

III.1.1.2- Modes de transmission

III.1.1.2.1- Voie endogène

Les infections nosocomiales sont endogènes lorsque le malade s'infecte avec ses propres germes à la faveur de certains soins invasifs (actes chirurgicaux, sondage urinaire, pose et manipulation d'un cathéter, respiration artificielle...etc) et/ou en raison d'une fragilité particulière. On parle aussi d'auto-infections (**Hocquet-Berg et Py, 2006; Hureau, 1999**). Les portes d'entrée sont les lésions des muqueuses et les lésions cutanées. Les germes à potentiel infectieux sont les bactéries de la peau, de la surface des muqueuses et les germes intestinaux disséminés sur les téguments (**Hygis, 1998**).

III.1.1.2.2- Voie exogène

- **Hétéro-infection**

L'agent infectieux est transmis d'un malade à l'autre provoquant une infection dite croisée ou hétéro-infection. Il est rarement transmis par contact direct ou par voie aérienne. Le plus souvent, l'infection est manuportée ou transmise par le matériel d'exploration ou de soins. C'est le mode de contamination majeur lors de nombreuses épidémies et probablement le plus sensible aux mesures prophylactiques traditionnelles (hygiène des mains, procédures de désinfection et de stérilisation, sécurité de l'environnement) (**Hygis, 1998**).

- **Xéno-infection**

C'est une infection qui sévit sous forme endémique ou épidémique dans la population extrahospitalière. Les agents infectieux sont importés à l'hôpital par le malade, le personnel soignant, les visiteurs qui en sont atteints ou qui sont en phase d'incubation. Ils se transmettent par voie aérienne, par contact direct ou indirect et trouvent à l'hôpital des victimes particulièrement réceptives et des conditions de transmission facilitées (**Berche et al., 1991; Hygis, 1998**).

- **Exo-infection**

Cette infection est liée à des avaries techniques (stérilisation inefficace, filtre à air non stérile, eau polluée). Les matériaux à usage paramédical ou domestique sont utilisés auprès des malades ; ils sont susceptibles d'être contaminés et peuvent ainsi provoquer des infections nosocomiales souvent épidémiques (**Berche et al., 1991**).

III.1.1.2.3- Patient réceptif

Certaines pathologies entraînent une légère immunodépression, les malades à risque sont : les brûlés, les grabataires avec des escarres étendues, les polytraumatisés et les porteurs de dispositifs invasifs (assistance respiratoire, sonde urinaire, cathéters divers), les insuffisants respiratoires, les personnes âgées et surtout les nouveaux nés prématurés (**Berche et al., 1991**).

III.1.2- Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques naturelles produites par des bactéries du sol et certains champignons, dont l'activité se manifeste à très faibles doses et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard d'autres microorganismes (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Le terme « antibiotique » a été restreint aux molécules antibactériennes qui agissent soit en bloquant la prolifération des bactéries (molécules bactériostatiques), soit en les détruisant (molécules bactéricides ou bactériolytiques) (Clos, 2012). Les antibiotiques peuvent également être obtenus par synthèse chimique totale ou partielle (Demoré *et al.*, 2012).

Par les différents modes d'action qu'ils possèdent, les antibiotiques peuvent agir sur : la synthèse du peptidoglycane et donc sur la paroi cellulaire (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), les membranes (polymyxines), la synthèse protéique (macrolides et apparentés, aminosides, phénicolés, tétracyclines), la synthèse des acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés) et le métabolisme intermédiaire (sulfamides, triméthoprim) (Demoré *et al.*, 2012).

III.1.3- La résistance bactérienne aux antibiotiques

Une souche est dite résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration *in vivo* (Garnier et Jarlier, 1996). Certaines bactéries sont résistantes à des antibiotiques de manière innée. On parle de résistance naturelle ou intrinsèque. Celle-ci est propre aux souches d'une même espèce bactérienne. Elle est due à la présence de gènes chromosomiques communs à toutes les souches et est stable et transmissible à la descendance. Elle détermine les phénotypes sauvages des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques (Mainardi *et al.*, 1996; Opal *et al.*, 2000).

La résistance naturelle repose en général sur l'inaccessibilité de l'antibiotique à la cible due à des particularités structurales que peut présenter l'espèce bactérienne visée ou, sur l'absence de la cible au sein de l'espèce. C'est le cas des bacilles Gram négatifs, notamment, les entérobactéries et l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, qui présentent une faible perméabilité aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (macrolides) ou encore, des mycoplasmes, bactéries dépourvues de paroi et résistantes aux bêta-lactames dont le mode d'action consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (Chaslus-Dancla *et al.*, 2002; Normak et Normak, 2002). Certaines bactéries peuvent produire des enzymes capables de détruire des antibiotiques. C'est le cas de certaines entérobactéries (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp.,...etc) qui produisent naturellement des bêta-lactamases (Livermore, 1995).

A l'opposé de la résistance naturelle, la résistance acquise désigne l'acquisition, suite à l'emploi d'antibiotiques, d'une résistance pour une souche originellement sensible. Elle ne concerne que quelques souches d'une même espèce mais peut s'étendre à d'autres bactéries

(**Calcagno et Lacroix, 2011**). Cette résistance peut provenir par une mutation chromosomique (soit dans un gène de régulation, de production d'enzymes par exemple, soit dans un gène de structure d'une enzyme) (**Mainardi et al., 1996**) ou par l'acquisition de matériel génétique étranger par le biais de plasmides, de bactériophages ou de transposons (**Davies, 1997**). On parle de transfert horizontal de gènes de résistance et les mécanismes utilisés sont la conjugaison (transfert de plasmide d'une bactérie à une autre qui peut être d'espèce différente), la transduction (avec un bactériophage comme vecteur) et la transformation (capture d'ADN par la bactérie) (**Baudry et Brezellec, 2006**).

L'émergence des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (BMR : bactéries multirésistantes) n'est pas un phénomène nouveau. De plus, la fréquence de leur apparition est en augmentation (**Arias et Murray, 2012; Coates, 2012**). Celle-ci est le plus souvent conditionnée par une utilisation accrue et répétée des antibiotiques, ce qui génère une pression de sélection de ces molécules tendant à favoriser les mutations et les échanges plasmidiques entraînant ainsi, la survie des bactéries résistantes. De plus, l'utilisation inappropriée et incontrôlée des antibiotiques, y compris l'administration de doses sous-optimales, une durée de traitement insuffisante et un mauvais diagnostic conduisant à un choix inapproprié du médicament peuvent contribuer à l'amplification de la résistance (**WHO, 2002**).

Ce phénomène de multirésistance peut concerner les infections communautaires mais se concentre surtout sur les infections nosocomiales, les BMR étant mises en cause dans 20 à 30% des cas (**CCLIN, 2007; Le Loir et Gantier, 2009**), ce qui constitue un réel problème de santé publique de par leur impact sur la morbidité et la mortalité des patients infectés, sur la thérapeutique (limitation des molécules efficaces) et sur le coût de prise en charge (durée d'hospitalisation, examens de laboratoire et antibiotiques) (**Zohoun et al., 2010**). Toutefois, d'autres agents antimicrobiens peuvent être utilisés comme une alternative aux antibiotiques, c'est le cas des substances d'origine végétale dont, les huiles essentielles qui représentent une source prometteuse (**Janssen et al., 1987 ; Kalemba et Kunicka, 2003**). D'excellents résultats ont d'ailleurs pu être obtenus contre les BMR telles que *Staphylococcus aureus* qui est résistante à la méthicilline (**Warnke et al., 2009 ; Fadli et al., 2011**).

III.1.4- Les huiles essentielles comme agents antibactériens

Les huiles essentielles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, ces dernières paraissent moins sensibles à leur action que les bactéries Gram positives. Ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**). Il existe cependant quelques exceptions. En effet, *Aeromonas hydrophila* (**Wan et al., 1998**) et *Campylobacter jejuni* (**Wannissorn et al., 2005**) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie Gram négative reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins *Pseudomonas aeruginosa* (**Dorman et Deans, 2000**).

Concernant les bactéries Gram positives, les huiles essentielles telles que celles de *Corydothymus capitatus* et de *Thymus vulgaris thymoliferum* témoignent d'une activité antibactérienne intéressante. En effet, *Listeria monocytogenes*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à ces deux huiles (**Bouhdid et al., 2006**).

La croissance des bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (**May et al., 2000 ; Tohidpour et al., 2010**) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (**Fisher et Phillips, 2009**).

Des travaux antérieurs sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont montré qu'elle possédait un effet inhibiteur considérable sur les BMR telles que *P. aeruginosa* (souche résistante à 19 antibiotiques) (**Nascimento et al., 2000**), la souche *Enterococcus faecium* isolée des urines (résistante à 8 antibiotiques) et des ulcères (résistante à 9 antibiotiques) (**Sienkiewicz, 2012**) mais aussi, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et *Bacillus subtilis* (**Bozin et al., 2006**). De même, celle de *Juniperus phoenicea* a été rapportée comme étant active contre un large spectre de bactéries dont certaines BMR telles que : *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (**Ennajjar et al., 2010**).

La nature antibactérienne des huiles essentielles est principalement due à leur fort contenu en composés phénoliques, à savoir, le thymol, l'eugénol et le carvacrol. Ce dernier est le plus actif de tous (**Pauli, 2001 ; Zhiri, 2006 ; Kaloustian et al., 2008**), suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, linalool, thujanol, myrcénol, pipéritol et terpinéol), des aldéhydes (néral et géraniol) et des monoterpènes (α -pinène, β -pinène, p-cymène et γ -terpinène...etc) (**Daferera et al., 2000 ; Baranauskiene et al., 2003 ; Burt, 2004 ; Zhiri, 2006**).

III.1.4.1- Mode d'action

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Burt, 2004**). Compte-tenu de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Bajpai et Kang, 2010**). La principale caractéristique des huiles essentielles est attribuée à l'hydrophobicité de certains de leurs composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en provoquant une déstabilisation de sa structure et en augmentant sa perméabilité (**Souza et al., 2006**). Ces modifications entraînent des pertes anormales d'ions et de composés intracellulaires et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson et Parish, 1989 ; Ultee et al., 2002**). Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées ci-dessous (**figure n°21**).

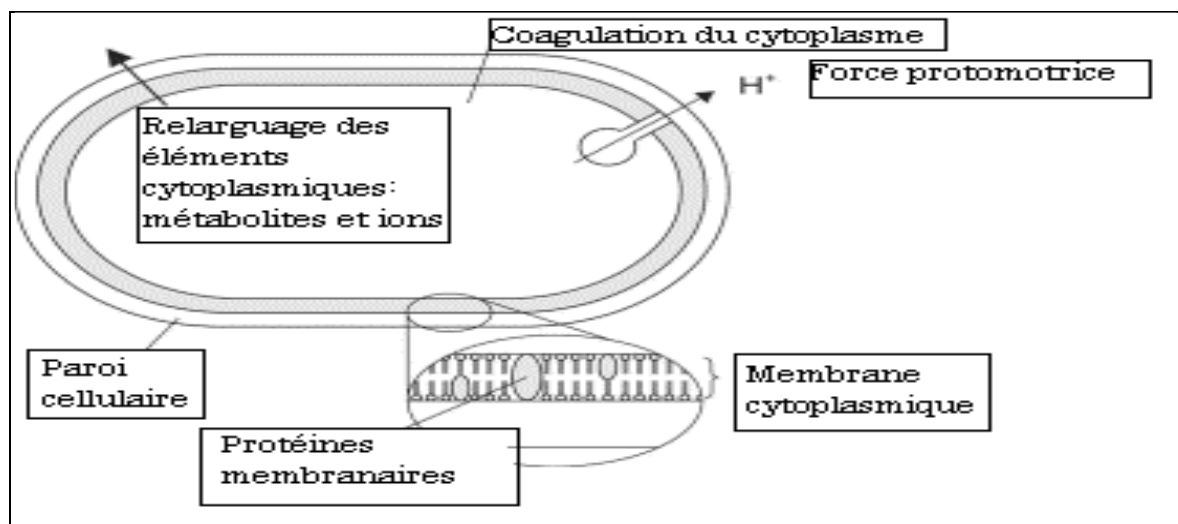


Figure n°21 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (**Burt, 2004**)

Bien qu'une certaine proportion de fuite de cellules bactériennes puisse être tolérée sans perte de viabilité, une plus grande perte du contenu cellulaire ou la sortie de molécules essentielles et d'ions peut conduire à la mort cellulaire (**Denyer et Hugo, 1991**).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles peuvent altérer des systèmes enzymatiques dont, ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants structurels ou encore, perturber la fonctionnalité du matériel génétique (**Davidson, 2001 ; Pavel et al., 2009**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. En effet, cette dernière est riche en lipopolysaccharides (LPS), ce qui la rend plus hydrophile, empêchant ainsi les composés hydrophobes des huiles essentielles d'y adhérer (Cristiani *et al.*, 2007).

III.1.5- Les huiles essentielles comme agents antifongiques

Le pouvoir des huiles essentielles exercé contre les moisissures allergisantes, les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes, a été mis en évidence par de nombreux travaux (Duarte *et al.*, 2005; Ouraini *et al.*, 2005). Les huiles essentielles des plantes aromatiques les plus étudiées appartiennent à la famille des Lamiacées et des Astéracées. Toutefois, d'autres familles telles que les Rutacées, les Myrtacées, les Lauracées, les Verbénacées, les Cupressacées, les Liliacées, les Apiacées, les Taxodiacees, les Chénopodiacées, les Théacées et les Géraniacées sont également rapportées dans la littérature pour l'activité antifongique de leurs huiles essentielles (Voda *et al.*, 2004 ; D'Auria *et al.*, 2005).

Les champignons sont généralement plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries (Cox *et al.*, 2000). Parmi ces huiles, celles de *Thymus citriodorus* et *Cymbopogon citratus* se révèlent être très efficaces pour inhiber des levures telles que, *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sacharomyces cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica* (Sacchetti *et al.*, 2005). Celle de *Citrus* (d'orange douce, de citron, de mandarine et de pamplemousse) a une activité antifongique contre *Penicillium chrysogenum*, *P. verrucosum*, *Aspergillus niger* et *A. flavus* (Sharma et Tripathi, 2006 ; Viuda-Martos *et al.*, 2008). Concernant les espèces choisies pour notre étude, il a été démontré que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* pouvait inhiber la croissance d'un certain nombre de souches fongiques dont *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* et *Zygorhynchus*. Cette même huile pouvait potentialiser l'effet antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C. albicans* (Giordani *et al.*, 2004 ; Pina-Vaz *et al.*, 2004). L'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* se révèle être quant à elle, très efficace contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Maccrophomina phasioli*, *Botrytis allii*, *Trichoderma veridus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevallii*, *Candida albicans*, *C. pseudotropicalis*, *C. carlspergensis*, *Rhodotorula minuta* et *Geotrichum candidum* (El-Sawi *et al.*, 2007 ; Bouzouita *et al.*, 2008; Mazari *et al.*, 2010).

L'activité fongistatique des composés aromatiques est liée à la présence de phénols (eugénol, thymol, isoeugénol, p-n-propylphénol et chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) qui sont les plus actifs, suivi des alcools, des aldéhydes (cinnamique et hydrocinnamique), des lactones sesquiterpéniques, des cétones, des éthers et des hydrocarbures. (Ultee *et al.*, 2002 ; Zhiri, 2006). Des études ont montré que la présence de groupements alkyls dans le noyau benzénique des phénols augmente le caractère antifongique (Kurita *et al.*, 1981; Kocić-Tanackov et Dimić, 2013).

III.1.5.1- Mode d'action

En général, les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium chez les levures et inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium et la toxicogénèse chez les moisissures (Hulin *et al.*, 1998). L'activité antifongique des huiles essentielles peut se faire selon deux mécanismes différents ; certains constituants peuvent provoquer une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie de sa rupture entraînant ainsi, une fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres, d'autres peuvent s'insérer dans les lipides membranaires et par conséquent, induire la perte des fonctions membranaires (Suppakul *et al.*, 2003).

III.2- Activité antioxydante

III.2.1- Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers (Sies, 1991). Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité afin de servir d'intermédiaires de processus physiologiques tels que le fonctionnement de certaines enzymes, la transduction de signaux cellulaires, la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la différenciation cellulaire, la régulation de la dilatation capillaire, le fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, la fécondation de l'ovule ou encore, la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003).

La production physiologique des radicaux libres est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense antioxydants, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Cependant, dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces composés est possible (Valko *et al.*, 2007). Par conséquent, les systèmes de défense sont surmenés et ne suffisent plus à neutraliser cet excès de production.

D'autant plus, s'il y a une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants suite à une inactivation directe ou par défaut de synthèse (Campbell *et al.*, 2004; Kirschvink *et al.*, 2008). On parle alors de stress oxydatif. Celui-ci est bien souvent à l'origine des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides) mais aussi, des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003 ; Baudin, 2006). Il est impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète, les rhumatismes et le vieillissement prématuré de la peau (Roberts et Sindhu, 2009).

III.2.2- Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, neutre ou chargée, caractérisée par un ou plusieurs électrons libres dits « célibataires » sur son orbitale externe (Halliwell, 1993; Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Cet état lui confère une instabilité énergétique et cinétique et une très grande réactivité ; sa durée de demi-vie étant extrêmement courte (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} secondes), ce qui le pousse à réagir très rapidement avec d'autres composants, cherchant à rattraper son ou ses électrons célibataires pour acquérir la stabilité. Les molécules attaquées deviennent à leur tour des radicaux libres, initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne (Halliwell, 1993; Dacosta, 2003; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer celles dites « primaires », qui dérivent directement de l'oxygène et qui jouent un rôle particulier en physiologie, de celles dites « secondaires ». Ces dernières se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives oxygénées (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive ; elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) mais aussi, certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$) (figure n°22) (Favier, 2003; Halliwell et Whiteman, 2004).

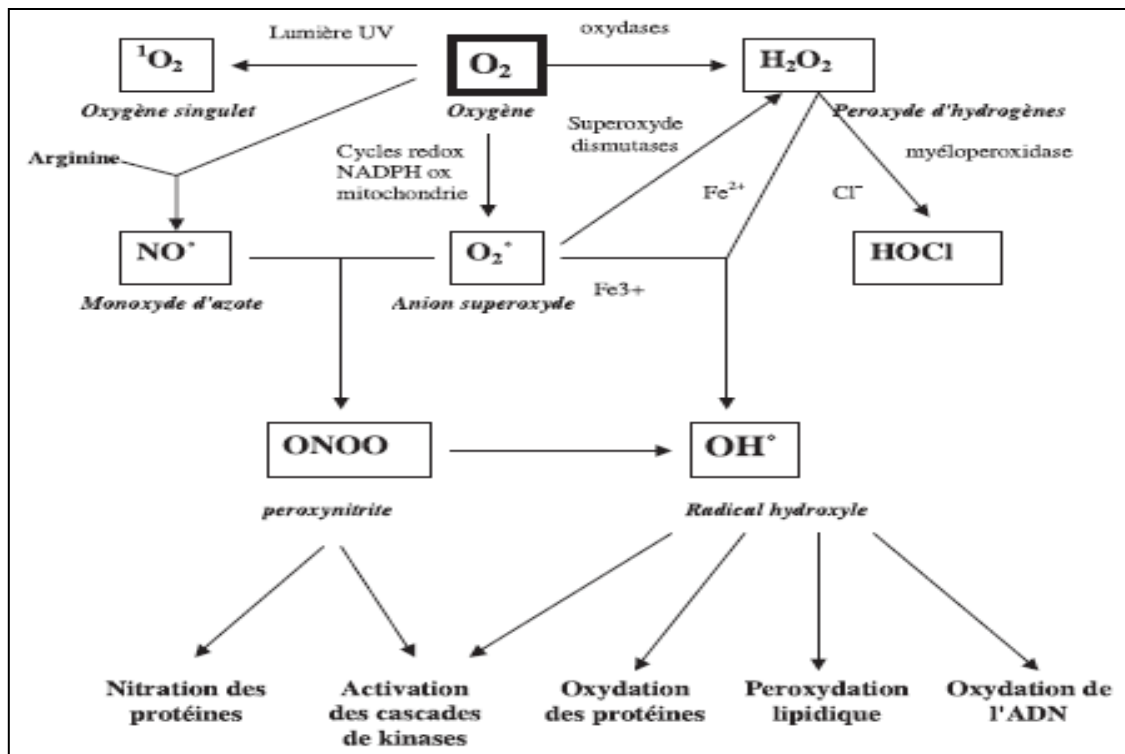


Figure n°22 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

III.2.3- Les antioxydants

Un antioxydant désigne toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces derniers (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

III.2.3.1- Systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

III.2.3.2- Systèmes non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q (**Favier, 2003; Durand et Beaudeau, 2011**). De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote (NO[•]) (**Favier, 2003**).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (**Pincemail et al., 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système (**Pincemail et al., 2002**). D'autres composés tels que les huiles essentielles, les alcaloïdes, les polyphénols, les phyrates et les flavonoïdes (**Bruneton, 1999; Charles, 2012**), apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Parmi les huiles essentielles, celles de la cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (**Edris, 2007**). Ce sont principalement les composés phénoliques, à savoir, le thymol et le carvacrol qui sont les plus actifs (**Richard, 1992 ; Bouhdid et al., 2006**). Leur activité est à mettre en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (**Braga et al., 2006**).

L'activité antioxydante des huiles est également attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques : le linalool, le 1,8-cinéole, le gèranial, le néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone mais aussi quelques monoterpènes : γ -terpinène et l' α -terpinolène (**Edris, 2007**). Les huiles essentielles ayant une importante capacité de piégeage des radicaux libres peuvent jouer un rôle important dans la prévention de certaines maladies, comme le dysfonctionnement du cerveau, le cancer, les maladies cardiaques et le déclin du système immunitaire. Ces maladies peuvent en effet résulter des dommages cellulaires causés par les radicaux libres (**Aruoma, 1998 ; Kamatou et Viljoen, 2010**).

Des travaux antérieurs sur l'espèce *Thymus vulgaris* ont montré que son huile essentielle présentait des propriétés antioxydantes marquées (**Dapkevicius et al., 2002 ; Miura et al., 2002**). En effet, administrée à des rats par leur alimentation, l'huile stabilise la perte du potentiel antioxydant lié au vieillissement, aux niveaux hépatique, cardiaque et cérébral (**Youdim et Deans, 1999 et 2000**). Évaluée également *in vitro* par le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), elle est capable de piéger le radical libre en le réduisant en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine. Le pouvoir antioxydant de l'huile est attribué principalement au carvacrol, thymol et *p*-cymène-2,3-diol (**Ternes et al., 1995**). Ce dernier composé a été démontré comme étant plus actif que certains antioxydants synthétiques tels que l' α -tocophérol et l'hydroxyanisole butylé (BHA) (**Schwarz et al., 1996**).

L'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles et des baies de *Juniperus phoenicea* a également été démontrée par de nombreuses recherches. L'étude réalisée par le test de DPPH et de FRAP (Ferric Reducing Power Assay) révèle que cette activité est attribuée à la présence des monoterpènes hydrocarbonés tel que le β -phellandrène (**Riahi et al., 2013**). Selon **Bouzouita et al. (2008)**, l'activité manifestée par l'huile de l'espèce pour la protection contre l'oxydation du saindoux et de l'huile de soja, est comparable à celle de l'antioxydant usuel δ -tocophérol et ce, à une concentration de 200 ppm.

III.2.3.3- Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent la phase d'initiation du processus d'oxydation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. Ils peuvent également chélater des traces métalliques responsables de la production des espèces réactives oxygénées ou encore interrompre la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres, absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Halliwell, 1994; Berset et Cuvelier, 1996; Favier, 2006**).

Les antioxydants visent également à protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive (**Hale, 2003**).

III.3- Activité anti-inflammatoire

III.3.1- L'inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (**Dayer et Schorderet, 1998**). Elle se caractérise par de la rougeur, de la douleur, de la chaleur, de la tuméfaction et parfois, une perte de fonction de la partie du corps affectée (**Sizer et Whitney, 2013**).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique pour l'hôte agressé, mettant en jeu de nombreux systèmes biologiques qui visent à éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Toutefois, elle peut être néfaste du fait de l'agressivité du pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation ou encore des régulations anormales du processus inflammatoire pouvant, par conséquent, engendrer des dommages irréversibles (**Lechat et al., 1990; Clos, 2012**).

Les causes du processus inflammatoire sont multiples, chaque agent causal représentant un élément pathogène endogène ou exogène. Cependant, quelle que soit son origine, il peut se présenter sous trois formes : physique, chimique ou biologique (infectieux) (**Weil et Batteux, 2003; Crouzilles et Siebert, 2012**).

- **Agents physiques :** Traumatismes (brèche cutanée, piqûre d'insecte, corps étranger (écharde, par exemple)), chaleur (brûlures), froid (gelures), radiations ionisantes et rayons ultraviolets (UV);
- **Agents chimiques :** Acides, bases et gaz ;
- **Agents biologiques:** Débris cellulaires, allergènes, greffons, bactéries, virus, parasites, champignons, prions, antigènes tumoraux et des composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines).

III.3.2- Les différents types d'inflammation

III.3.2.1- Inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate ou précoce à une blessure et est d'une durée relativement courte, allant de quelques minutes à quelques jours (8 - 10 jours) (**Rote, 1998; Kumar et al., 2010**). Elle guérit spontanément ou avec un traitement, mais peut laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Serhan et al., 2010**). Sa prédominance est vasculaire, principalement constituée par une réaction microcirculatoire intense entretenue et

amplifiée par la libération des médiateurs humoraux (**Bouhassira et Calvino, 2009**). Elle est caractérisée par trois grandes phases (**figure n° 23**) :

- **Phase vasculaire**

Cette phase débute par une vasoconstriction artériolaire extrêmement brève, de quelques secondes, sous l'action du système nerveux sympathique. Elle est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux sanguins avec une augmentation du débit local, ce qui explique en partie l'apparition de rougeur et d'hyperthermie locale. La vasodilatation est initiée et entretenue par la libération de médiateurs chimiques tels que les cytokines et les substances vasoactives (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine, dérivés du complément), ce qui entraîne l'exsudation de cellules et de plasma vers les tissus et aboutit à la constitution d'un œdème interstitiel (**Cousins et Power, 1999; Weil et Batteux, 2003; Gouilly et Petitdant, 2006**).

- **Phase cellulaire**

Elle est caractérisée par un afflux extra-vasculaire interstitiel (diapédèse) de leucocytes évoluant en trois phases. La première se met en place dans les premières minutes et met en jeu les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages qui auront pour fonction la phagocytose des microorganismes pathogènes et des tissus lésés. La deuxième phase implique des lymphocytes porteurs de récepteurs pour l'antigène peu variables qui vont contribuer à l'élimination des microorganismes. Si ces deux premières étapes n'ont pas été suffisantes pour contrôler définitivement l'infection, d'autres systèmes de défense impliquant l'activation de lymphocytes B et T spécifiques, se mettent en place (**Weil et Batteux, 2003**).

- **Phase de résolution**

Après phagocytose du foyer inflammatoire et destruction de l'agent causal, la réaction inflammatoire prend fin spontanément (**Gouilly et Petitdant, 2006**). Une réparation tissulaire par cicatrisation aboutit à un tissu conjonctif néoformé remplaçant le tissu détruit et ce, par la synthèse de collagène, la multiplication cellulaire (fibroblastes) et la néogénèse vasculaire à partir des capillaires persistants ou localisés en périphérie du site (**Kidd et Urban, 2001; Meunier et al., 2004**).

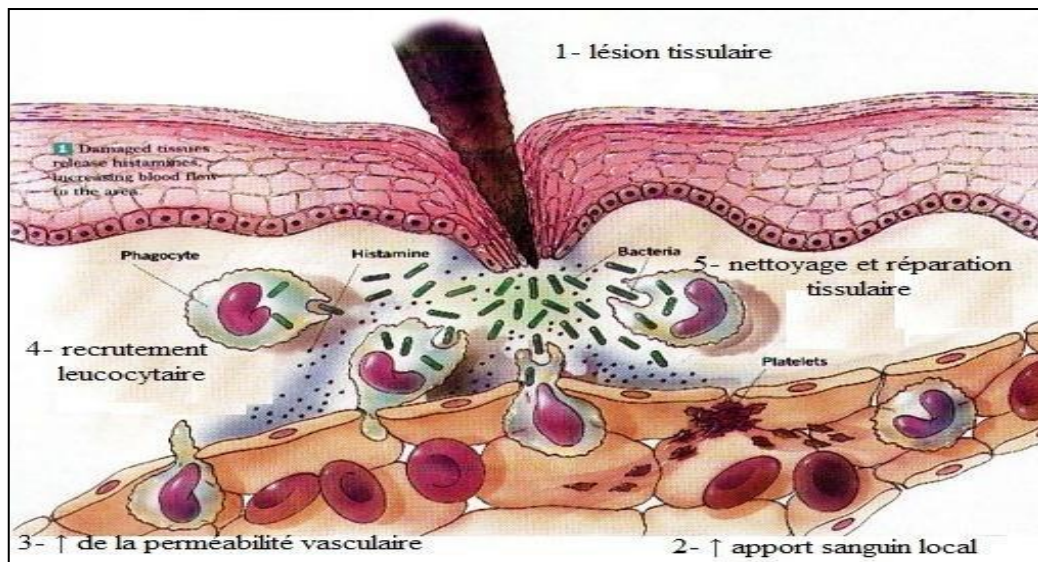


Figure n°23 : Les étapes de la réaction inflammatoire (Bounihi, 2016)

III.3.2.2- Inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années (Serhan *et al.*, 2010). Les signes de début sont identiques à ceux d'une inflammation aiguë, mais les destructions tissulaires sont plus graves et ont des conséquences fonctionnelles profondes. Dans de nombreux cas l'inflammation semble chronique d'emblée, comportant dès le départ des phénomènes de remodelage du tissu conjonctif, de destruction et de réparation. Le mécanisme de la chronicité n'est pas toujours évident. Dans certains cas, elle tient à la persistance d'une substance pathogène que l'organisme est incapable d'éliminer ; l'inflammation échoue dans sa finalité première qui est le maintien de l'intégrité du soi. Dans d'autres cas, on peut supposer qu'elle est auto-entretenu, les mécanismes intermédiaires continuant à opérer alors que la substance pathogène qui l'a déclenchée a été éliminée (Weil et Batteux, 2003).

III.3.3- Les anti-inflammatoires

III.3.3.1- Les anti-inflammatoires conventionnels

Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes, des antihistaminiques (Yvan, 1997). Ils sont divisés selon leur mode d'action en deux catégories :

- **Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes sont des analogues de synthèse de la cortisone, hormone sécrétée par les glandes surrénales. Les corticoïdes ont une efficacité nettement démultipliée par rapport à la cortisone. Dans l'ordre croissant d'activité, on trouve la prednisolone, la dexaméthasone et la fluméthasone (**Drogoul et Germain, 1998**).

Leur mode d'action présente deux volets majeurs (**Clos, 2012**):

- Inhibition de l'activité de plusieurs enzymes, dont la cyclo-oxygénase responsable de la synthèse de médiateurs chimiques essentiels de l'inflammation ; les prostaglandines et les thromboxanes ;
- Inhibition transcriptionnelle des gènes codant des molécules pro-inflammatoires (cytokines, molécules d'adhérence facilitant la diapédèse) et activation des gènes impliqués dans la production de protéines anti-inflammatoires.

Les corticoïdes agissent sur toutes les étapes de la réaction inflammatoire. De plus, ils possèdent un effet immunosuppresseur non négligeable. Cependant, l'utilisation à long terme pour maintenir les bienfaits de ces médicaments s'accompagne d'un risque accru d'effets secondaires tels que les troubles dermatologiques, déficit musculo-squelettique (faiblesse, atrophie musculaire et ostéoporose), arrêt de croissance, diabète, dyspepsie, troubles neurologiques (vertige, maux de tête, convulsions et hypertension intracrânienne bénigne) ou encore, une aggravation des infections oculaires et une perte visuelle permanente (**Russo-Marie, 1998; Buchmann, 2001 ; Bontoux et al., 2014**).

- **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Ce sont des molécules qui ne présentent pas d'analogie avec les corticoïdes ou les hormones stéroïdiennes et qui forment un groupe hétérogène de médicaments, agissant sur les conséquences de la réaction inflammatoire quelle que soit son origine (**Yvan, 1997; Drogoul et Germain, 1998**). Parmi ces molécules, on cite: les anti-inflammatoires salicylés (Aspirine), les oxicams (Feldène, Tilcotil, Mobic), les dérivés propioniques (Profénid, Apranax, Naprosyne, Cébutid), indoliques (Indocid) ou encore, des dérivés arylacétiques (Voltarène) (**Sany, 2003**).

Les AINS ont trois propriétés : antipyrétique, antalgique et anti-inflammatoire. Leur action est puissante et se manifeste rapidement en quelques heures ou quelques jours mais reste réduite par rapport à celle des AIS. Ils agissent en diminuant la production des prostaglandines et

des thromboxanes et ce, en inhibant l'activité de la cyclo-oxygénase (**Limbour et De Melo, 1995; Bontoux et al., 2014**).

Les AINS sont parmi les médicaments les plus prescrits, mais leur utilisation est limitée par la survenue d'effets secondaires en particulier, les complications digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements, ulcère, hémorragie), cutanés (éruption cutanée parfois gravissime), rénaux (insuffisance rénale), hépatiques (insuffisance hépatique), hématologiques (troubles de coagulation) et neurologiques (vertiges, céphalées) (**Duplan et Marty, 2001; Nicolas et al., 2001**).

III.3.3.2- Les anti-inflammatoires traditionnels

Les plantes sont depuis longtemps utilisées pour la prévention ou le traitement de maladies, y compris les maladies inflammatoires telles que le rhumatisme, l'arthrose, l'œdème et l'eczéma (**Barnes, 1998 ; Ko et al., 2014**). Leurs composés bioactifs peuvent servir de matrice pour la synthèse de nouveaux médicaments anti-inflammatoires tout en ayant des effets secondaires minimes et des effets pharmacologiques très puissants (**Agyare et al., 2013**). Des composés tels que les flavonoïdes, les tanins et les huiles essentielles, sont présumés agir en bloquant les voies des enzymes pro-inflammatoires notamment, la cyclo-oxygénase et la lipoxigénase (**Lee et al., 2003 ; Sadik et al., 2003 ; Rhind, 2012**).

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été mise en évidence par de nombreux travaux. Elle est due aux monoterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes hydrocarbonés et aux alcools sesquiterpéniques (**Chao et al., 2005**) dont notamment, thymol, carvacrol, *p*-cymène, linalool, bornéol, 1,8-cinéole (eucalyptol), menthol, α -terpinéol, α -pinène ou encore, α -terpinène (**Veras et al., 2013; de Cássia da Silveira e Sá et al., 2013**).

Parmi les plantes dotées de propriétés anti-inflammatoires, on cite : *Achillea millefolium*, *Aloe vera*, *Aucoumea klaineana*, *Boswellia serrata*, *Citrus auranticum*, *Curcuma longa*, *Lippia geminata*, *Mangifera indica*, *Nepeta cataria*, *Origanum vulgare*, *Piper longum*, *Ricinus communis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Xeromphis spina* et *Zingiber officinale* (**Pérez et al., 2011; Kumar et al., 2013**).

Des études effectuées sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par différents modèles expérimentaux dont, l'œdème de l'oreille, la pleurésie induite par carragénine et la chimiotaxie *in vitro*, ont permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'huile. Celui-ci est

principalement dû au thymol et au carvacrol qui sont impliqués dans l'inhibition des œdèmes inflammatoires et dans la migration des leucocytes (**Fachini-Queiroz et al., 2012**).

Concernant l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, **Tumen et al. (2012)** ont montré une guérison des lésions et un potentiel anti-inflammatoire dans le traitement expérimental des plaies chez la souris par application topique d'un onguent contenant 1% de l'huile.

Partie

Expérimentale

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

IV.1- Matériel végétal

IV.1-1- Récolte

L'espèce *Thymus vulgaris* L. a été récoltée durant le mois de mai 2014, de deux régions de l'ouest algérien (**Figure n°25**). La première étant la région de Kharrouba, située à l'est de la wilaya de Mostaganem et la deuxième étant la commune de Sebaa Chioukh, située au nord de la wilaya de Tlemcen. L'espèce *Juniperus phoenicea* L. a été récoltée quant à elle, à la fin du mois de mars 2013 dans la forêt de Cap Ivy, près de la commune de Abdelmalek Ramdane, située à l'est de la wilaya de Mostaganem (**Figure n°25**). Les coordonnées géographiques sont présentées ci-dessous (**Tableau n°1**).

Tableau n°1 : Données géographiques de la récolte des espèces étudiées :

| Espèce | Région | Coordonnées géographiques |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>Thymus vulgaris</i> L. | Kharrouba (Mostaganem) | Altitude: 80 m, longitude: 0°6'161E, latitude : 35°58'742N. |
| | Sebaa Chioukh (Tlemcen) | Altitude : 514m ; longitude : 1°21'21O, latitude : 35°9'22N. |
| <i>Juniperus phoenicea</i> L. | Commune de Abdelmalek Ramdane (Mostaganem) | Altitude : 101m, longitude : 0°13'25E, latitude : 36°06'46N. |



Figure n°24: Le genévrier de Phénicie de la forêt de Cap Ivy (Mostaganem)



Figure n°26 : *Thymus vulgaris* de Mostaganem

Figure n°27 : *Thymus vulgaris* de Tlemcen

Les deux espèces ont été identifiées au parc national de Tlemcen par Mme Hafida Hasnaoui, ingénieur et chef de département de foresterie. Le matériel végétal a été par la suite lavé et mis à sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 15 jours. Concernant le genévrier, une partie des feuilles et la totalité des baies ont été amenées au laboratoire pour l'extraction de leurs huiles essentielles juste après le lavage. Il est à noter qu'une certaine quantité des plantes a été récupérée avant le lavage pour la mesure du taux d'humidité.

IV.1.2- Détermination du taux d'humidité

Le contenu en humidité de la plante a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve. Une quantité de feuilles fraîches d'une masse de $5g \pm 0.01$ a été exposée à une température de $105^{\circ}C \pm 5$ dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Twidwell *et al.*, 2002 ; Bourkhiss *et al.*, 2009).

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = \frac{(\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta)}{\text{poids } \alpha} \times 100$$

Considérons :

α : Poids de l'échantillon (plante fraîche) en gramme ;

β : Poids de l'échantillon (plante sèche) en gramme;

H% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

IV.1.3- Screening phytochimique

IV.1.3.1- Principe

Le criblage phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Toutefois, il ne renseigne pas sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou insaturation dans une molécule).

L'analyse phytochimique a été réalisée sur la partie aérienne de *Thymus vulgaris* (feuilles et tiges) et de *Juniperus phoenicea* (feuilles, rameaux et baies) en utilisant les tests standards décrits par **Bruneton (1993)**, **Sofowora (1993)** et **Trease et Evans (2002)**.

IV.1.3.2- Alcaloïdes

Préparation de la solution à analyser

A 10 g de poudre végétale introduite dans un erlenmeyer de 250 ml, 50 ml d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% sont ajoutés. Après une macération de 24H à température ambiante, le macéré est filtré et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 50 ml de filtrat.

Caractérisation

- 1 ml de filtrat est prélevé et introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes du réactif de Mayer (**annexe n°3**) sont ajoutées ;
- 1 ml de filtrat est prélevé et introduit dans un tube à essai auquel 5 gouttes du réactif de Wagner (**annexe n°3**) sont ajoutées.

La présence d'alcaloïdes est caractérisée par la formation d'un précipité de couleur blanc-jaunâtre pour la première réaction et brun pour la deuxième.

Test de confirmation

A 0.3 g de poudre végétale mise dans un erlenmeyer, 3 ml d'acide chlorhydrique (HCl) dilué à 5% sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 30 min puis filtré. 1 ml de filtrat est prélevé et placé dans un tube à essai avec quelques gouttes de réactif de Mayer. La présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité ou d'un trouble blanc.

IV.1.3.3- Polyphénols

Préparation de la solution à analyser

5 g de poudre végétale sont introduits dans 100 ml d'eau distillée bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250 ml. Après une infusion de 15 min, la suspension est filtrée et rincée avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml d'infusé à 5%.

Caractérisation

IV.1.3.3.1- Tanins

Réaction de coloration

5 ml d'infusé à 5% sont introduits dans un tube à essai auquel 1 ml d'une solution aqueuse diluée de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à 1% est ajouté. La présence de tanins est caractérisée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

Différenciation des tanins (réaction de Stiasny)

A 30 ml d'infusé à 5%, 15 ml de réactif de Stiasny (**annexe n°3**) sont ajoutés. Le mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 min environ. L'obtention d'un précipité rose quantitativement important indique la présence de tanins catéchiques. Le mélange est filtré et saturé par 5 g d'acétate de sodium (CH_3COONa), ensuite 1 ml d'une solution de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à 1% est ajouté. L'obtention d'une teinte bleu-noire témoigne de la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

IV.1.3.3.2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes, pigments quasiment universels des végétaux, constituent une grande famille de composés abondamment présents dans les plantes. Plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence différents types de flavonoïdes.

- **Anthocyanes**

A 5 ml d'infusé présentant une coloration plus ou moins foncée, 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 50% sont ajoutés. Une coloration s'accroissant par acidification puis virant au bleu violacé en milieu basique, conclut à la présence d'anthocyanes.

- **Réaction à la cyanidine**

5 ml d'infusé sont introduits dans un tube à essai auquel sont ajoutés 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume de 5 ml) et 1 ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de crépitation pendant quelques minutes.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones), rose violacée (flavanones) ou rouge (flavonols, flavanolols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence de flavonoïdes libres (génines).

Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.

La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones.

➤ **Leucoanthocyanes**

La réaction de la cyanidine est effectuée sans ajout de copeaux de magnésium avec chauffage au bain-marie pendant 15 min. L'apparition d'une coloration rouge cerise ou violacée indique une réaction positive. Une teinte brun-rouge est observée en présence de catéchols.

IV.1.3.4- Dérivés anthracéniques

Préparation de la solution à analyser

- **Extrait chloroformique**

A 1 g de poudre végétale, un volume de 10 ml de chloroforme est ajouté. Le mélange est chauffé au bain-marie pendant 3 min puis est filtré à chaud et complété à 10 ml si nécessaire.

- **Hydrolysât**

A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'HCl concentré sont ajoutés. Le tube à essai est maintenu dans le bain-marie bouillant pendant 15 min puis est refroidi sous un courant d'eau et filtré. Il est ensuite complété à 10 ml avec l'eau distillée.

Caractérisation

- **Dérivés anthracéniques libres (réaction de Bornträger)**

1 ml d'extrait chloroformique est introduit dans un tube à essai auquel 1 ml d'hydroxyde

d'ammonium (NH_4OH) dilué à 50% est ajouté, le mélange est agité. Une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

- **Dérivés anthracéniques combinés**

- **O-Hétérosides**

5 ml d'hydrolysât sont prélevés et agités avec 5 ml de chloroforme, la phase organique est ensuite soutirée et introduite dans un tube à essai auquel 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dilué est ajouté, le tout est agité. La phase aqueuse est conservée.

Une réaction positive est révélée par une coloration rouge plus ou moins intense. En cas d'une réaction négative ou faiblement positive, une recherche est continue pour les O-hétérosides à génine réduite.

- **O-hétérosides à génine réduite**

3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10% sont ajoutées à 5 ml d'hydrolysât. Le mélange est chauffé au bain-marie pendant 4 min puis refroidi et agité avec 5 ml de chloroforme. La phase chloroformique est soutirée et introduite dans un tube à essai auquel nous ajoutons 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dilué, le tout est agité. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthrones, la coloration s'intensifie.

- **C-hétérosides**

La phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides, est reprise par 10 ml d'eau distillée puis 1 ml de FeCl_3 à 10% est ajouté. Le tube à essai est maintenu dans le bain-marie bouillant pendant 30 min puis est refroidi et agité avec 5 ml de chloroforme. La phase chloroformique est soutirée et introduite dans un tube à essai auquel nous ajoutons 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) dilué puis nous agitions. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

IV.1.3.5- Saponosides

Préparation de la solution à analyser

Un décocté à 1% est préparé en introduisant 1 g de poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau distillée bouillante. La suspension est maintenue en ébullition modérée pendant 15 min puis est filtrée après refroidissement et complétée à 100 ml.

Caractérisation

Dans une série de 10 tubes à essais numérotés de 1 à 10, des volumes allant de 1 à 10 ml de décocté à 1% y sont introduits successivement. Chaque tube est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée puis est agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde (soit 30 agitations). Après un temps de repos de 15 min, la hauteur de la mousse dans chaque tube est mesurée. Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de 1 cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$\text{Idm} = \frac{1000}{N}$$

- Idm : Indice de mousse ;
- N : Numéro du tube dans la hauteur de la mousse est de 1 cm.

Si la hauteur de la mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'Idm est inférieur à 100. Par contre, si la hauteur est supérieure à 1 cm, l'Idm est supérieur à 100.

IV.1.3.6- Stérols et triterpènes

Préparation de la solution à analyser

Un extrait est préparé à partir d'une macération de 24H d'un gramme de poudre végétale dans 20 ml d'éther puis est filtré et complété à 20 ml avec de l'éther. Cet extrait servira en plus des stérols ; à la caractérisation des caroténoïdes et des coumarines.

Caractérisation (réaction de Liebermann-Buchard)

10 ml d'extrait étheré est évaporé à sec et repris avec 1 ml d'anhydride acétique ($C_4H_6O_3$) puis 1 ml de chloroforme ($CHCl_3$). La solution obtenue est partagée dans deux tubes. 1 à 2 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré sont ajoutés, sans agitation, à l'aide d'une pipette au fond de l'un des tubes, l'autre servira de témoin. A la zone de contact des deux liquides, la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et triterpènes.

Caroténoïdes (réaction de Carr et Price)

5 ml d'extrait étheré est évaporé à sec, le résidu est repris avec 2 à 3 gouttes de solution saturée de trichlorure d'antimoine ($SbCl_3$) dans le chloroforme ou dans le tétrachlorure de carbone (CCl_4). Il se développe, en présence de caroténoïdes, une coloration bleue intense ou bleu verdâtre.

Coumarines

5 ml d'extrait étheré est évaporé à sec, le résidu est repris avec 2 ml d'eau chaude. La solution est ensuite partagée entre deux tubes à essais. Dans l'un des deux, 0.5 ml d'ammoniaque (NH₄OH) à 25% est ajouté. Le mélange est observé sous rayonnement ultraviolet à 366 nm. La présence d'une fluorescence intense bleu verdâtre ou violette dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque, indique la présence de coumarines, l'autre tube sert de témoin.

IV.1.3.7- Autres caractérisations

Préparation de la solution à analyser

Un décocté à 10% est préparé en introduisant 10 g de poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 min.

IV.1.3.7.1- Composés réducteurs

5 ml de décocté aqueux à 10% introduit dans un bêcher est évaporé au bain-marie jusqu'à sec. Le résidu est repris avec 1 ml de réactif de Fehling (0.5 ml de réactif A + 0.5 ml de réactif B). L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

IV.1.3.7.2- Oses et holosides

5 ml de décocté aqueux à 10% introduit dans un bêcher est évaporé au bain-marie jusqu'à sec. Le résidu est repris avec 2 à 3 gouttes de H₂SO₄ concentré puis 3 à 4 gouttes d'alcool saturé avec du thymol 5 min après. Le développement d'une coloration rouge caractérise les oses et les holosides.

IV.1.3.7.3- Mucilages

Dans un tube à essai, 1 ml de décocté aqueux à 10% et 5 ml d'éthanol absolu sont introduits. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange après 10 min, indique la présence de mucilages.

IV.1.3.7.4- Hétérosides cyanogénétiques

1 g de poudre végétale est introduit dans un tube contenant 5 ml d'une solution de même volume d'eau et de toluène. Un papier picrosodé imbibé de réactif de Guignard (**annexe n°3**) est alors déposé dans le tube. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'hétérosides cyanogénétiques.

IV.1.4- Détermination de la composition minérale des plantes

IV.1.4.1- Préparation des échantillons

Les échantillons des trois plantes sélectionnées (feuilles et tiges) ont été lavés à l'eau distillée puis séchés à l'étuve à 70°C pendant 24 à 48 heures (jusqu'à ce que le poids soit constant). Ils ont été par la suite finement broyés et stockés dans des sacs en papiers à température ambiante (Ibrahim *et al.*, 2015).

IV.1.4.2- Minéralisation des échantillons

La minéralisation a été effectuée selon la norme **AFNOR NF X 31-151 (1993)**. Pour se faire, 1 g de poudre végétale, mise dans un creuset en porcelaine, a été calcinée dans un four à moufle à 450°C pendant 4 heures afin d'obtenir des cendres blanches. Après refroidissement, les cendres sont humidifiées par quelques gouttes d'acide nitrique (HNO₃) concentré puis sont évaporées à sec sur une plaque chauffante à 150°C avant de les remettre au four à 400°C pendant 1 heure. Le résidu obtenu est repris dans 5 ml d'HCl concentré et évaporé à sec pendant 1 heure. Il est ensuite dissous dans 5 ml d'HCl dilué à 5% à chaud pendant 1 heure. Après refroidissement, la solution est filtrée à travers le papier filtre Whatman n°42 et le papier filtre millipore (diamètre < 0.45 µm). La solution finale est ajustée à 10 ml par l'eau distillée.

IV.1.4.3- Analyse des échantillons

Le dosage des échantillons de plantes a été réalisé à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (SAA) de type Perkin-Elmer 300 afin de déterminer leur composition minérale ainsi que le taux des différents éléments minéraux présents. Des solutions étalons pour chaque élément recherché, ont été parallèlement préparées à différentes concentrations (ppm) puis dosées.

La teneur des minéraux (mg) dans la matière végétale sèche (Kg) est calculée par la formule suivante :

$$T \text{ (ppm)} = X * V / M * D$$

X : Concentration en ppm (mg/l) mesurée par le spectromètre ;

V : Volume final en ml de la solution d'attaque ;

M : Masse en g de la prise d'essai ;

D : Facteur de dilution.

IV.2- Huiles essentielles

IV.2.1- Procédés d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par deux méthodes différentes. La première étant par hydrodistillation concernant les feuilles de *Thymus vulgaris* L. et la deuxième étant par entraînement à la vapeur d'eau concernant les feuilles et les baies de *Juniperus phoenicea* L..

IV.2.1.1- Hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Thymus vulgaris* L. a été effectuée à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**figure n°28**). Cela consiste à introduire 100 g de matériel végétal dans un ballon de 2 Litres contenant de l'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3H à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité. L'huile obtenue est conservée à une température de 0°C dans des tubes en verre opaques, fermés hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière jusqu'à son usage.



Figure n°28 : Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

IV.2.1.2- Entraînement à la vapeur d'eau

L'extraction des huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches et des baies du genévrier rouge a été réalisée à l'aide d'un vapodistillateur de type SPRING A 105 12 Litres (**figure n°29**). Pour ce faire, 1 Kg 500 de matériel végétal est placé sur une grille qui surmonte l'eau en ébullition. Les vapeurs formées dans l'extracteur traversent la plante, libèrent l'huile du tissu végétal et l'entraînent avec elles. Après condensation dans le réfrigérant, celles-ci chutent et sont récupérées dans une ampoule de décantation, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (**figure n°30**). L'huile obtenue est conservée à une température de 0°C dans des tubes en verre opaques, fermés hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière jusqu'à son usage.



Figure n°29 : Vapodistillateur de type SPRING A 105 12 Litres utilisé pour l'extraction des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*

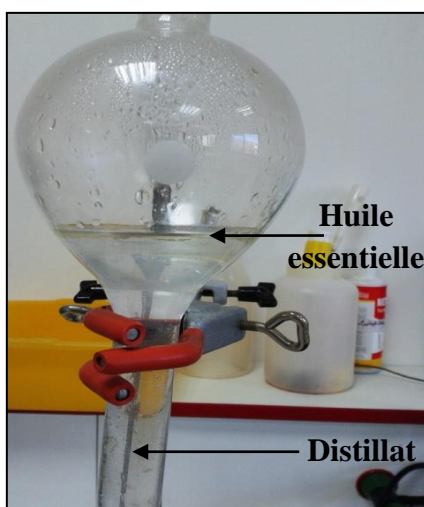


Figure n°30 : Séparation de la phase huileuse de la phase aqueuse dans l'ampoule de décantation

IV.2.2- Calcul du rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE} = M'/M \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en % ;

M' : Masse d'huile essentielle en gramme ;

M : Masse de la plante en gramme.

IV.2.3- Méthodes d'analyse des huiles essentielles

L'analyse et l'identification de la composition chimique des huiles essentielles des deux espèces étudiées ont été effectuées par des techniques chromatographiques. La chromatographie en phase gazeuse (CPG), nous a permis de séparer et de quantifier les composés. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) nous a permis quant à elle, à l'aide des banques de données spectrales, de déterminer les composés.

IV.2.3.1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC ThermoQuest équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire SE-52 (5% de phényle; 95% de diméthylpolysiloxane) de 50 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 1.0 μm d'épaisseur de film. La température du four a été programmée à 60°C pendant 1 min puis à 250°C, à raison d'une montée de 3°C/min. Les températures de l'injecteur (split/splitless) et du détecteur ont été fixées à 230°C et 250°C, respectivement. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1.5 ml/min. Le volume d'échantillon d'huile essentielle injecté par le mode split est de 0.1 μl à un rapport de division de 1/100.

IV.2.3.2- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC ThermoQuest muni d'une colonne capillaire SE-52 de (50 m x 0.25 mm) et 1.0 μm d'épaisseur de film, couplé à un spectromètre de masse de type ThermoQuest Automass Solo quadripolaire. Les températures de la source ionique et de l'interface ont été réglées

respectivement à 230°C et 250°C. Le four a été programmé de 60°C à 250°C, à raison d'une montée de 3°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 230°C et 250°C, respectivement. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1.5 ml/min. 0.1 µl d'échantillon d'huile essentielle est injecté par le mode split à un rapport de division de 1/100. Les spectres de masse ont été obtenus par un impact électronique (IE) de 70 eV, un balayage sur une gamme de masse allant de 40 à 500 unités avec une vitesse de 0.5 sec et un filament de 300 µA.

IV.2.3.3- Identification des composés chimiques

Les constituants de chacune de nos huiles essentielles ont été identifiés en utilisant le logiciel ThermoXcalibur 1.2 en corrélant leurs spectres de masse respectifs avec ceux des bibliothèques (NIST08, Wiley 8^{ème} édition, Adams (**Adams, 2001**) et Mass Finder. Les indices de rétention ont été déterminés selon **van Den Dool et Kratz (1963)**.

IV.3- Procédés d'étude microbiologique

IV.3.1- Souches microbiennes testées

Pour notre étude, nous avons testé la sensibilité de sept souches microbiennes de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Alger vis-à-vis des agents antimicrobiens standards (antibiotiques et antifongiques) et biologiques (huiles essentielles). Il s'agit de cinq souches bactériennes (quatre Gram négatives et une Gram positive) et de deux souches fongiques connues pour être responsables d'infections nosocomiales (**tableau n°2**).

Tableau n°2 : Liste des souches microbiennes testées :

| Souche | Code | Gram | Source |
|---------------------------------|------------|----------|-----------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 10876 | positive | Institut Pasteur d'Alger |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | négative | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC 35659 | négative | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | ATCC 6380 | négative | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | négative | |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 | | |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404 | | |

ATCC: American Type Culture Collection.

IV.3.2- Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés pour les différents tests microbiologiques sont les suivants (annexe n°1) :

- Pour les bactéries :
 - Bouillon nutritif ;
 - gélose nutritive ;
 - milieu Mueller Hinton (M.H) liquide et solide.
- Pour les moisissures :
 - Bouillon nutritif ;
 - milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA) ;
 - milieu Sabouraud liquide et solide.

IV.3.3- Préparation de l'inoculum

Les inoculums sont préparés à partir d'une culture jeune en milieu liquide (bouillon nutritif) de 18H pour les bactéries, 48H pour les levures et de 3 à 5 jours pour les champignons et ce, en les diluant dans de l'eau physiologique stérile, de manière à obtenir des suspensions de concentration microbienne déterminée suivant la méthode utilisée pour l'étude de l'activité antimicrobienne des différents agents testés.

IV.3.4- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques et des moisissures aux antifongiques a été évaluée par la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé (NCCLS, 1997). Un volume de 100 µl de suspension microbienne standardisée à 10^8 UFC/ml pour les bactéries, 10^6 UFC/ml pour les levures (Haddouchi *et al.*, 2009) et 10^6 spores/ml pour les champignons (Braga *et al.*, 2007) a été ensemencé par étalement sur un milieu de culture gélosé approprié (Mueller Hinton pour les bactéries, PDA pour les moisissures). Des disques d'antibiotique ainsi que des disques imprégnés d'une solution d'antifongique ont ensuite été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface des milieux respectifs. En parallèle, des témoins ont été utilisés pour le contrôle de la croissance des souches testées. Les boîtes de Pétri ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1H. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 25°C pendant 48H pour les levures et 7 jours pour les champignons. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque souche microbienne.

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

Les différents antibiotiques testés contre les bactéries sont listés dans l'**annexe n°2**. Concernant les antifongiques, seules deux solutions à 1% ont été employées contre les moisissures : éconazole et clotrimazole.

IV.3.5- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

IV.3.5.1- Technique d'aromatogramme (méthode de Vincent)

La réalisation de cette méthode repose sur le principe de l'antibiogramme (**NCCLS, 1997**). Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre, contenant 15 µl d'huile essentielle à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé approprié pour chaque souche, préalablement ensemencé avec 100 µl de suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à 10^8 UFC/ml pour les bactéries, 10^6 UFC/ml pour les levures (**Haddouchi et al., 2009**) et 10^6 spores/ml pour les champignons (**Braga et al., 2007**). Des témoins ont été utilisés comme contrôle négatif. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1H avant d'être incubées à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 25°C pendant 48H pour les levures et 7 jours pour les champignons. Les essais sont effectués en triple.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque. L'importance des diamètres des zones reflète l'impact de l'huile essentielle sur les souches testées.

IV.3.5.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne de 90% (**Skandamis et Nychas, 2001**). Sa détermination a été réalisée par la méthode de macrodilution en milieu liquide. L'huile essentielle est tout d'abord préparée par émulsion dans une solution d'agar à 0.2% afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les germes à tester. Des dilutions successives de la solution obtenue est ensuite effectuée par progression géométrique de raison 2 de façon à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 (**Oussou et al., 2004**). La gamme de concentrations finales d'huile essentielle utilisée va de 0.0781 à 10 µl/ml (v/v).

Pour les bactéries, 0.2 ml de chacune des solutions d'huile essentielle est introduit dans un tube de la série expérimentale contenant 1.8 ml d'une suspension bactérienne préparée dans le bouillon Mueller Hinton et dont la turbidité est comprise entre $5 \cdot 10^5$ et $5 \cdot 10^7$ bactéries/ml. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24H (Okou *et al.*, 2006; Koné *et al.*, 2007).

Pour les moisissures, 0.1 ml de chacune des solutions d'huile essentielle est introduit dans un tube de la série expérimentale contenant 0.9 ml de bouillon Sabouraud inoculé avec une culture fongique standardisée à $1 \cdot 10^7$ cellules/ml concernant les levures et à 10^6 spores/ml concernant les champignons (CLSI, 2002). Les tubes sont ensuite portés à incubation à 25°C pendant 48H pour les levures et 5 à 7 jours pour les champignons.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation du changement de turbidité dans les tubes après incubation et par comparaison avec les contrôles. Un tube ne contenant que le milieu de culture et l'inoculum est utilisé comme contrôle négatif tandis que, des tubes contenant le milieu de culture stérile et une concentration d'huile essentielle déterminée sont utilisés comme contrôles positifs (série de référence). Les essais sont effectués en triple pour chacune des concentrations d'huile essentielle utilisées. La CMI correspond à la plus faible concentration d'huile à laquelle aucune croissance microbienne n'est visible (CLSI, 2002; Oussou *et al.*, 2004).

IV.3.5.3- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Le contenu des tubes dans lesquels aucun trouble n'a été observé, a servi à ensemercer le milieu gélosé M.H et ce, par des stries de 5 cm de long à l'aide d'une anse calibrée de 0.2 μ l en commençant par le tube correspondant à la CMI. La boîte de Pétri est ensuite incubée à 37°C pendant 24H (Oussou *et al.*, 2004; Konan Kouadio *et al.*, 2013). Les essais sont effectués en triple. La CMB a été déterminée en comparant la densité des stries à celle d'une autre boîte de Pétri préalablement préparée (boîte A) (Konan Kouadio *et al.*, 2013). Elle correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0.01% de survivants (Bolou *et al.*, 2011).

La préparation de la boîte A a nécessité la préparation de l'inoculum de la souche bactérienne testée comme suit : deux colonies isolées à partir d'une culture de 18H sur gélose M.H, sont inoculées dans 10 ml de bouillon M.H puis incubées à 37°C pendant 3H. Un prélèvement de 0.1 ml de la préculture est délayé dans un autre tube de 10 ml de bouillon M.H constituant ainsi l'inoculum initial de dilution 10^0 . Quatre dilutions successives, de 10 en 10,

sont également effectuées (10^{-1} à 10^{-4}). Ensuite, un ensemencement par stries de 5 cm de long à partir des cinq dilutions préparées, est réalisé à l'aide d'une anse calibrée de 0.2 μ l sur la gélose M.H constituant ainsi la boîte A. Les dilutions 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} correspondent respectivement à 100%, 10%, 1%, 0.1% et 0.01% de survivants (Bolou *et al.*, 2011; Konan Kouadio *et al.*, 2013).

IV.3.5.4- Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)

A partir des tubes dans lesquels aucune croissance fongique n'est observée, 10 μ l est prélevé et ensemencé dans le milieu gélosé Sabouraud. Les boîtes de Pétri sont ensuite portées à incubation à 25°C pendant 48H pour les levures et 5 à 7 jours pour les champignons. Chaque essai est réalisé trois fois. La CMF correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle à partir de laquelle aucune croissance n'est visible (CLSI, 2002).

IV.4- Etude de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Juniperus phoenicea* a été évalué par deux méthodes : le test de DPPH et le test de FRAP.

IV.4.1- Test de DPPH

IV.4.1.1- Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH $^\circ$) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517 nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants qui sont des donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et vire au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance (Brand-Williams *et al.*, 1995; Maataoui *et al.*, 2006). La réaction peut être représentée par l'équation suivante (figure n°31).

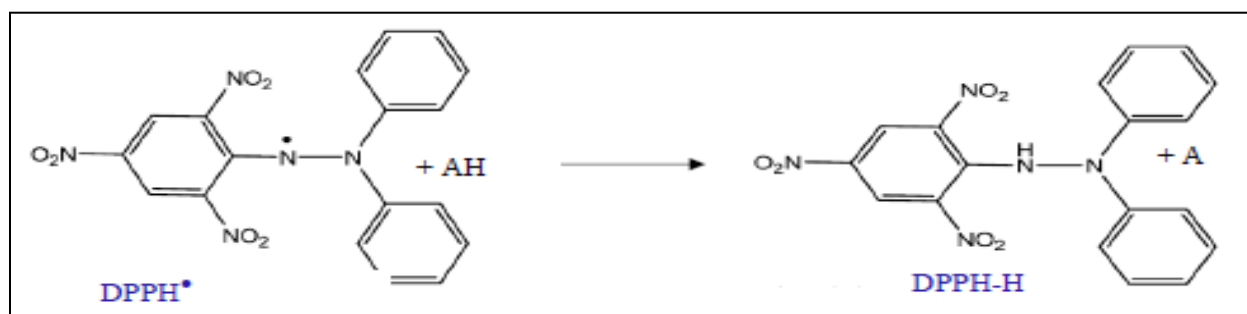


Figure n°31: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004)

IV.4.1.2- Mode opératoire

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH selon la méthode décrite par **Archana et al. (2005)**. Un volume de 100 µl de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle préparées à différentes concentrations est mélangé avec 2.9 ml d'une solution d'éthanol de DPPH° de 0,004% (p/v). Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm par spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible. Nous procédons de la même manière pour l'acide ascorbique (antioxydant de référence).

Un contrôle négatif composé de 100 µl d'éthanol et de 2.9 ml de la solution de DPPH° est également préparé.

Les concentrations des huiles essentielles testées sont comprises entre 0.2 et 100 mg/ml pour *T. vulgaris* et entre 500 et 10000 mg/ml pour *J. phoenicea* alors que celles de l'antioxydant standard, sont comprises entre 0.02 et 1 mg/ml.

IV.4.1.3- Expression des résultats

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de réduction de la solution de DPPH° (**Dongmo et al., 2010**). D'après **Dung et al. (2008)** et **Eyob et al. (2008)**, le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$PR = (A_C - A_E) / A_C \times 100$$

PR : Pouvoir de la réduction exprimé en pourcentage (%) ;

A_E : Absorbance de la solution de DPPH° en présence de l'huile essentielle ou de l'acide ascorbique ;

A_C : Absorbance de la solution de DPPH° en absence de l'huile essentielle et de l'acide ascorbique.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle et de l'acide ascorbique, permet également de calculer le paramètre CE₅₀ qui représente la « Concentration Efficace ». Cette dernière est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de l'acide ascorbique) nécessaire pour réduire 50% de l'activité de DPPH° (**Molyneux, 2004**).

Les valeurs CE_{50} moyennes sont déterminées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des échantillons testés et l'ordonnée par le pouvoir de réduction en pourcentage (Mensor *et al.*, 2001).

IV.4.2- Test de FRAP

IV.4.2.1- Principe

Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Karagözler *et al.*, 2008).

IV.4.2.2- Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986). Pour ce faire, un volume de 1 ml de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle préparées à différentes concentrations, est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) (annexe n°4) et 2.5 ml d'une solution de ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min puis, refroidi à température ambiante avant d'ajouter 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min. Puis, 2.5 ml de surnageant est mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution aqueuse de trichlorure de fer $FeCl_3$ à 0.1%. La mesure de l'absorbance du milieu réactionnel se fait 10 min après incubation à 700 nm par spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'échantillon d'huile essentielle par de l'eau distillée. Une solution d'acide ascorbique préparée à différentes concentrations et dans les mêmes conditions est utilisée comme contrôle positif.

Les huiles essentielles de *T. vulgaris* ont été testées à des concentrations comprises entre 0.2 et 10 mg/ml. Concernant *J. phoenicea*, la gamme est de 500 à 10000 mg/ml pour les huiles des feuilles et de 10 à 100 mg/ml pour les huiles des baies tandis que, celle de l'antioxydant standard est comprise entre 0.02 et 0.4 mg/ml.

IV.4.2.3- Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de graphe où l'abscisse est représentée par les différentes concentrations d'échantillon testées et l'ordonnée est représentée par les absorbances obtenues. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. La CE₅₀, définie comme étant la concentration efficace à laquelle l'absorbance était de 0.5 pour réduire le pouvoir, est déterminée par interpolation à partir de l'analyse de régression linéaire (Oyaizu, 1986).

IV.5- Etude pharmacologique

L'étude pharmacologique a été réalisée *in vivo* sur des souris *Swiss albinos*. L'objectif étant d'évaluer la toxicité aigue des huiles essentielles par administration orale et leur activité anti-inflammatoire par le test de l'œdème plantaire induit par injection d'un agent phlogogène.

IV.5.1- Matériel animal

Des souris *Swiss albinos* des deux sexes, pesant de 25 à 30 g et provenant de l'institut Pasteur d'Alger, ont été utilisées pour les tests *in vivo*. Elles ont été mises dans des cages en polypropylène avec un accès libre à l'eau et alimentées de façon régulière (annexe n°6). Elles ont été acclimatées à l'environnement du laboratoire pendant une durée de deux semaines avant l'expérimentation et ce, dans des conditions contrôlées de température ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) avec un cycle lumière/obscurité de 12 H.

IV.5.2- Préparation des solutions à tester

Les huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* ont été mises en suspension dans un mélange d'eau distillée et de Tween 80 à 1% de façon à obtenir une solution de 100 mg/ml à administrer par voie orale aux animaux (Faria *et al.*, 2011). Des agents additionnels comprenant la carragénine (1%) et le diclofénac (10 mg/Kg) ont été dissous dans du sérum physiologique (0.9% p/v) avant utilisation.

IV.5.3- Toxicité aigue

IV.5.3.11- Notion de toxicité

Les effets toxiques d'une substance varient considérablement selon sa nature, l'organe cible et son mécanisme d'action. Ces effets constituent la résultante d'interactions biochimiques entre la substance toxique et/ou ses métabolites et les structures de l'organisme. Une meilleure connaissance de ces caractéristiques permet d'améliorer l'évaluation des risques potentiels pour

la santé et facilite le développement de mesures rationnelles dans la prévention et le traitement (Traoré *et al.*, 1999).

IV.5.3.2- Principe

L'étude de la toxicité aiguë consiste à administrer oralement par prise unique, différentes doses d'échantillon à tester aux animaux et d'observer régulièrement pendant une période allant de 24 H à une semaine, des signes probables de toxicité tels que les salivations, les convulsions, le coma et la mort (Ruckebusch, 1981; Paschapur *et al.*, 2009). Cette étude permet d'exprimer la dose qui tue 50% des animaux d'expérience (DL₅₀) ainsi que la dose maximale sans effet toxique (DME) c'est-à-dire la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est relevé par rapport au lot témoin (Traoré *et al.*, 1999).

IV.5.3.3- Mode opératoire

Le test de toxicité aiguë a été effectué conformément à la ligne directrice de l'Organisation de la Coopération Economique et Développement (OECD) code 423 (OECD, 2001a) (annexe n°7). Les souris, des femelles uniquement, ont été mises à jeun 16 H avant l'expérimentation avec accès libre à l'eau. Chaque huile essentielle des espèces végétales étudiées a été administrée par voie orale à des groupes de souris (n = 3) et ce, à des doses de 50, 300 et 2000 mg/kg, respectivement. Le groupe témoin n'a reçu que le véhicule (10 ml/kg de Tween 80 à 1%). Après traitement, l'observation des animaux a été faite continuellement pendant 2 H avant de leur donner à manger et à boire afin de déceler des changements dans leurs réponses autonomiques ou comportementales en comparaison avec le groupe témoin (mort, agitation, respiration, asthénie). La surveillance pour toute mortalité a été poursuivie pendant 48 H et ensuite pendant 7 jours. Si aucune mort n'a été enregistrée dans les groupes traités, le test est alors répété avec de nouveaux lots d'animaux (n = 3), à des doses d'huile essentielle plus élevées, allant jusqu'à 5000 mg/kg.

IV.5.4- Etude de l'activité anti-inflammatoire

IV.5.4.1- Test de l'œdème plantaire induit par carragénine

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* a été réalisée selon la méthode décrite par Winter *et al.* (1962). Pour ce faire, les souris des deux sexes ont été soumises à un jeun de 16 H avant l'expérimentation avec un accès libre à l'eau. Elles ont été réparties en 5 lots de 6 animaux chacun. Le lot I (témoin ou contrôle) a reçu 10 ml/kg de Tween 80 à 1%. Le lot II (standard) a reçu 10 mg/kg de diclofénac (un anti-

inflammatoire de référence) tandis que les lots III, IV et V (expérimentaux), ont reçu respectivement des doses de 100, 200 et 400 mg/kg d'huile essentielle à tester. Trente minutes après le traitement par administration orale, l'œdème a été induit par injection de 50 μ l de carragénine (1% p/v) au niveau de la voute plantaire de la patte postérieure droite (**figure n°32**).

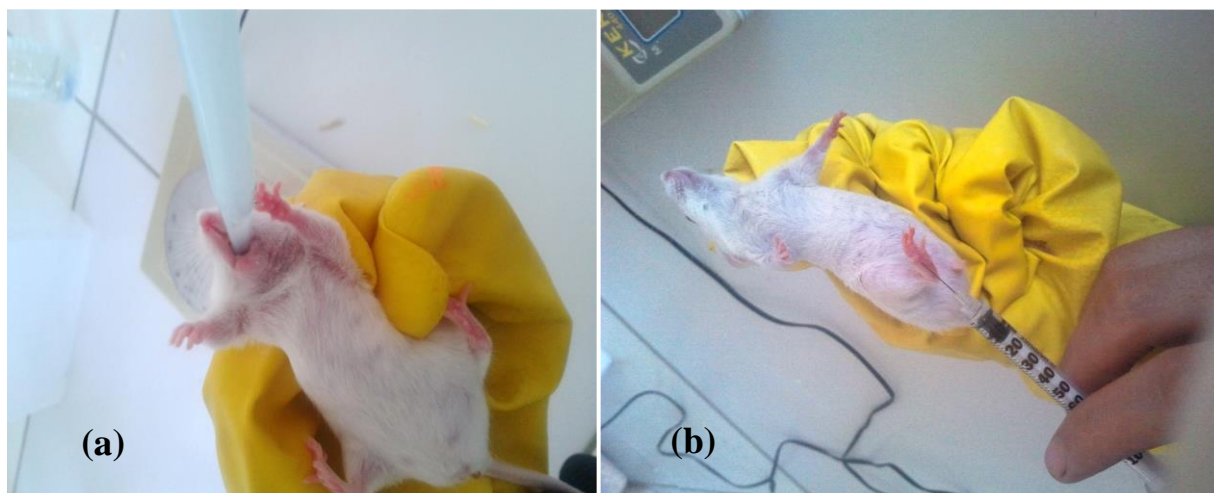


Figure n°32 : (a) Administration orale d'huile essentielle ; (b) Injection sub-plantaire de la carragénine

L'épaisseur de la patte (mm) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant injection (V_0) et toutes les 60 min pendant 6 H après induction de l'inflammation (**figure n°33**) (Vasudevan *et al.*, 2006).



Figure n°33 : Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule suivante (**Lanhers et al., 1992**):

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(V_t - V_0)_{\text{témoin}} - (V_t - V_0)_{\text{traité}}] \times 100 / (V_t - V_0)_{\text{témoin}}$$

Nous considérons :

V_0 : Volume de la patte avant injection de la carragénine ;

V_t : Volume de la patte à un intervalle de temps déterminé après injection de la carragénine.

- **Analyse statistique**

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été réalisée en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'écart-type. L'étude statistique a été effectuée par le logiciel R en utilisant ANOVA suivie du test de HSD Tukey. Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives au seuil de probabilité de 5 % ($p < 0.05$).

Chapitre V

Résultats et Discussion

V.1- Matériel végétal

V.1.1- Taux d'humidité

La détermination de l'humidité des feuilles de l'espèce *Thymus vulgaris* a révélé un taux de 50.89% pour celles de Tlemcen et de 72.2% pour celles de Mostaganem, ce qui signifie que le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction des huiles essentielles est de 49.11% et 27.8%, respectivement (**figure n°34**).

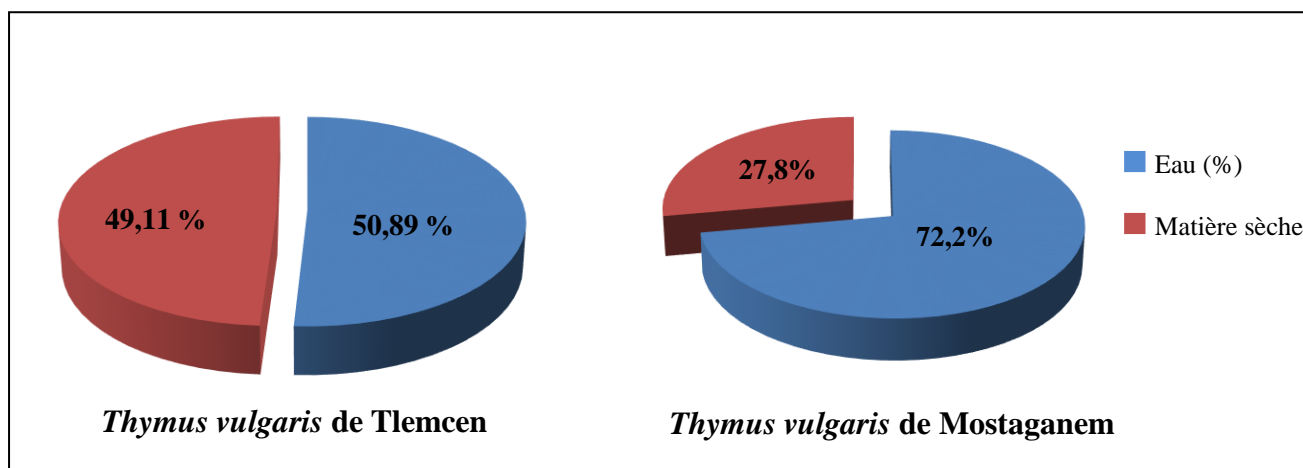


Figure n°34 : Taux d'humidité de l'espèce *Thymus vulgaris*

Les feuilles de *Juniperus phoenicea* ont présenté une teneur en eau de 46%, ce qui signifie que la teneur en matière sèche à partir de laquelle les huiles essentielles ont été extraites a été de 54% (**figure n°35**).

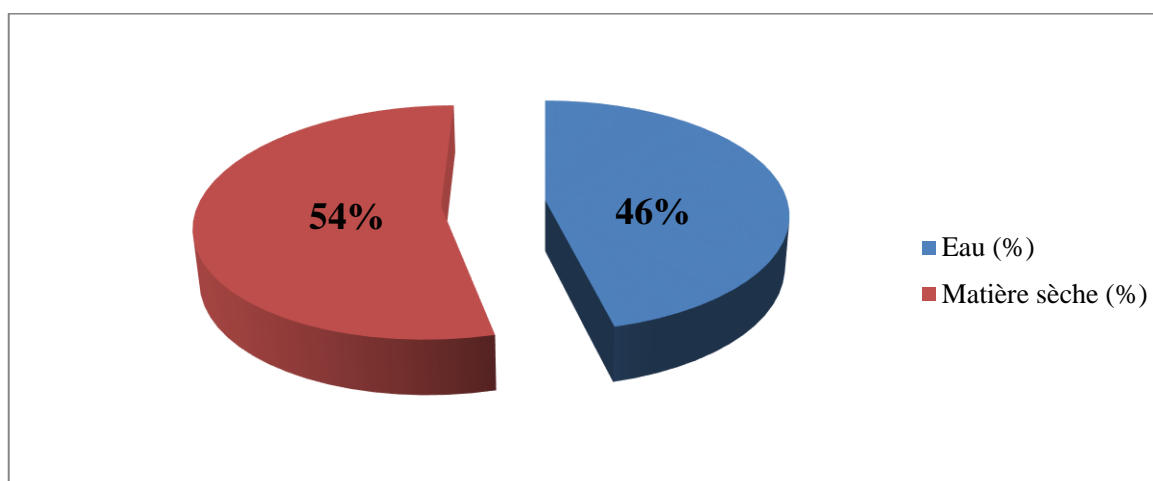


Figure n°35 : Taux d'humidité de l'espèce *Juniperus phoenicea*

Le thym de Mostaganem a présenté un taux d'humidité nettement supérieur à celui de Tlemcen. Ce taux se trouve être proche de celui obtenu par **Shabnum et Wagay (2011)** de l'espèce en provenance du nord d'Italie (75.15%). Par ailleurs, les taux de nos deux plantes sont beaucoup plus importants comparé à celui obtenu par **Yakhlef (2010)** pour le thym originaire de Batna, à l'est de l'Algérie (9.40%).

Concernant *Juniperus phoenicea*, le pourcentage d'humidité est également important (46%) se trouvant être d'ailleurs légèrement élevé par rapport à celui de la plante récoltée au sud-ouest de l'Algérie et plus précisément, dans les montagnes de l'Atlas saharien à Naâma et qui est de 41.9% (**Bouyahyaoui et al., 2016**). Celui obtenu par la même espèce au Maroc a été de 32% (**Achak, 2006**), ce qui est nettement plus faible que celui de l'espèce Algérienne.

Les variations rencontrées dans la teneur en eau de nos échantillons comparé aux travaux précités, peuvent être dues à des facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques et la répartition géographique (**Besombes, 2008**). Ceci pourrait également expliquer la grande différence observée entre le thym de Tlemcen et celui de Mostaganem. En effet, la première plante provient d'une région à climat semi-aride tandis que la deuxième, d'une région côtière avec un climat très humide.

V.1.2- Screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des parties aériennes traitées des deux espèces sélectionnées, par des réactions qualitatives de caractérisation, a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes chimiques. Les résultats obtenus sont résumés dans les **tableaux n°3 et 4**.

Tableau n°3 : Résultats du screening phytochimique de *Thymus vulgaris* :

| <i>Composés phytochimiques recherchés</i> | | <i>Thym de Tlemcen</i> | | <i>Thym de Mostaganem</i> | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
| | | <i>Feuilles</i> | <i>Tiges</i> | <i>Feuilles</i> | <i>Tiges</i> |
| Alcaloïdes | <i>Réactif de Mayer</i> | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | <i>Réactif de Wagner</i> | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Tanins</i> | <i>Réaction avec FeCl₃</i> | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | <i>Tanins galliques</i> | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | <i>Tanins catéchiques</i> | - | - | - | - |
| Flavonoïdes | <i>Anthocyanes</i> | - | - | - | - |
| | <i>Flavonoïdes libres</i> | +++ | +++ | +++ | ++ |

| | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | <i>Leucoanthocyanes</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| <i>Anthraquinones</i> | <i>Dérivés anthracéniques libres</i> | ++ | - | + | - | |
| | <i>Dérivés anthracéniques combinés</i> | <i>O-hétérosides</i> | +++ | ++ | ++ | ++ |
| | | <i>O-hétérosides à génine réduite</i> | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | | <i>C-hétérosides</i> | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Saponosides</i> | | - | + | - | + | |
| <i>Stérols and triterpènes</i> | | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| <i>Caroténoïdes</i> | | +++ | - | +++ | - | |
| <i>Coumarines</i> | | +++ | + | +++ | + | |
| <i>Autres caractérisations</i> | <i>Composés réducteurs</i> | +++ | ++ | +++ | ++ | |
| | <i>Oses et holosides</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | |
| | <i>Mucilages</i> | +++ | + | +++ | + | |
| | <i>Hétérosides cyanogénétiques</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | |

(+) : Présents ; (++) : abondants ; (+++) : très abondants ; (-) : absents.

Le tableau ci-dessus (**tableau n°3**) présente les résultats du criblage phytochimique de l'espèce *Thymus vulgaris*. Nous constatons que les feuilles et les tiges des deux plantes de thym contiennent, avec des intensités plus ou moins variables, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des dérivés anthracéniques combinés, des stérols et triterpènes, des coumarines, des composés réducteurs, des oses et holosides, des mucilages et des hétérosides cyanogénétiques, tandis que, les anthocyanes et les tanins catéchiques sont absents. Des différences sont néanmoins observées entre les deux parties des plantes. En effet, l'analyse phytochimique a montré l'absence des dérivés anthracéniques libres et des caroténoïdes dans les tiges et des saponosides dans les feuilles.

Nos résultats corroborent ceux obtenus par **Oyewole et al. (2010)**; **Nema et al. (2015)**; **Abdirahman et Batool, (2016)**. En effet, ces derniers ont indiqué la présence des flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et des stérols et triterpènes dans la partie aérienne de *T. vulgaris* tandis que **Hossain et al. (2013)**, ont montré que les composés suscités, à l'exception des flavonoïdes, étaient absents. D'autre part, les saponosides absents dans les feuilles de nos deux plantes, ont été mis en évidence dans les quatre travaux précités.

Des analyses faites par **Abdirahman et Batool (2016)** et **Mehreen et al. (2016)** rapportent respectivement, l'absence des coumarines et des glucides dans les extraits de

T. vulgaris alors que notre étude indique leur présence en abondance et plus particulièrement, dans les feuilles.

Tableau n°4 : Résultats du screening phytochimique de *Juniperus phoenicea* :

| Composés phytochimiques recherchés | | Feuilles | Rameaux | Baies | |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------|-------|-----|
| Alcaloïdes | Réactif de Mayer | +++ | +++ | +++ | |
| | Réactif de Wagner | ++ | ++ | + | |
| Tanins | Réaction avec FeCl ₃ | +++ | +++ | - | |
| | Tanins galliques | - | - | - | |
| | Tanins catéchiques | ++ | +++ | - | |
| Flavonoïdes | Anthocyanes | - | - | - | |
| | Flavonoïdes libres | +++ | +++ | ++ | |
| | Leucoanthocyanes | +++ | +++ | +++ | |
| Anthraquinones | Dérivés anthracéniques libres | | + | ++ | - |
| | Dérivés anthracéniques combinés | O-hétérosides | +++ | +++ | + |
| | | O-hétérosides à génine réduite | +++ | +++ | +++ |
| | | C-hétérosides | +++ | +++ | +++ |
| Saponosides | | - | - | - | |
| Stérols and triterpènes | | +++ | +++ | +++ | |
| Caroténoïdes | | - | - | - | |
| Coumarines | | ++ | ++ | ++ | |
| Autres caractérisations | Composés réducteurs | | +++ | +++ | +++ |
| | Oses and holosides | | +++ | +++ | +++ |
| | Mucilages | | + | + | +++ |
| | Hétérosides cyanogénétiques | | +++ | +++ | - |

(+) : Présents ; (++) : abondants ; (+++) : très abondants ; (-) : absents.

Les résultats du criblage phytochimique de *Juniperus phoenicea* mentionnés dans le **tableau n°4**, indiquent la présence dans les trois parties de la plante de divers composés avec une grande abondance pour la plupart. Il s'agit notamment, des alcaloïdes, des flavonoïdes (flavonoïdes libres et leucoanthocyanes), des dérivés anthracéniques combinés, des stérols et triterpènes, des coumarines, des composés réducteurs, des oses et holosides et des mucilages. D'autres constituants incluant les anthocyanes, les tanins galliques, les saponosides et les caroténoïdes sont absents. Des différences sont toutefois observées entre les trois parties

aériennes. En effet, les tanins (révélés par la réaction avec le trichlorure de fer (FeCl₃) et les tanins catéchiques), les dérivés anthracéniques libres et les hétérosides cyanogénétiques mis en évidence dans les feuilles et les rameaux du genévrier, s'avèrent être absents dans les baies.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par les travaux d'**Alzand et al. (2014)**, **Latif et al. (2014)** et **Fadel et al. (2016)**. En effet, ces derniers ont signalé la présence des tanins, flavonoïdes et alcaloïdes dans les extraits de *J. phoenicea* tandis que, **Makhloufi et al. (2014)** et **Amalich et al. (2016)** ont rapporté respectivement, l'absence des tanins et des alcaloïdes.

Une autre étude faite par **El-Sawi et al. (2014)** confirme la présence des flavonoïdes mais aussi, des glucides et des stérols et triterpènes dans les feuilles et les fruits de la plante, en revanche, elle rapporte l'absence des coumarines, des anthraquinones et des alcaloïdes.

L'étude menée par **Amalich et al. (2016)** sur les mucilages, les oses et les holosides confirment nos résultats contrairement à celle réalisée par **Makhloufi et al. (2014)**. D'autre part, la recherche des tanins galliques et des saponosides révélée négative au cours de notre analyse, a été au contraire, positive selon l'étude de **Fadel et al. (2016)**. Tandis que les coumarines, se trouvant en abondance dans nos trois échantillons, se sont avérées selon l'étude de **Medini et al. (2013)**, absentes dans les extraits d'éthyle acétate et d'éther de pétrole et présentes en très petite quantité dans l'extrait méthanolique de l'espèce.

Les composés phytochimiques sont connus pour posséder divers propriétés biologiques qui peuvent contribuer à l'utilisation de *J. Phoenicea* et de *T. vulgaris* comme remèdes en médecine traditionnelle. Nous citons les alcaloïdes qui ont été rapportés comme étant cytotoxiques, antihypertensifs et antiarhythmiques (**Saxena et al., 2013**). Les tanins peuvent exercer des effets astringents, antidiarrhéiques, diurétiques, hémostatiques, antioxydants, anti-inflammatoires et antimicrobiens (**De Bruyne et al., 1999 ; Dolara et al., 2005; Geetha et Geetha, 2014**). Les flavonoïdes, en plus des trois dernières propriétés suscitées, sont connus pour être des anti-allergiques, cytotoxiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiant, diurétiques, antiviraux et cytotoxiques (**Kokate, 1997 ; Ayoola et al., 2008; Bruneton, 2009**). D'autres phytoconstituants tels que les anthraquinones possèdent des activités antimicrobiennes et anti-inflammatoires (**Just et al., 1998; Wuthi-udomlert et al., 2010**), tout comme les coumarines qui ont en plus, la propriété d'être anticoagulantes (**Somboro et al., 2011**). Les composés réducteurs tels que les glycosides sont capables d'abaisser la tension artérielle (**Nyarko et Addy, 1990**). Les terpènes, en général, possèdent des propriétés anticarcinogéniques, antimalariales, antiulcéreuses, antimicrobiennes ou encore, diurétiques

(Langenheim, 1994 ; Dudareva *et al.*, 2004). Les saponosides sont quant à eux, connus pour leurs activités antifongiques, anti-inflammatoires, analgésiques, hémolytiques, immunostimulantes, hypocholestérolémiantes, anticarcinogéniques, antioxydantes et antivirales (Morrissey et Osbourn, 1999 ; Takechi *et al.*, 1999 ; Traore *et al.*, 2000; Roux et Catier, 2007).

Les différents phytoconstitués présents dans les deux espèces étudiées sont non seulement considérés comme des constituants chimiques médicinaux actifs (Lingarao et Savithramma, 2011) mais aussi, des métabolites secondaires importants pour les plantes elles-mêmes. En effet, de part leurs diverses propriétés biologiques, ils confèrent de très bons effets pour les végétaux. Molyneux *et al.* (1996) rapportent que les alcaloïdes sont capables d'assurer la survie et la protection des plantes contre différents agents agresseurs comme les microorganismes, les insectes et les herbivores. Ils peuvent même agir contre d'autres plantes susceptibles d'être nuisibles par le biais de leur activité allélopathique. D'autre part, Anyasor *et al.* (2010) signalent l'implication des saponosides dans la résistance végétale aux maladies en raison de leur activité antimicrobienne tandis que, Winkel-Shirley (2001) montrent que les flavonoïdes jouent un rôle très important en protégeant les plantes contre le stress hydrique et en générant leur tolérance aux métaux lourds présents dans les sols.

V.1.3- Composition minérale et teneurs en métaux lourds

Les résultats du dosage des éléments minéraux et des métaux lourds dans les parties aériennes des trois plantes sélectionnées sont regroupés dans le **tableau n°5**.

Tableau n°5 : Résultats de la minéralisation de *Thymus vulgaris* L. et de *Juniperus phoenicea* L. :

| Elément (ppm) | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | | <i>J. phoenicea</i> | |
|---------------|-------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|---------------------|------------|
| | Feuilles | Tiges | Feuilles | Tiges | Feuilles | Tiges |
| Ag | < 0.0032 | < 0.0032 | < 0.0032 | < 0.0032 | < 0.0032 | < 0.0032 |
| Al | 1.21±0.25 | 2.01±1.05 | 3.05±0.15 | 6.32±1.16 | 3.57±0.29 | 2.67±0.24 |
| As | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 |
| B | 0.19±0.01 | 0.37±0.19 | 0.31±0.08 | 0.42±0.05 | 0.15±0.01 | 0.20±0.07 |
| Ba | 0.20±0.09 | 0.20±0.08 | 0.09±0.01 | 0.13±0.04 | 0.20±0.04 | 0.28±0.10 |
| Be | 0.001±0.0001 | 0.001±0.0002 | 0.001±0.00 | 0.001±0.0001 | 0.001±0.0001 | 0.001±0.00 |

| | | | | | | |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| Bi | < 0.0510 | < 0.0510 | < 0.0510 | < 0.0510 | < 0.0510 | < 0.0510 |
| Ca | 45.19±19.17 | 25.87±1.70 | 33.49±5.18 | 47.68±2.87 | 52.71±10.27 | 31.19±1.86 |
| Cd | < 0.0040 | < 0.0040 | < 0.0040 | < 0.0040 | < 0.0040 | < 0.0040 |
| Co | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 | < 0.0100 |
| Cr | 0.02±0.001 | 0.01±0.004 | 0.02 ±0.003 | 0.06±0.03 | 0.09±0.02 | 0.04±0.02 |
| Cu | 0.09±0.02 | 0.09±0.03 | 0.10 ±0.01 | 0.11±0.01 | 0.04±0.01 | 0.02±0.003 |
| Fe | 2.12±0.19 | 3.75±1.95 | 4.31±0.26 | 9.11±1.77 | 7.84±0.60 | 5.88±0.72 |
| K | 133.08±28.19 | 206.19±97.58 | 182.38±29.29 | 170.97±11.94 | 31.74±1.80 | 55.28±5.95 |
| Li | 0.005±0.003 | 0.02±0.01 | 0.01±0.01 | 0.01±0.005 | < 0.0024 | < 0.0024 |
| Mg | 17.17±1.71 | 34.33±17.68 | 36.92±4.002 | 71.81±13.74 | 7.63±2.18 | 16.06±3.09 |
| Mn | 0.13±0.01 | 0.27±0.15 | 0.26±0.05 | 0.60±0.14 | 0.23±0.01 | 0.33±0.03 |
| Mo | < 1.9280 | < 1.9280 | < 1.9280 | < 1.9280 | < 1.9280 | < 1.9280 |
| Na | 34.59±4.90 | 31.79±9.89 | 28.21±2.21 | 22.15±0.43 | 42.17±1.48 | 33.36±8.34 |
| Ni | 0.04±0.01 | < 0.0210 | < 0.0210 | 0.04±0.02 | 0.05±0.01 | 0.03±0.003 |
| P | 30.23±4.81 | 33.11±12.92 | 31.51±3.67 | 34.45±3.55 | 40.13±0.88 | 40.50±5.69 |
| Pb | < 0.0110 | < 0.0110 | < 0.0110 | < 0.0110 | < 0.0110 | < 0.0110 |
| Sb | < 0.0210 | < 0.0210 | < 0.0210 | < 0.0210 | < 0.0210 | < 0.0210 |
| Se | < 0.0570 | < 0.0570 | < 0.0570 | < 0.0570 | < 0.0570 | < 0.0570 |
| Si | 5.51±0.28 | 4.82±0.87 | 5.01±0.14 | 4.95±0.62 | 5.44±0.46 | 4.87±0.34 |
| Sn | 0.54±0.41 | 0.46±0.11 | 0.36 ±0.14 | 0.39±0.31 | 0.51±0.11 | 0.49±0.05 |
| Sr | 0.28±0.07 | 0.21±0.06 | 0.21±0.03 | 0.21±0.01 | 0.22±0.004 | 0.47±0.08 |
| Ti | 0.02±0.003 | 0.06±0.01 | 0.09±0.01 | 0.21±0.04 | 0.06±0.01 | 0.05±0.01 |
| V | < 0.0031 | < 0.0031 | < 0.0031 | < 0.0031 | < 0.0031 | < 0.0031 |
| W | < 0.0060 | < 0.0060 | < 0.0060 | < 0.0060 | < 0.0060 | < 0.0060 |
| Zn | 0.14±0.01 | 0.23±0.12 | 0.25±0.03 | 0.45±0.06 | 0.14±0.03 | 0.15±0.01 |
| Zr | 0.04±0.004 | 0.03±0.001 | 0.03±0.002 | 0.04±0.001 | 0.04±0.01 | 0.04±0.02 |

Toutes les valeurs (ppm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type

Nous constatons que les trois plantes sont riches en calcium, potassium, sodium, magnésium, et phosphore. Les teneurs en calcium (excepté pour le thym de Mostaganem) et en sodium sont plus importantes dans les feuilles (de 45.19 à 52.71 ppm et de 28.21 à 42.17 ppm, respectivement) que dans les tiges (de 25.87 à 31.19 ppm et de 22.15 à 33.36 ppm, respectivement). Par contre, les teneurs en potassium (sauf pour le thym de Mostaganem) et en magnésium sont plus élevées dans les tiges (de 55.280 à 206.19 ppm et de 16.06 à 71.81 ppm, respectivement) que dans les feuilles (de 31.74 à 133.08 ppm et de 7.63 à 36.92 ppm, respectivement). Tandis que, les concentrations du phosphore sont plus ou moins équivalentes dans les deux parties des plantes. Par ailleurs, les trois espèces ne contiennent le reste des éléments détectés qu'à de faibles teneurs c'est le cas par exemple, de l'aluminium (Al), fer (Fe), bore (B), baryum (B), manganèse (Mn), silicium (Si), zinc (Zn), étain (Sn) et strontium (Sr), ou encore, en traces comme le béryllium (Be), le chrome (Cr) et le zirconium (Zr). En revanche, d'autres métaux tels que l'argent (Ag), l'arsenic (As), le bismuth (Bi), le cadmium (Cd), le cobalt (Co), le molybdène (Mo), le plomb (Pb), l'antimoine (Sb), le sélénium (Se), le vanadium (V) et le tungstène (W) n'ont pas été détectés.

Des études réalisées sur *T. vulgaris* par **Imelouane et al. (2011)** et **Maghrabi (2014)** ont montré que la richesse de l'espèce en calcium (200511 et 20160 ppm), potassium (177265 et 14185 ppm), magnésium (53873 et 2380 ppm), sodium (937.2 ppm) et phosphore (3968.43 ppm) était nettement plus importante que celle de nos deux plantes. Les métaux lourds étaient également plus concentrés, nous citons : le fer (27095 et 274.1 ppm), le cuivre (8.83 ppm), le zinc (359.46 et 19.56 ppm), le baryum (610.78 ppm), le manganèse (731.41 et 22.29 ppm), le nickel (1.87 ppm), le chrome (1.24 ppm), le sélénium (1.08 ppm), le plomb (88.88 ppm) et le cadmium (1.04 ppm), rappelons que les trois derniers métaux n'ont pas été détectés dans nos échantillons. L'étude de **Abu-Darwish (2009)** a également montré que le plomb, le nickel, le cuivre, le manganèse, le zinc et le fer étaient présents à des teneurs considérables (32.03, 23.85, 13.23, 15.52, 16.18 et 141.3 ppm, respectivement), en revanche, le cadmium, le chrome et le cobalt n'ont pas été détectés.

Concernant *J. phoenicea*, les travaux de **Achak (2006)** ont rapporté que l'espèce était très riche en calcium, potassium et magnésium, leurs concentrations étant respectivement de 610, 204 et 42 ppm. Elles sont alors supérieures à celles relevées dans notre plante. Le sodium est par contre beaucoup moins important (9 ppm). Certains métaux lourds sont également présents à des teneurs appréciables tels que, le fer (19 ppm), le silicium (18 ppm), l'aluminium (13 ppm), le cuivre (4 ppm), le zinc (4 ppm), le sélénium (2 ppm), le manganèse (2 ppm) et le plomb (1 ppm)

tandis que le cobalt, le baryum et le nickel n'ont pas été détectés. De même, l'étude de **Abu-Darwish et Ofir (2014)** a montré que le genévrier contenait du manganèse, zinc, cuivre et fer et ce, à des concentrations maximales de 11.29, 40.71, 71.86 et 190.11 ppm, respectivement, en revanche, le plomb et le cadmium n'ont pas été détectés.

Les teneurs en minéraux et en métaux lourds dépendent de l'espèce végétale et de la capacité de développement et d'absorption de son système racinaire mais aussi, des facteurs environnementaux tels que la température et les propriétés du sol incluant sa nature, le pH, l'aération, l'humidité et la disponibilité des éléments (**Yamamoto et Kozlowski, 1987 ; Forbes et Watson, 1992; Rattan et al., 2005**). Ceci pourrait justifier les différences relatées lors de la comparaison entre nos résultats et ceux obtenus par les travaux suscités.

Les métaux lourds sont considérés comme des polluants, bien que les plantes requièrent certains d'entre eux pour leur croissance et leur entretien, leur accumulation en quantités excessives peut devenir toxique pour les plantes (**Djingova et Kuleff, 2000**). Certains des effets toxiques directs comprennent l'inhibition des enzymes cytoplasmiques et les dommages aux structures cellulaires dues au stress oxydatif (**Assche et Clijsters, 1990 ; Jadia et Fulekar, 2009**). Un exemple d'effet toxique indirect est le remplacement des nutriments essentiels aux sites d'échange de cations des plantes (**Taiz et Zeiger, 2003**). Concernant nos trois plantes, l'analyse a bien indiqué la présence de certains métaux lourds (**tableau n°5**), toutefois, leurs concentrations restent inférieures aux limites maximales autorisées par **FAO/WHO (1984)**. De plus, la majorité d'entre eux n'a pas été détectée, ce qui suggère que les plantes étudiées ne présentent de toxicité ni pour elle-même ni pour l'être humain, et que les niveaux des métaux lourds présents rentrent dans les normes permises pour les herbes médicinales consommées. Par ailleurs, elles constituent d'importantes sources de minéraux et en particulier, de calcium, potassium, sodium, magnésium et phosphore.

V.2- Huiles essentielles

V.2.1- Rendement en huile essentielle

Les rendements moyens en huiles essentielles des parties aériennes de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* extraites respectivement par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau, ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal traité. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau n°6**.

Tableau n°6 : Les rendements en huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Juniperus phoenicea* :

| Huile essentielle | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | <i>J. phoenicea</i> | | |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|-------|
| | | | Feuilles fraîches | Feuilles sèches | Baies |
| Rendement (%) | 4.2 | 2.2 | 0.15 | 0.21 | 0.14 |

Les résultats du **tableau n°6** montrent que les feuilles sèches du thym de Tlemcen ont donné un rendement en huile essentielle de 4.2% qui est le taux le plus élevé comparé à celui obtenu par le thym de Mostaganem (2.2%) et par le genévrier dont le rendement moyen de ses trois parties aériennes, est de l'ordre de 0.17%.

Une étude faite par **Giordani et al. (2008)** sur différentes espèces algériennes du genre *Thymus* dont *T. vulgaris* récoltée de Souk Ahras, à l'est du pays, a permis d'obtenir des rendements moyens en huiles essentielles allant de 2 à 3%. Ces résultats sont relativement proches du rendement du thym récolté de Mostaganem mais restent néanmoins inférieurs à celui du thym de Tlemcen. Une autre étude réalisée par **Brada et al. (2009)** sur l'espèce provenant de Chlef située au nord ouest de l'Algérie, a montré également un rendement très proche de celui du thym de Mostaganem et qui est de l'ordre de 2.6%. D'autre part, des résultats inférieurs aux nôtres ont été obtenus par *T. vulgaris* récoltée au nord du pays et plus exactement, à Blida et Boumerdes correspondant à des taux respectifs de 1.58% (**Bouguerra et al., 2017**) et 1.1% (**Oulebsir-Mohandkaci et al., 2015**).

En dehors de l'Algérie, une étude faite par **Jordán et al. (2006)** sur *T. vulgaris* d'Espagne a donné des résultats semblables aux nôtres (de 2.17 à 4.73%). Un rendement plus élevé en huile essentielle a été noté par **Badi et al. (2004)** pour le thym de Jordanie (5.40%). Tandis que des concentrations plus faibles ont été rapportées en Iran (1.87%) (**Kazemi et al., 2012**), au Mexique (1.7%) (**Soto-Medivil et al., 2006**), au Maroc (1.0%) (**Imelouane et al., 2009; El-Akhal et al., 2015**) et en Inde (0.3%) (**Syamasundar et al., 2008**).

Concernant *J. phoenicea*, nous constatons que les feuilles sèches ont donné le plus grand rendement en huile essentielle (0.21%) comparé aux feuilles fraîches (0.15%) et aux baies (0.14%) (**tableau n°6**). Ces résultats sont nettement plus faibles par rapport à ceux obtenus de l'espèce récoltée de différentes régions d'Algérie. Nous citons l'étude de **Ramdani et al. (2013)** qui a permis d'obtenir à partir d'échantillons provenant de l'est du pays, les rendements suivants : 0.7 % (station de Menâa à Batna), 0.75% (station de Boussâada à M'sila), 0.8%

(station de Boutaleb à Sétif) et 0.92% (station de T'Kout à Batna et station d'Elhadjab à Biskra). Une autre étude faite par **Bekhechi et al. (2012)** à partir de plusieurs stations réparties le long du territoire national, a montré des teneurs très variables en huile essentielle et qui sont comme suit: à l'ouest : 0.32 – 0.89% (station de Aïn Sefra à Naâma) et 0.79 – 1.32% (station de Honâine à Tlemcen), au centre : 0.87 – 1.52% (station de Berine à Djelfa) et à l'est : 0.59 – 1.13% (station de Fesdis à Batna). Toutefois et toujours selon la même étude, la plante prélevée de la station de Ben M'Hidi située à El Tarf, à l'est du pays, a donné des rendements plus faibles que ceux de notre espèce et qui sont de l'ordre de 0.034 – 0.060%.

De nombreux autres travaux effectués sur le genévrier de Phénicie provenant du Portugal, Espagne, Grèce, Egypte, Tunisie et Maroc, montrent des rendements en huile essentielle très variables et très élevés comparés aux nôtres. Ils sont respectivement de 0.41%, 0.66%, 0.58% (**Robert et al., 1996**), 0.36% (**El-Sawi et al., 2007**), 0.90% (**Ennajjar et al., 2009**) et 1.62% (**Derwich et al., 2010**).

Les différences de quantités d'huile essentielle observées chez *Thymus vulgaris* et *Juniperus phoenicea* peuvent être liées selon **Kelen et Tepe (2008)** au choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et de qualité de l'huile essentielle. D'autres facteurs peuvent également influencer tels que la zone géographique de collecte, le climat, la génétique de la plante, l'organe utilisé, le stade de développement, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode ainsi que le matériel d'extraction utilisés (**Sefidkon et al., 2001; Vekiari et al., 2002**).

V.2.2- Analyse de la composition chimique

L'analyse chimique des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG - SM) ont permis d'obtenir les résultats résumés ci-dessous dans les **tableaux n°7 et 8**.

Tableau n°7 : Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

| N° | Composés | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | |
|----|--------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
| | | IR | Aire (%) | IR | Aire (%) |
| 1 | Méthyl-2-méthylbutanoate | 775 | 0.1 | 775 | tr |
| 2 | Ethyl butyl kétone | 886 | tr | 885 | tr |
| 3 | α -Thujène | 934 | 1.0 | 934 | 1.0 |
| 4 | α -Pinène | 944 | 1.6 | 944 | 5.7 |

| | | | | | |
|----|---------------------------------|------|------|------|-----|
| 5 | Thuja-2,4(10)-diène isomère | 953 | tr | 952 | tr |
| 6 | Camphène | 961 | 0.1 | 961 | 0.4 |
| 7 | Thuja-2,4(10)-diène | 965 | tr | 965 | tr |
| 8 | 1-Octen-3-ol | 978 | 0.1 | 978 | 0.6 |
| 9 | Sabinène | 983 | tr | 983 | tr |
| 10 | 3-Octanone | 986 | 0.1 | 986 | 0.3 |
| 11 | β -Pinène | 990 | 0.2 | 990 | 0.4 |
| 12 | Myrcène | 993 | 1.4 | 993 | 1.4 |
| 13 | 3-Octanol | 995 | 0.1 | 995 | 0.1 |
| 14 | α -Phellandrène | 1014 | 0.2 | 1014 | 0.2 |
| 15 | δ -3-Carène | 1021 | 0.1 | 1021 | 0.1 |
| 16 | α -Terpinène | 1026 | 1.3 | 1026 | 1.1 |
| 17 | <i>p</i> -Cymène | 1033 | 6.0 | 1033 | 5.6 |
| 18 | Limonène | 1038 | 0.4 | 1038 | 1.0 |
| 19 | β -Phellandrène | 1041 | 0.2 | 1041 | 0.3 |
| 20 | (<i>E</i>)- β -Ocimène | 1050 | 0.1 | 1050 | 0.1 |
| 21 | γ -Terpinène | 1067 | 10.1 | 1067 | 8.7 |
| 22 | <i>cis</i> -Sabinène hydrate | 1077 | 0.1 | 1077 | 0.1 |
| 23 | 3-Nonen-1-ol | 1080 | 0.1 | 1079 | 0.2 |
| 24 | 3-Nonanone | 1087 | tr | 1087 | tr |
| 25 | <i>trans</i> -Linalool oxyde | 1096 | tr | 1096 | tr |
| 26 | Terpinolène | 1098 | 0.1 | 1098 | 0.1 |
| 27 | Linalool | 1102 | 2.7 | 1102 | 5.1 |
| 28 | Nonanal | 1105 | 0.1 | 1105 | 0.1 |
| 29 | <i>trans</i> -Sabinène hydrate | 1109 | 0.1 | 1109 | 0.1 |
| 30 | <i>trans</i> -Pinocarvéol | 1156 | tr | 1156 | 0.1 |
| 31 | <i>cis</i> -Verbénol | 1158 | tr | 1158 | 0.1 |
| 32 | <i>p</i> -Mentha-1,5-diène-8-ol | 1179 | tr | 1178 | tr |
| 33 | Bornéol | 1183 | 0.1 | 1183 | 1.2 |
| 34 | Terpinen-4-ol | 1192 | 0.4 | 1192 | 0.4 |
| 35 | <i>p</i> -Cymen-8-ol | 1194 | tr | 1194 | 0.1 |
| 36 | α -Terpinéol | 1203 | 0.1 | 1203 | 0.1 |
| 37 | <i>cis</i> -Dihydrocarvone | 1211 | 0.1 | 1211 | 0.2 |
| 38 | <i>trans</i> -Dihydrocarvone | 1220 | 0.1 | 1220 | 0.3 |

| | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|------|-------------|------|-------------|
| 39 | <i>trans</i> -Carvéol | 1230 | tr | 1230 | tr |
| 40 | Carvacrol méthyl éther | 1251 | 0.1 | 1251 | 0.3 |
| 41 | Carvone | 1259 | tr | 1259 | 0.1 |
| 42 | Thymol méthyl éther | 1294 | 2.9 | 1294 | 0.7 |
| 43 | Carvacrol | 1300 | tr | 1300 | tr |
| 44 | Thymol | 1309 | 67.3 | 1309 | 59.5 |
| 45 | Eugénol | 1369 | tr | 1370 | tr |
| 46 | α -Copaène | 1400 | tr | 1400 | tr |
| 47 | β -Bourbonène | 1413 | tr | 1413 | 0.1 |
| 48 | (<i>E</i>)- β -Caryophyllène | 1451 | 1.4 | 1451 | 1.9 |
| 49 | β -Copaène | 1458 | tr | 1458 | 0.1 |
| 50 | Aromadendrène | 1471 | 0.1 | 1471 | 0.2 |
| 51 | α -Humulène | 1486 | tr | 1486 | 0.1 |
| 52 | <i>allo</i> -Aromadendrène | 1493 | tr | 1494 | 0.1 |
| 53 | γ -Muuroolène | 1501 | 0.1 | 1501 | 0.1 |
| 54 | Germacrène D | 1511 | tr | 1512 | 0.1 |
| 55 | Ledène | 1525 | 0.1 | 1525 | 0.2 |
| 56 | Bicyclogermacrène | 1527 | tr | 1527 | 0.1 |
| 57 | γ -Cadinène | 1541 | 0.1 | 1542 | 0.1 |
| 58 | δ -Cadinène | 1546 | 0.1 | 1546 | 0.2 |
| 59 | Cadina-1,4-diène | 1559 | tr | 1559 | tr |
| 60 | α -Cadinène | 1564 | tr | 1564 | tr |
| 61 | Spathuléol | 1612 | 0.1 | 1612 | 0.3 |
| 62 | Caryophyllène oxyde | 1621 | 0.2 | 1622 | 0.2 |
| 63 | Globulol | 1630 | tr | 1630 | tr |
| 64 | Isospathuléol | 1670 | 0.1 | 1670 | 0.1 |
| 65 | τ -Cadinol | 1672 | tr | 1672 | tr |
| 66 | α -Cadinol | 1685 | tr | 1685 | tr |
| Total identifiés | | | 99.0 | | 99.3 |

IR : Indice de rétention ; tr : Traces (valeurs moins de 0.05%).

Nous constatons selon les résultats d'analyse présentés dans le **tableau n°7** que les huiles essentielles des feuilles sèches de *T. vulgaris* de Tlemcen et de Mostaganem, renferment 66 composés volatiles représentant un total de 99.0% et 99.3%, respectivement. Ces échantillons sont principalement constitués d'un mélange de monoterpènes, de sesquiterpènes et de leurs dérivés oxygénés. Ils sont principalement riches en thymol qui représente le composant majeur avec un taux de 67.3% dans le thym de Tlemcen et de 59.5% dans celui de Mostaganem. D'autres constituants sont également présents à des teneurs appréciables : γ -terpinène (8.7 – 10.1%), *p*-cymène (5.6 – 6.0%), α -pinène (1.6 - 5.7%), linalool (2.7 - 5.1%), thymol méthyl éther (0.7 - 2.9%), (E)- β -caryophyllène (1.4 - 1.9%), myrcène (1.4%), α -terpinène (1.1 – 1.3%) et α -thujène (1.0%).

La forte prédominance du thymol indique qu'il représente le chémotype des deux huiles essentielles de *T. vulgaris*. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la même espèce originaire d'Égypte (**Aziz et al., 2008**), Arabie Saoudite (**Agili, 2014**), Italie (**Mancini et al., 2015**), Roumanie (**Borugă et al., 2014**) et Brésil (**Porte et Godoy, 2008**). En effet, le thymol a été identifié comme étant le composant majeur présent à des teneurs allant de 44.4 à 67.5%. Celui-ci décrit également le chémotype de différentes espèces de *Thymus* en Algérie notamment, *T. algeriensis* (29.5%), *T. pallescens* (49.3%) (**Hazzit et al., 2009**), *T. fontanesii* (67.8%) et *T. numidicus* (68.2%) (**Kabouche et al., 2005**), en revanche, concernant *T. vulgaris*, **Bouguerra et al. (2017)** ont montré que l'huile essentielle de Blida (nord d'Algérie) est caractérisée par le linalool à 82.88% alors que le thymol représente seulement 4.92%. D'autre part, **Brada et al. (2009)** ont montré que celle de Chlef (nord ouest d'Algérie) est représentée principalement par le carvacrol (48.4%) alors que le thymol n'est présent qu'à 5.6%. Par comparaison, nos deux échantillons contiennent le linalool à des concentrations nettement plus faibles (2.7 – 5.1%) tandis que le carvacrol ne se trouve qu'en traces.

D'autres travaux effectués sur *T. vulgaris* provenant d'Espagne (**Jordan et al., 2006**), Iran (**Kazemi et al., 2012**), Mexique (**Soto-Mendivil et al., 2006**) et Jordanie (**Hudaib et Aburjai, 2007**) rapportent que l'huile essentielle est représentée respectivement par le chémotype 1,8-cinéole, camphre, bornéol et carvacrol. Par comparaison, les deux premiers composés sont absents dans nos deux huiles essentielles tandis que les deux derniers se trouvent en faibles quantités ou encore, en traces.

Selon **Badi et al. (2004)** et **Sefidkon et al. (2009)**, le début de floraison est la période la plus propice à l'obtention du meilleur rendement en huile essentielle et de la teneur la plus élevée en thymol chez *Thymus vulgaris* L.. Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus lors des analyses de nos deux plantes, qui ont été récoltées durant le mois de mai, sachant que la période de floraison de l'espèce a lieu de mai à août (**Hoffman, 2003**).

Les résultats de l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* par CPG-SM sont regroupés dans le **tableau n°8**.

Tableau n°8 : Composition chimique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* :

| N° | Composés | IR | Feuilles fraîches | Feuilles sèches | Baies |
|----|--------------------------------|------|-------------------|-----------------|-------|
| 1 | Tricyclène | 934 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| 2 | α -Pinène | 945 | 25.1 | 20.3 | 43.7 |
| 3 | α -Fenchène | 959 | tr | - | 0.1 |
| 4 | Camphène | 961 | 0.1 | 0.1 | 0.3 |
| 5 | Thuja-2,4(10)-diène | 965 | tr | - | 2.9 |
| 6 | Sabinène | 983 | 0.3 | 0.2 | 0.4 |
| 7 | β -Pinène | 990 | 1.4 | 1.3 | 1.1 |
| 8 | Myrcène | 993 | 8.5 | 8.2 | 2.1 |
| 9 | 2,3-Dehydro-1,8-cinéole | 999 | - | - | 0.1 |
| 10 | Verbenène | 1001 | - | - | 0.5 |
| 11 | δ -2-Carène | 1010 | 0.7 | 0.7 | 0.2 |
| 12 | 1,3,8- <i>p</i> -Menthatriène | 1013 | - | - | 1.4 |
| 13 | α -Phellandrène | 1014 | 4.7 | 4.5 | - |
| 14 | <i>o</i> -Cymène | 1021 | - | - | 0.1 |
| 15 | α -Terpinène | 1025 | 0.1 | 0.1 | 0.3 |
| 16 | <i>m</i> -Cymène | 1029 | - | - | tr |
| 17 | <i>p</i> -Cymène | 1033 | 2.7 | 3.0 | 5.8 |
| 18 | Limonène | 1039 | 2.3 | 2.5 | 2.1 |
| 19 | β -Phellandrène | 1042 | 43.9 | 44.9 | 4.6 |
| 20 | (<i>E</i>)- β -Ocimène | 1050 | 0.1 | 0.1 | - |
| 21 | γ -Terpinène | 1067 | 0.1 | 0.1 | 0.3 |
| 22 | Terpinolène | 1097 | 1.7 | 1.8 | - |
| 23 | <i>p</i> -Cymène | 1098 | - | - | 1.4 |
| 24 | Linalool | 1102 | tr | - | - |

| | | | | | |
|----|------------------------------------------|------|-----|-----|-----|
| 25 | Perillène | 1105 | tr | - | 0.2 |
| 26 | <i>cis</i> -Thujone | 1129 | - | - | tr |
| 27 | <i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol | 1134 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| 28 | α -Campholénal | 1138 | 0.1 | 0.1 | 4.0 |
| 29 | <i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol | 1151 | 0.1 | - | 0.3 |
| 30 | <i>cis</i> -Verbénol | 1154 | tr | - | 0.3 |
| 31 | <i>trans</i> -Pinocarvéol | 1156 | 0.1 | 0.1 | 1.7 |
| 32 | <i>trans</i> -Verbénol | 1158 | - | - | 1.2 |
| 33 | <i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol | 1178 | - | - | 1.2 |
| 34 | Bornéol | 1183 | - | - | 0.1 |
| 35 | Terpinen-4-ol | 1191 | 0.1 | - | 0.4 |
| 36 | <i>p</i> -Cymen-8-ol | 1194 | - | - | 0.2 |
| 37 | (4 <i>E</i>)-Decenal | 1197 | tr | - | - |
| 38 | α -Terpinéol | 1203 | 0.4 | 0.4 | 4.3 |
| 39 | <i>trans</i> -4-Caranone | 1208 | - | - | 0.2 |
| 40 | Myrténol | 1211 | - | - | 0.5 |
| 41 | Myrténal | 1213 | tr | - | 0.7 |
| 42 | <i>trans</i> -Piperitol | 1219 | - | - | 0.1 |
| 43 | <i>cis</i> -Piperitol | 1220 | tr | - | - |
| 44 | Verbénone | 1226 | - | - | 0.2 |
| 45 | <i>trans</i> -Carvéol | 1230 | - | - | 0.5 |
| 46 | Carvacrol méthyl ether | 1240 | tr | 0.1 | - |
| 47 | Thymol methyl ether | 1251 | tr | - | tr |
| 48 | Cuminaldéhyde | 1256 | tr | - | 0.4 |
| 49 | Carvone | 1258 | - | - | 0.1 |
| 50 | Dec-9-en-1-ol | 1259 | 0.2 | 0.2 | - |
| 51 | Carvotanacétone | 1263 | tr | - | - |
| 52 | <i>cis</i> -Chrysanthényl acétate | 1267 | - | - | 0.1 |
| 53 | Pipériton | 1270 | tr | 0.1 | 0.3 |
| 54 | Phellandral | 1294 | 0.1 | 0.1 | 1.1 |
| 55 | Cumin alcohol | 1301 | - | - | 0.2 |
| 56 | <i>p</i> -Mentha-1,3-dien-7-al | 1302 | - | - | 0.2 |
| 57 | Carvacrol | 1306 | - | - | 0.1 |
| 58 | Déca-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-dien-1-ol | 1314 | - | - | - |

| | | | | | |
|----|--------------------------------------|------|-----|-----|-----|
| 59 | Brasila-1,10-diène | 1319 | - | - | 0.1 |
| 60 | δ -Elemène | 1356 | tr | - | tr |
| 61 | Terpinyl acétate | 1361 | - | 0.2 | 0.1 |
| 62 | α -Cubeben | 1369 | - | - | tr |
| 63 | African-1-ène | 1377 | - | - | tr |
| 64 | α -Copaène | 1400 | tr | - | tr |
| 65 | β -Elemène | 1412 | 0.1 | 0.3 | 0.3 |
| 66 | 2,5-Diméthoxy-4-isopropyltoluène | 1428 | tr | 0.1 | - |
| 67 | Sibirène | 1429 | - | - | - |
| 68 | African-3(15)-ène | 1432 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| 69 | (<i>E</i>)- β -Caryophyllène | 1451 | 0.8 | 1.6 | 1.5 |
| 70 | γ -Elemène | 1453 | - | - | - |
| 71 | β -Copaène | 1458 | tr | - | 0.1 |
| 72 | Thujopsène | 1465 | - | - | - |
| 73 | Cadina-3,5-diène | 1479 | tr | - | - |
| 74 | α -Humulène | 1485 | 0.3 | 0.5 | 0.6 |
| 75 | γ -Muuroène | 1500 | tr | 0.2 | 0.4 |
| 76 | α -Amorphène | 1504 | - | - | - |
| 77 | Bicyclosésquiphellandrène | 1511 | 1.0 | 1.5 | 0.5 |
| 78 | β -Selinène | 1519 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 79 | α -Muuroène | 1523 | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| 80 | α -Selinène | 1526 | - | - | tr |
| 81 | γ -Cadinène | 1541 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| 82 | δ -Cadinène | 1546 | 0.4 | 0.6 | 0.1 |
| 83 | Cadina-4,11-diène | 1559 | tr | - | - |
| 84 | α -Cadinène | 1563 | tr | - | - |
| 85 | α -Calacorène | 1572 | - | - | 0.1 |
| 86 | Elemol | 1573 | 0.2 | 0.2 | - |
| 87 | 4- <i>epi</i> -Maaliol | 1574 | - | 0.2 | - |
| 88 | Salviadienol | 1581 | - | - | 0.5 |
| 89 | Spathuléol | 1613 | - | - | 0.3 |
| 90 | Caryophyllène oxyde | 1621 | 0.5 | 0.6 | 2.7 |
| 91 | Salvial-4(14)-en-1-one | 1631 | - | - | 0.3 |
| 92 | Toriléol | 1642 | - | - | 0.4 |

| | | | | | |
|-------------------------|------------------------------------|------|-------------|-------------|-------------|
| 93 | Humulène époxyde II | 1648 | 0.1 | 0.1 | 0.8 |
| 94 | Alismol | 1658 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| 95 | γ -Eudesmol | 1665 | tr | 0.1 | - |
| 96 | τ -Cadinol | 1670 | tr | - | - |
| 97 | τ -Muurool | 1672 | 0.1 | 0.1 | - |
| 98 | α -Cadinol | 1685 | 0.1 | 0.1 | - |
| 99 | α -Eudesmol | 1689 | - | 0.1 | - |
| 100 | 2,3-Dihydrofarnésol | 1698 | 0.1 | 0.2 | - |
| 101 | 14-Hydroxy-9-épi-(E)-caryophyllène | 1702 | - | - | 0.2 |
| 102 | Cadalène | 1706 | - | - | tr |
| 103 | Eudesma-4(15),7-dien-1-b-ol | 1721 | - | - | 0.3 |
| 104 | Manool oxyde | 2049 | 0.9 | 1.1 | 0.3 |
| Total identifiés | | | 98.1 | 98.3 | 96.4 |

IR : Indice de rétention ; tr : Traces (valeurs moins de 0.05%) ; - : Non identifié.

L'analyse chimique des huiles essentielles des feuilles (fraîches et sèches) et des baies de *J. phoenicea* (**tableau n°8**), a permis d'identifier 63, 46 et 78 composés volatiles représentant un total de 98.1%, 98.3% et 96.4% des huiles respectives. Ces dernières sont riches en composés d'hydrocarbures monoterpéniques. Pour les feuilles, le principal constituant est le β -phellandrène (43.9 - 44.9%) suivi de l' α -pinène (20.3 - 25.1%) et pour les baies, il s'agit de l' α -pinène (43.7%).

De nombreux travaux ont révélé que les huiles essentielles des feuilles et des baies du genévrier de Phénicie originaire du nord du bassin méditerranéen, sont dominées par l' α -pinène incluant, l'Algérie (**Bekhechi et al., 2012**), le Maroc (**Derwich et al., 2010**), la Tunisie (**Ennajar et al., 2007**), l'Egypte (**El-Sawi et al., 2007**), les îles Canaries et Madère (**Adams et al., 2009**). Ceci confirme nos résultats concernant les huiles essentielles des baies. Cependant, une étude menée sur *J. phoenicea* provenant de la région de Tabarka au nord ouest de la Tunisie a rapporté que les huiles des feuilles étaient caractérisées par β -phellandrène (47.14%) (**Riahi et al., 2013**). Ce qui corrobore les résultats constatés dans nos échantillons de feuilles.

Des analyses effectuées sur *J. phoenicea* var. *turbinata* récoltée dans la région de Tarifa en Espagne et de Crotona en Italie, ont révélé également la prédominance des huiles essentielles des feuilles par β -phellandrène. En effet, celui-ci est présent respectivement à des teneurs de 31.5% et 24.6% alors que α -pinène l'est à 25.0% et 17.7% (**Adams et al., 2014**). Un autre rapport sur *J. phoenicea* var. *turbinata* provenant du Portugal a montré que l'huile des feuilles contenait du

β -phellandrène et du α -pinène à des pourcentages plus ou moins équivalents ; 28.8% pour le premier et 27.8% pour le second (Cavaleiro *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'analyse chimique de nos échantillons a permis de révéler la présence d'autres composés à des teneurs appréciables tels que le myrcène (8.2 - 8.5%), α -phellandrène (4.5 - 4.7%), *p*-cymène (2.7 - 3.0%) et limonène (2.3 - 2.5%) en ce qui concerne les feuilles fraîches et sèches et de *p*-cymène (5.8%), β -phellandrène (4.6%), α -terpinéol (4.3%), α -campholénal (4.0%), thuja-2,4(10)-diène (2.9%), oxyde de caryophyllène (2.7%), limonène (2.1%) et myrcène (2.1%) en ce qui concerne les baies. Certains des composés suscités ont également été trouvés à des concentrations non négligeables par des travaux antérieurs. C'est le cas du myrcène (4.0%), limonène (2.2%) (Ait-Ouazzou *et al.*, 2012), α -phellandrène (7.39%) (Derwich *et al.*, 2010) et de l'oxyde de caryophyllène (2.06%) (Alfitori *et al.*, 2014). Toutefois, des constituants tels que δ -3-carène, Germacrène B et Germacrène D rapportés présents par plusieurs auteurs notamment, Derwich *et al.* (2010); Bekhechi *et al.* (2012) et Ramdani *et al.* (2013), sont constatés absents dans nos trois huiles essentielles.

Les variations de composition chimique rencontrées dans les huiles essentielles des deux espèces étudiées du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être attribuées à un ou plusieurs facteurs tels que la zone géographique, le climat, la période de récolte, les conditions de stockage, la durée de séchage, la méthode d'extraction utilisée, la partie de la plante, le stade de développement, le génotype et la présence de chémotype. Tous ces facteurs peuvent influencer les voies de biosynthèse des plantes et avoir des conséquences sur la proportion relative des principaux composés caractéristiques (Ennajar *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010 ; Viuda-Martos *et al.*, 2011). Le facteur chémotype concerne tout particulièrement l'espèce *T. vulgaris*. En effet, celle-ci est très connue pour son polymorphisme chimique (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013). On lui reconnaît généralement sept chémotypes différents : thymol, carvacrol, géraniol, α -terpinéol, thuyanol-4, linalool et 1,8-cinéole (Stahl-Biskup et Sàez, 2002; Bensouilah et Buck, 2006).

V.3- Etude de l'activité antimicrobienne

V.3.1- Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards

L'évaluation de la sensibilité des souches microbiennes testées par antibiogramme et antifongigramme, nous a permis d'obtenir les résultats ci-après (tableau n°9).

Tableau n°9 : Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm :

| Agent anti-microbien | B.c | E.c | P.a | P.m | P.v | C.a | A.b |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| AK | 23.5±0.71 | 28.5±2.12 | 26.5±0.71 | 27±0.00 | 33±0.00 | - | - |
| AML | 9±0.00 | 26±1.41 | 10.5±0.71 | 38.5±2.12 | 0 | - | - |
| AMP | 0 | 24±0.00 | 0 | 39.5±0.71 | 0 | - | - |
| CAR | 9.5±0.71 | 27±1.41 | 26.5±3.54 | 44.5±2.12 | 35.5±0.71 | - | - |
| KZ | 10±0.00 | 27±1.41 | 0 | 33±2.83 | 18.5±0.71 | - | - |
| KF | 12.5±0.71 | 21.5±2.12 | 0 | 35±1.41 | 12±0.00 | - | - |
| C | 26±1.41 | 35±0.00 | 11±0.00 | 34.5±0.71 | 38.5±0.71 | - | - |
| AUG | 7.5±0.71 | 26±0.00 | 11±1.41 | 38.5±2.12 | 0 | - | - |
| DXT | 27±0.00 | 28.5±2.12 | 19±0.00 | 19±1.41 | 23±0.00 | - | - |
| E | 25.5±2.12 | 11±1.41 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| CN | 23.5±0.71 | 23.5±2.12 | 27±0.00 | 25±1.41 | 29.5±0.71 | - | - |
| NA | 23.5±0.71 | 30±0.00 | 9.5±0.71 | 32.5±2.12 | 32±2.83 | - | - |
| N | 22±0.00 | 23.5±0.71 | 13±1.41 | 22.5±2.12 | 24.5±0.71 | - | - |
| NOR | 29±0.00 | 36.5±3.54 | 32.5±3.54 | 42.5±2.12 | 35.5±0.71 | - | - |
| OX | 0 | 0 | 0 | 20±2.83 | 0 | - | - |
| PRL | 17±0.00 | 26±2.83 | 29±1.41 | 42.5±0.71 | 39.5±0.71 | - | - |
| PB | 9.5±0.71 | 16±0.00 | 17.5±0.71 | 12.5±2.12 | 0 | - | - |
| SXT | 22±2.83 | 32.5±0.71 | 0 | 34.5±2.12 | 33±1.41 | - | - |
| TOB | 22.5±0.71 | 23.5±0.71 | 25.5±2.12 | 25±2.83 | 27±1.41 | - | - |
| Econazole | - | - | - | - | - | 29.33±0.58 | 29.67±0.58 |
| Clotrimazole | - | - | - | - | - | 19.33±1.15 | 12.33±1.15 |

B.c: *Bacillus cereus* ATCC 10876; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P.m: *Proteus mirabilis* ATCC 35659; P.v: *Proteus vulgaris* ATCC 6380; C.a: *Candida albicans* ATCC 10231; A.b: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 ; ATCC : American Type Culture Collection.

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type.

Nous constatons d'après les résultats présentés dans **tableau n°9** que les souches bactériennes et fongiques testées ont présenté différents degrés de sensibilité à la plupart des agents antimicrobiens employés. Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés varient entre 7.5 et 44.5 mm.

Selon **Ponce et al. (2003)** et **Moreira et al. (2005)**, la sensibilité des germes a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de plus de 20 mm.

Les antibiotiques qui ont donné les plus grandes zones d'inhibition sont les suivants : carbénicilline (CAR) contre *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (44.5 mm), pipéracilline (PRL) contre *Proteus vulgaris* ATCC 6380 (39.5 mm) et norfloxacine (NOR) contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (36.5 mm, 32.5 mm et 29 mm, respectivement). Par ailleurs, ceux qui se sont montrés inactifs contre plus de deux bactéries sont les suivants : ampicilline (AMP) vis-à-vis de *B. cereus*, *P. aeruginosa* et *P. vulgaris*, oxacilline (OX) vis-à-vis de ces trois dernières et d'*E. coli* ainsi que, erythromycine (E) contre *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* et *P. vulgaris*.

Concernant les antifongiques, l'éconazole s'est avéré être le plus actif, les halos d'inhibition ont été enregistrés à des diamètres de 29.33 mm contre *Candida albicans* ATCC 10231 et de 29.67 mm contre *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 tandis qu'avec le clotrimazole, les diamètres ont été obtenus respectivement à 19.33 mm et 12.33 mm.

V.3.2- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

V.3.2.1- Technique de l'aromatogramme (Méthode de Vincent)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le **tableau n°10**. Nous remarquons que les souches les plus sensibles sont *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231. En effet, celles-ci ont été les seules à être inhibées par toutes les huiles essentielles testées.

N.B : Les résultats sont également illustrés en figures dans l'**annexe n°9**.

Tableau n°10 : Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et de *Juniperus phoenicea* exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm :

| Souches | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | <i>J. phoenicea</i> | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| | | | Feuilles fraîches | Feuilles sèches | Baies |
| <i>B. cereus</i> ATCC 10876 | 59.67 ± 0.58 | 50.33 ± 0.58 | 34.67 ± 0.58 | 31.67 ± 0.58 | 16.67 ± 0.57 |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 33.33 ± 1.15 | 31 ± 0.00 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | 13 ± 1.73 | 11.33 ± 0.58 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. mirabilis</i> ATCC 35659 | 36 ± 0.00 | 35.67 ± 2.31 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. vulgaris</i> ATCC 6380 | 30.33 ± 0.58 | 26.67 ± 0.58 | 0 | 0 | 6.33 ± 0.58 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 42 ± 1.73 | 46.67 ± 0.58 | 11 ± 0.00 | 10.5 ± 0.71 | 9.67 ± 0.57 |
| <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 | 13.33 ± 0.58 | 18 ± 1.73 | 0 | 0 | 0 |

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type; ATCC: American Type Culture Collection.

Les huiles de thym ont exercé un pouvoir antimicrobien très important comparé à celui des huiles du genévrier. Celle de *T. vulgaris* de Tlemcen a été légèrement plus active sur les bactéries que celle de Mostaganem, en revanche sur les moisissures, nous constatons le contraire. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 13 et 59.67 mm pour la première et entre 11.33 et 50.33 mm pour la seconde. Par comparaison entre les souches, la bactérie la moins sensible aux huiles de thym semble être *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tandis que chez les moisissures, il s'agit d'*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. En effet, les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont les plus faibles (de 11.33 à 13 mm et de 13.33 à 18 mm, respectivement). Cela n'est pas surprenant concernant *P. aeruginosa* étant donné que celle-ci est connue pour sa très forte résistance à l'action de la plupart des huiles essentielles (**Dorman et Deans, 2000; Burt, 2004**).

Concernant *J. phoenicea*, à l'exception des deux souches précitées, les huiles des feuilles (fraîches et sèches) et des baies ont été dénuées d'effet contre les cinq autres souches testées.

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue contre *B. cereus* par l'huile des feuilles fraîches (34.67 mm) suivi de très près par celle des feuilles sèches (31.67 mm) puis par celle des baies (16.67 mm). Par ailleurs, l'effet inhibiteur exercé contre *C. albicans* a été nettement moins important. Les diamètres des halos formés varient entre 9.67 et 11 mm.

Des travaux antérieurs confirment que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède un effet antimicrobien puissant contre un large éventail de microorganismes (**Azaz et al., 2004 ; van Vuuren et al., 2009**). Selon **Borugă et al. (2014)**, les diamètres des zones d'inhibition obtenus en testant l'huile sur *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *C. albicans* ATCC 10231 sont respectivement de 30.67 mm, 14 mm et 25.74 mm. Les résultats sont plus ou moins semblables aux nôtres en ce qui concerne les deux bactéries, par contre, la levure semble beaucoup moins sensible. Une autre étude faite par **Al-Maqtari et al. (2011)**, a montré qu'*E. coli* était légèrement plus résistante (23.9 mm) et que *P. aeruginosa* était plus sensible (26.6 mm) à l'huile essentielle. D'autre part, un halo d'un diamètre aussi grand que ceux obtenus par nos huiles contre *B. cereus* ATCC 10876 (supérieur à 45 mm) a été noté par **Hyun et al. (2015)**. La susceptibilité de *Proteus* sp. (**Kazemi et al., 2012**) et d'*Aspergillus* sp. (**da Silva et al., 2012**) a également été constatée.

Certaines études ont rapporté l'inefficacité des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* contre certains germes incluant *E. coli* (**Ait-Ouazzou et al., 2012; Ramdani et al., 2013**) et *P. aeruginosa* (**Mazari et al., 2010; Ait-Ouazzou et al., 2012**). Ce qui est en accord avec nos résultats tandis que, d'autres rapports ont montré que les huiles de l'espèce ont inhibé la croissance des deux bactéries suscitées, en plus de certaines autres souches sélectionnées lors de notre étude. Effectivement, d'après **Bouyahyaoui et al. (2016)**, des zones d'inhibition de diamètres plus ou moins importants ont été obtenus pour *E. coli* (25, 29 et 24 mm), *P. aeruginosa* (18, 19 et 9 mm), *P. mirabilis* (12, 14 et 8 mm) et *C. albicans* (18, 29, 12 mm) par les huiles des feuilles fraîches, feuilles sèches et des baies, respectivement. D'autre part, **El-Sawi et al. (2007)** ont constaté que l'huile des baies était inactive contre certaines souches notamment, *B. cereus* et *C. albicans* alors que celle des feuilles a donné respectivement, des halos de 20 et 28 mm de diamètre.

V.3.2.2- Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)

La détermination des paramètres antimicrobiens (CMI, CMB et CMF) des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* a été effectuée seulement sur les germes ayant présenté une sensibilité par le test d'aromatogramme. Les résultats obtenus sont résumés dans les **tableaux n°11 et 12**.

Nous remarquons que les deux huiles essentielles du thym ont exercé une grande activité contre les sept souches testées (**tableau n°11**). Pour celle de Tlemcen, les valeurs ont été obtenues à une gamme allant de 0.312 à 5 µl/ml pour la CMI, de 0.312 à 10 µl/ml pour la CMB et à 1.25 µl/ml pour la CMF. Pour celle de Mostaganem, la gamme est de 0.312 à 1.25 µl/ml pour la CMI, de 0.312 à 10 µl/ml pour la CMB et de 0.625 à 2.5 µl/ml pour la CMF.

Tableau n°11: Valeurs des paramètres antimicrobiens des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* exprimées en µl/ml:

| Souches | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | | | | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | | | |
|---------|-------------------------------|------------|--------------------|-------------|----------------------------------|------------|--------------------|------------------|
| | CMI | CMB CMF | CMB/CMI CMF/CMI | Activité | CMI | CMB CMF | CMB/CMI CMF/CMI | Activité |
| B.c | 0.312 | 0.312 | 1 | Bactéricide | 0.312 | 0.625 | 2 | Bactéricide |
| E.c | 0.625 | 0.625 | 1 | Bactéricide | 0.312 | 0.312 | 1 | Bactéricide |
| P.a | 5 | 10 | 2 | Bactéricide | 1.25 | 10 | 8 | Bactériostatique |
| P.m | 0.625 | 0.625 | 1 | Bactéricide | 0.312 | 0.312 | 1 | Bactéricide |
| P.v | 0.625 | 0.625 | 1 | Bactéricide | 0.312 | 0.625 | 2 | Bactéricide |
| C.a | 0.312 | 1.25 | 4 | Fongicide | 0.312 | 0.625 | 2 | Fongicide |
| A.b | 0.625 | 1.25 | 2 | Fongicide | 0.625 | 2.5 | 4 | Fongicide |

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; B.c: *Bacillus cereus* ATCC 10876; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P.m: *Proteus mirabilis* ATCC 35659; P.v: *Proteus vulgaris* ATCC 6380; C.a: *Candida albicans* ATCC 10231; A.b: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

La susceptibilité a été particulièrement importante chez *B. cereus* envers l'huile du thym de Tlemcen et chez *E. coli* et *P. mirabilis* envers celle du thym de Mostaganem. Effectivement, la CMI et la CMB ont été toutes deux enregistrées à la plus faible valeur, qui est de l'ordre de 0.312 µl/ml. Par contre, la sensibilité l'est beaucoup moins chez *P. aeruginosa* ; la CMI et la

CMB étant obtenues à des valeurs plus élevées, de 1.25 à 5 µl/ml pour la première et à 10 µl/ml pour la deuxième.

Les résultats du **tableau n°12** montrent que les huiles essentielles de *J. phoenicea* ont été beaucoup plus actives contre *B. cereus* que contre *C. albicans*. Le plus grand effet antimicrobien a été exercé par l'huile des feuilles sèches ; les valeurs de CMI et de CMB ayant été les plus faibles (0.312 et 0.625 µl/ml, respectivement), tandis que pour les huiles des feuilles fraîches et des baies, la CMI et la CMB ont été obtenues respectivement à 1.25 et 2.5 µl/ml. D'autre part, *C. albicans* n'a été sensible qu'envers l'huile essentielle des baies, la CMI et la CMF ont été notées respectivement à 2.5 et 10 µl/ml.

Tableau n°12 : Valeurs des paramètres antimicrobiens des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* exprimées en µl/ml :

| Huile essentielle | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | | | | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | | | |
|-------------------|-----------------------------------|-------|---------|-------------|------------------------------------|------|---------|-----------|
| | CMI | CMB | CMB/CMI | Activité | CMI | CMF | CMF/CMI | Activité |
| Feuilles fraîches | 1.25 | 2.5 | 2 | Bactéricide | > 10 | > 10 | ND | ND |
| Feuilles sèches | 0.312 | 0.625 | 2 | Bactéricide | > 10 | > 10 | ND | ND |
| Baies | 1.25 | 2.5 | 2 | Bactéricide | 2.5 | 10 | 4 | Fongicide |

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; ND : Non déterminée.

Selon **Marmonier (1990)**, si le rapport d'activité CMB/CMI ou CMF/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à 4, cette dernière est qualifiée de substance bactéricide ou fongicide et si le rapport est supérieur à 4, elle est alors dite bactériostatique ou fongistatique. En se référant aux résultats obtenus dans les **tableaux n°11 et 12**, nous constatons d'une part, que les deux huiles de *T. vulgaris*, sont bactéricides et/ou fongicides envers les souches testées, néanmoins, une exception est à noter pour celle de Mostaganem vis-à-vis de *P. aeruginosa* où le rapport CMB/CMI est estimé à 8, elle est alors considérée comme bactériostatique. D'autre part, pour *J. phoenicea*, une activité bactéricide a été mise en évidence pour les trois huiles essentielles contre *B. cereus* et une activité fongicide a été observée uniquement pour l'huile des baies contre *C. albicans*. Nos résultats corroborent ceux d'autres travaux, notamment, en ce qui concerne le thym. En effet, une activité bactéricide, a été démontrée contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* (**Soković et al., 2010**) et *B. cereus* (**Hyun**

et al., 2015), les valeurs de CMI et de CMB ont été, respectivement, de l'ordre de 1 µg/ml et 1.5 µg/ml pour les trois premières souches et de 625 mg/ml et 2500 mg/ml pour la dernière. Par ailleurs, une étude menée par **El-Sawi et al. (2007)**, a montré que l'huile des feuilles du genévrier de Phénicie était active contre *B. cereus* et *C. albicans* ; les valeurs de CMI ayant été déterminées à 12.34 mg/ml et 0.46 mg/ml, respectivement alors que celle des baies était inactive contre les deux.

Il a été démontré que la majorité des huiles essentielles testées pour leur propriété antimicrobienne, ont un effet plus prononcé contre les souches Gram positives que contre les Gram négatives (**Kalemba et Kunicka, 2003; Trombetta et al., 2005**). Cela est dû aux différences structurales entre les parois cellulaires. En effet, les Gram négatifs possèdent une membrane externe composée de chaînes de lipopolysaccharides. Cette couche forme une barrière de perméabilité hydrophile qui restreint la diffusion de composés hydrophobes tels que ceux présents dans les huiles essentielles (**Nikaido et Vaara, 1985; Trombetta et al., 2005**). Ceci pourrait expliquer la forte sensibilité observée chez *B. cereus* envers les huiles essentielles des trois plantes étudiées par rapport aux autres souches testées. Toutefois, certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des Gram positifs ou des Gram négatifs (**Guesmi et Boudabous, 2006**).

D'après **Oussalah et al. (2006)**, l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires et les effets synergiques entre ces derniers et les composés mineurs. Ceci pourrait expliquer les différences constatées dans les résultats obtenus par la présente étude ainsi que par les travaux antérieurs.

L'activité antimicrobienne de *T. vulgaris* pourrait être attribuée à la teneur élevée en composés phénoliques et en particulier, au thymol, qui définit le chémotype de nos deux huiles essentielles ainsi qu'aux hydrocarbures terpéniques : γ -terpinène, *p*-cymène, α -pinène et à l'alcool terpénique : linalool qui sont les principaux constituants. De nombreuses études ont en effet démontré que ces derniers possédaient des propriétés antimicrobiennes (**Rota et al., 2004; Rota et al., 2008; Imelouane et al., 2009; Soković et al., 2009; Sienkiewicz et al., 2012**). Quant à *J. phoenicea*, l'effet antimicrobien pourrait être dû aux terpènes β -phellandrène et α -pinène qui sont les constituants majeurs des huiles essentielles des feuilles et des baies mais aussi, à d'autres constituants présents à des concentrations plus ou moins importantes tels que limonène, α -phellandrène, *p*-cymène et myrcène. Ces composés s'avèrent être, en effet, des agents antimicrobiens très actifs (**Cosentino et al., 1999; Simic et al., 2002; Inoue et al., 2004;**

Alessandra et al., 2005, Ennajjar et al., 2009; Mazari et al., 2010; Donsi et al., 2011; Sienkiewicz et al., 2012).

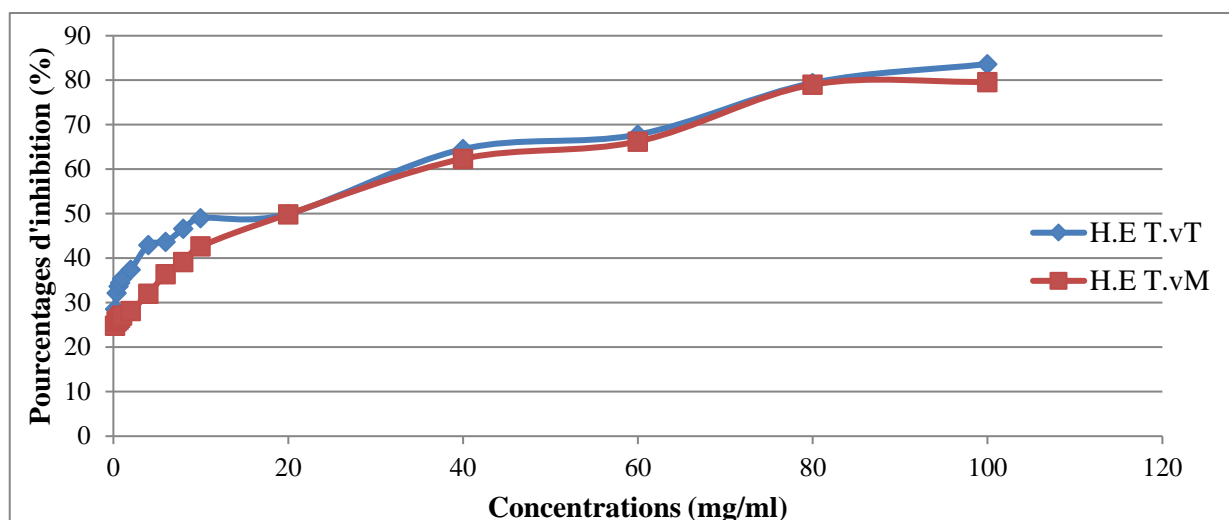
D'autre part, des composés présents en minorité dans chacune de nos huiles essentielles, pourraient également avoir une part de contribution à l'activité antimicrobienne par synergie avec les composés majeurs (**Burt, 2004 ; Borugã et al., 2014**).

Bien que les mécanismes associés aux activités antimicrobiennes des huiles essentielles ne soient pas entièrement compris (**Radaelli et al., 2016**) ; le nombre d'études à ce sujet a augmenté au cours de ces dernières décennies (**Lambert et al., 2001 ; Burt et al., 2007 ; Turgis et al., 2009**). Il semblerait que le mode d'action de la majorité des composés suscités est de rendre, de part leurs propriétés lipophiles, la membrane cytoplasmique bactérienne et fongique perméable. C'est le cas du thymol, myrcène, limonène et β -phellandrène, par exemple (**Cowan, 1999; Filipowicz et al., 2003; Veldhuizen et al., 2006 ; Gómez-Estaca et al., 2010**) Ces derniers peuvent en outre, désactiver les enzymes essentielles et perturber la fonctionnalité du matériel génétique, la production d'énergie et la synthèse des composants structuraux (**Conner et Beuchat, 1984; Davidson, 2001**). Le *p*-cymène semble également agir sur la membrane cellulaire mais avec un autre mécanisme ; il s'accumule en grandes quantités et provoque l'expansion des phospholipides membranaires en augmentant les espaces par lesquels des fuites d'ions pourraient avoir lieu (**Ultee et al., 2002**). Les pinènes peuvent quant à eux, détruire l'intégrité cellulaire en inhibant la respiration et les processus de transport ionique. En outre, ils peuvent augmenter la perméabilité des mitochondries isolées chez les levures (**Uribe et al., 1985**). Par ailleurs, le thymol peut agir contre les champignons en altérant la morphologie des hyphes et en formant des agrégats, ce qui entraîne une réduction des diamètres des hyphes et la lyse de la paroi car il interagit avec la membrane fongique (**Soylu et al., 2007**).

V.4- Etude de l'activité antioxydante

V.4.1- Test de DPPH

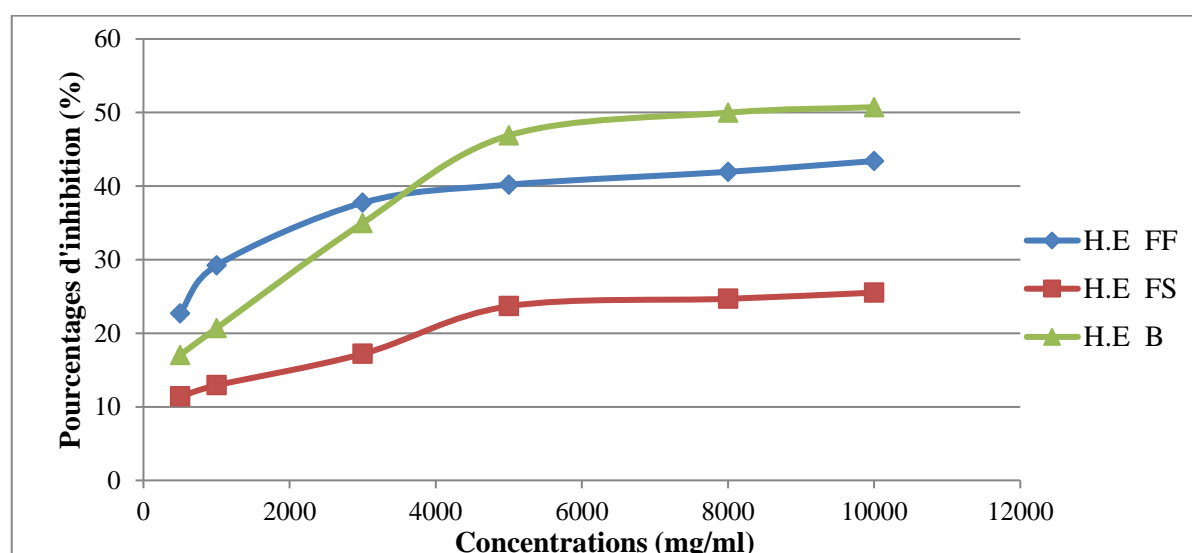
L'évaluation de la capacité des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* à piéger le radical libre DPPH, a été réalisée par la mesure de son absorbance en présence de ces dernières, et ce, à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont illustrés dans les **figures n°36, 37, 38** et le **tableau n°13**.



H.E : Huile essentielle ; T.vT : *T. vulgaris* de Tlemcen ; T.vM : *T. vulgaris* de Mostaganem

Figure n°36 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les deux huiles essentielles de *Thymus vulgaris*

La **figure n°36** indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles testées. A la plus faible concentration (0.2 mg/ml), l'huile du thym de Tlemcen et de Mostaganem ont présenté des PI respectifs de 28.62% et 24.87% tandis qu'à la plus grande concentration (100 mg/ml), les PI ont atteint 83.65% et 79.62%, respectivement. Ceci montre que l'espèce *T. vulgaris* possède un grand potentiel antioxydant.



H.E : Huile essentielle ; FF : Feuilles fraîches ; FS : Feuilles sèches ; B : Baies.

Figure n° 37: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les trois huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*

La **figure n°37** montre que les pourcentages d'inhibition (PI) présentés par les trois huiles essentielles de *J. phoenicea* varient de façon proportionnelle aux concentrations utilisées. A 500 mg/ml (la plus faible concentration), l'huile des feuilles fraîches a donné le plus grand PI (22.71%) comparé, à l'huile des baies (17.03%) et des feuilles sèches (11.4%). Toutefois, à partir de 5000 mg/ml, l'huile des baies est devenue la plus active des trois ayant d'ailleurs, permis inhiber jusqu'à 50.73% l'absorbance du DPPH à la plus grande concentration testée (10 000 mg/ml) contre 43.41% pour l'huile des feuilles fraîches et 25.52% pour l'huile des feuilles sèches.

De même, le pouvoir antiradicalaire de l'acide ascorbique (antioxydant standard) a été évalué afin de le comparer à celui des plantes. Nous notons d'après la **figure n°38**, que la réduction de l'absorbance du DPPH a été beaucoup plus importante que celle des huiles essentielles. En effet, à seulement 0.2 mg/ml, le PI avait déjà atteint les 50%. De plus, à partir de cette concentration, une augmentation extrêmement intense a été observée donnant ainsi, à 0.4 mg/ml, un PI de 94.61%. Puis, la variation du PI a commencé à plus ou moins se stabiliser à partir de 0.6 mg/ml, aboutissant à une réduction de 95.9% à la plus grande concentration testée (1 mg/ml). L'acide ascorbique a donc provoqué une réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire DPPH-H.

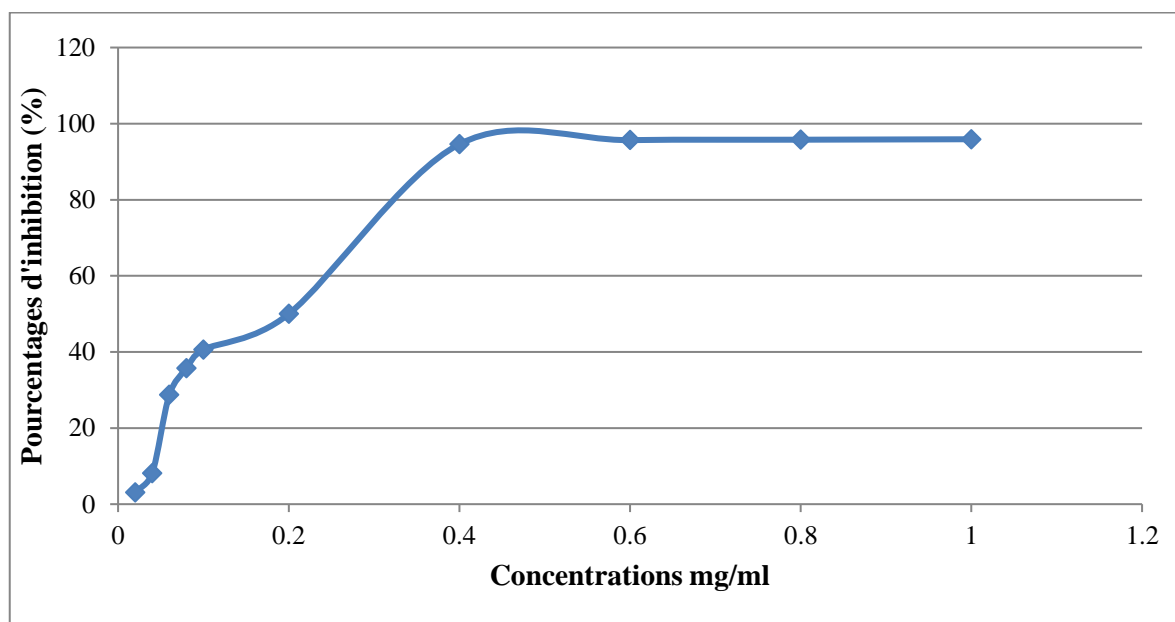


Figure n°38 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique

Tableau n°13 : Valeurs de la concentration efficace 50 des huiles essentielles des espèces étudiées et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH

| Huile essentielle | <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | <i>J. phoenicea</i> | | | Acide ascorbique |
|--------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------|------------|------------------|
| | | | Feuilles fraîches | Feuilles sèches | Baies | |
| CE ₅₀ (mg/ml) | 24.89± 0.02 | 34.13± 0.03 | ND | ND | 9980± 1.53 | 0.28± 0.02 |

ND : Non déterminé.

La CE₅₀ exprime la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% la concentration du radical libre. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. En effet, plus la valeur de CE₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande (**Dung et al., 2008**). Sa détermination permet d'évaluer et de comparer l'efficacité de nos échantillons. D'après les résultats du **tableau n°13**, nous constatons que pour les huiles essentielles, la plus faible valeur de CE₅₀ est celle du thym de Tlemcen (24.89 mg/ml), suivi de près par celle du thym de Mostaganem (34.13 mg/ml). Par ailleurs, la plus grande valeur a été obtenue par l'huile des baies de *J. phoenicea* (9980 mg/ml) alors que celle des huiles des feuilles fraîches et sèches n'ont pas pu être calculées étant donné que les PI du DPPH, à la plus grande concentration testée (10 000 mg/ml), restent inférieurs à 50% (43.41% et 25.52%, respectivement). L'activité antioxydante de *J. phoenicea* est donc extrêmement faible par rapport à celle de *T. vulgaris*, néanmoins, celle de l'acide ascorbique reste la plus importante puisque sa CE₅₀ a été la plus basse (0.28 mg/ml).

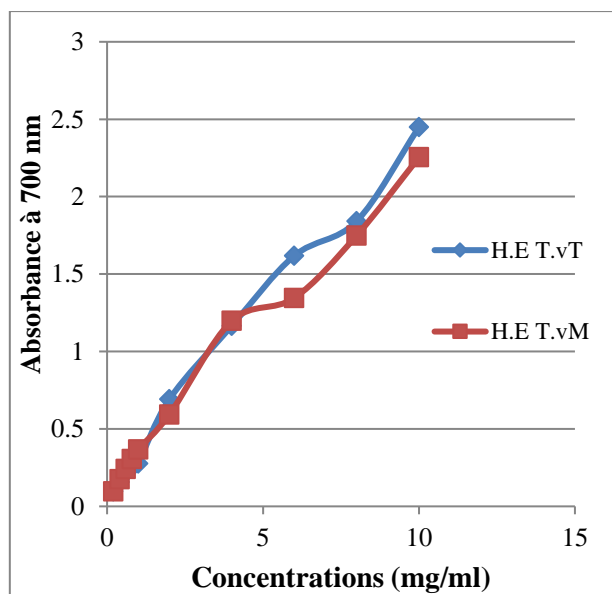
V.4.2- Test de FRAP

L'évaluation de l'aptitude des huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *J. phoenicea* à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺), a permis d'obtenir les différents résultats présentés dans les **figures n°39, 40, 41, 42** et le **tableau n°14**.

Nous remarquons que le pouvoir réducteur qui est exprimé en absorbances, mesurées à 700 nm, est proportionnel à l'augmentation des concentrations de chacune des solutions testées. Les huiles essentielles de *T. vulgaris* ont présenté de bien plus fortes activités que celles de *J. phoenicea*. Ceci est reflété par l'obtention de densités optiques (DO) élevées à des concentrations très faibles. A 10 mg/ml, les DO maximales ont été de l'ordre de 2.45 et 2.25 pour l'huile du thym de Tlemcen et de Mostaganem, respectivement (**figure n°39**). Concernant *J. phoenicea*, l'huile des baies s'est avérée être plus active que celle des feuilles fraîches et sèches. A 100 mg/ml, qui est la plus grande concentration testée chez les baies, la DO a été obtenue à 0.846 (**figure n°41**). Des DO plus ou moins proches de cette dernière, ont été obtenues

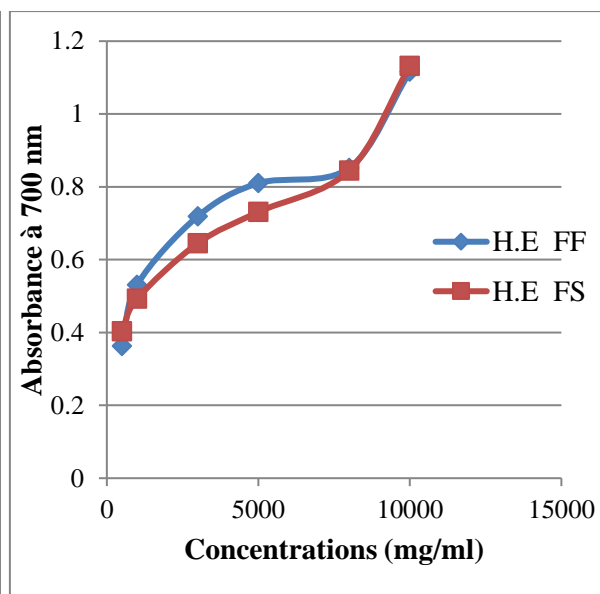
par l'huile des feuilles fraîches (0.852) et des feuilles sèches (0.845) mais seulement, à partir de 8000 mg/ml (figure n°40).

D'autre part, nous constatons selon les résultats de la figure n°42 que la réduction du fer par l'antioxydant de référence, a été bien plus importante que celle des huiles essentielles étant donné que la plus grande absorbance a été notée à 2.832 et ce, à seulement 0.4 mg/ml.



H.E : Huile essentielle ; T.vT : *T. vulgaris* de Tlemcen ; T.vM : *T. vulgaris* de Mostaganem

Figure n°39 : Pouvoir réducteur des deux huiles essentielles de *Thymus vulgaris*



H.E : Huile essentielle ; FF : Feuilles fraîches ; FS : Feuilles sèches

Figure n°40 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des feuilles de *Juniperus phoenicea*

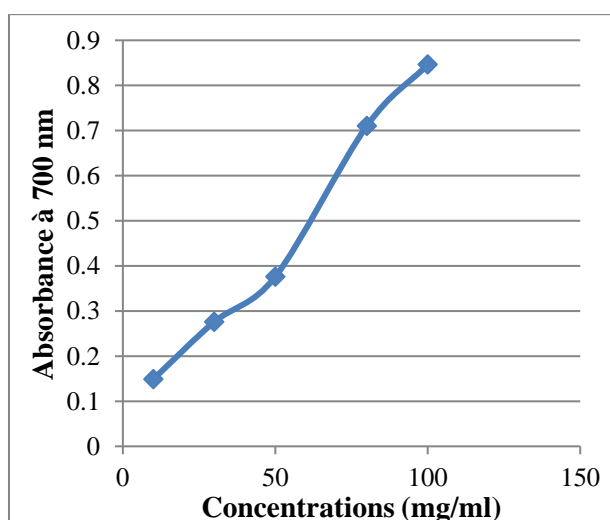


Figure n°41 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle des baies de *Juniperus phoenicea*

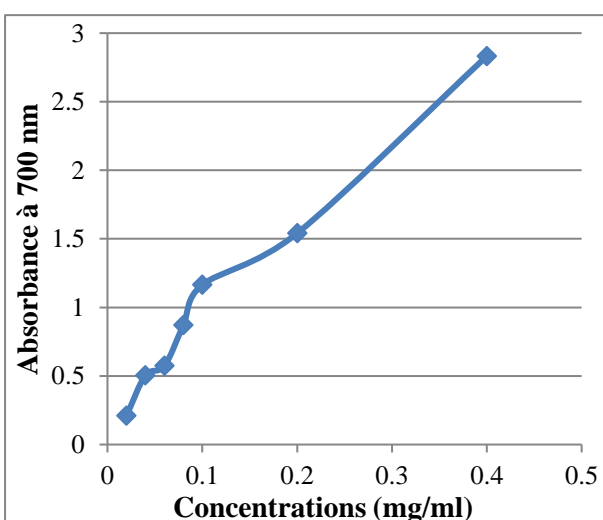


Figure n°42 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

La détermination de la CE_{50} permet d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles et d'apprécier encore mieux les résultats. Selon le **tableau n°14**, les deux huiles essentielles de *T. vulgaris* présentent les valeurs les plus faibles en CE_{50} , qui sont de plus, relativement similaires (1.71 mg/ml pour celle de Tlemcen et 1.73 mg/ml pour celle de Mostaganem). Ces valeurs reflètent la capacité des huiles à réduire le fer ferrique en fer ferreux correspondant, à une absorbance de 0.5. Cependant, ces concentrations restent très élevées par rapport à celle de l'acide ascorbique (0.037 mg/ml). Pour *J. phoenicea* en revanche, la plus basse CE_{50} est celle de l'huile des baies (57.75 mg/ml).

Tableau n°14 : Valeurs de la concentration efficace 50 des huiles essentielles des espèces étudiées et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP

| Huile essentielle | <i>T. vulgaris</i> | <i>T. vulgaris</i> de | <i>J. phoenicea</i> | | | Acide ascorbique |
|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|------------|------------------|
| | de Tlemcen | Mostaganem | Feuilles fraîches | Feuilles sèches | Baies | |
| CE_{50} (mg/ml) | 1.71± 0.03 | 1.73± 0.02 | 2057± 1.15 | 1633± 2.65 | 57.75±0.02 | 0.037±0.003 |

Le criblage des huiles essentielles pour leurs activités antioxydantes, a nécessité l'utilisation de deux tests différents. En effet, en raison de la complexité des processus d'oxydation-réduction et des différences entre les systèmes d'essai étudiés, un seul test ne reflètera donc pas tous les résultats de l'activité des antioxydants (**Schlesier et al., 2002; Prior et al., 2005; Li et al., 2009**). Il est alors fortement recommandé d'utiliser au moins deux méthodes afin d'obtenir des informations complètes sur la réponse des composés présents dans les échantillons testés dans différentes conditions expérimentales (**Schlesier et al., 2002; Sariburun et al., 2010**). Notre choix s'est porté sur le test de DPPH et de FRAP car ils sont parmi les tests les plus utilisés pour l'évaluation de l'activité en sujet (**Pérez-Jiménez et al., 2008**). Les résultats nous ont permis de constater que les deux huiles essentielles de *T. vulgaris* possédaient un fort pouvoir antioxydant comparé à celui des huiles de *J. phoenicea* mais qui reste, cependant, nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique. Il est également moins important que celui obtenu par l'étude de **Nikolić et al. (2014)** (CE_{50} déterminées à 4.80 µg/ml et 1.54 µg/ml par le test de DPPH et de FRAP, respectivement) ou encore, par l'étude de **Fazel et al. (2007)** et de **Keramat et Golmakani (2016)** (CE_{50} notées à 8.9 mg/ml et 0.50 mg/ml, respectivement suite au test de DPPH).

Concernant *J. phoenicea*, l'huile essentielle des baies a été plus efficace que celle des feuilles fraîches et sèches. Cependant, l'activité antioxydante reste extrêmement faible par

rapport à celle de l'acide ascorbique. Par comparaison, **Bouyahyaoui (2017)** a montré par le test de DPPH, que les huiles des feuilles étaient plus actives ($CE_{50} = 22.15 \pm 2.47 \mu\text{g/ml}$) que celle des baies ($CE_{50} = 65.3 \pm 2.24 \mu\text{g/ml}$) ou encore, de la vitamine C ($CE_{50} = 35.57 \pm 2.47 \mu\text{g/ml}$). **Menaceur et al. (2013)** ont également fait le même constat que ce dernier concernant l'huile des feuilles comparativement à l'huile des baies. Toutefois, l'activité reste très faible comparée à l'antioxydant de référence (BHT) ou encore, à l'extrait éthanolique des feuilles. Les valeurs de CE_{50} ont été obtenues à $28 \pm 0.7 \text{ mg/l}$ et $9.8 \pm 0.1 \text{ mg/l}$ respectivement pour les deux derniers alors que celle des huiles essentielles n'ont pas pu être déterminées étant donné que l'inhibition maximale du DPPH reste inférieure à 15% à la plus grande concentration testée (1000 mg/l). Ces mêmes auteurs ont rapporté un très faible pouvoir de réduction du fer ferrique en fer ferreux se traduisant par des DO inférieures à 0.5 à 700 nm. Une autre étude menée par **Aazza et al. (2012)** en utilisant différents autres tests (TBARS, piégeage des radicaux libres ABTS et Hydroxyle), n'a pas pu déterminer les valeurs de CE_{50} recherchées. Ceci confirme le faible potentiel antioxydant du genévrier constaté au cours de notre étude. Par ailleurs, **Ghalem et al. (2016)** ont montré qu'au contraire, l'espèce avait exercé une forte activité ayant ainsi, assuré une inhibition de 50% du radical DPPH à seulement $1.279 \mu\text{g/ml}$ de concentration d'huile essentielle et une réduction du fer ferrique en fer ferreux à moins de $5 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antioxydante des huiles essentielles extraites de plantes appartenant au genre *Thymus*, a largement été démontrée (**Sarikurkcü et al., 2010 ; Viuda-Martos et al., 2010 ; Zouari et al., 2011**), ce qui confirme les résultats obtenus suite à notre étude. L'activité a été rapportée comme étant principalement liée aux composés phénoliques. En effet, une étude faite par **Ruberto et Baratta (2000)** consistant à tester l'activité antioxydante de 98 composants purs d'huiles essentielles, a souligné que les composés phénoliques notamment, le thymol et le carvacrol présentait l'activité la plus élevée. De même, **Kulisic et al. (2005)** avaient fractionné les huiles essentielles de *T. vulgaris* et de *T. serpyllum* en une fraction riche en thymol et en carvacrol et en une fraction hydrocarbonée. Le potentiel antioxydant, testé avec trois méthodes différentes, se trouvait principalement dans la première fraction. Cela pourrait donc justifier la grande activité exhibée par nos deux huiles essentielles de thym, d'autant plus que ces dernières, sont de chémotype thymol, en revanche, le carvacrol n'est présent qu'en traces. D'autres constituants présents à des teneurs appréciables tels que γ -terpinène, *p*-cymène et linalool pourraient également y avoir contribué. En effet, ces derniers possèdent une importante activité antioxydante (**Ruberto et Baratta, 2000; Jia et al., 2010 ; Seol et al., 2016**).

Par ailleurs, la très faible performance observée chez les huiles essentielles du genévrier de Phénicie pourrait s'expliquer par le fait que leurs profils chimiques ne soient caractérisés que par une très faible teneur en composés phénoliques voire des traces ou encore, l'absence de certains d'entre eux. **Ebrahimabadi et al. (2010)** et **Gholivand et al. (2010)** ont auparavant démontré de part leurs travaux respectifs sur *Salvia eremophila* Boiss. et *Psammogeton canescens* (DC.) vatke, qu'il y avait une étroite relation entre l'absence des composés phénoliques et la faible activité antioxydante des huiles essentielles.

Toutefois, et bien que faible, l'effet antioxydant de l'huile des baies est quand même supérieur à celui des feuilles fraîches et sèches. Cela pourrait être dû à des composés tels que *p*-cymène et α -terpinéol, qui sont présents à des teneurs plus importantes dans les baies que dans les feuilles et dont, les propriétés antioxydantes ont déjà été démontrées (**Jia et al., 2010; Rodriguez et Murray, 2010**).

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles ne peut pas être attribué uniquement aux composants majoritaires mais aussi, aux composants minoritaires. En effet, les composés majeurs testés séparément donnent des résultats inférieurs comparés à l'activité antioxydante de la totalité d'une huile essentielle (**Safaei-Ghomi et al., 2009**). **Lu et Foo (2001)** rapportent que les composés antioxydants fonctionnent synergiquement les uns avec les autres pour produire une large gamme d'activités antioxydantes qui crée un système de défense efficace contre les radicaux libres.

Il a été rapporté que les composés phénoliques de part leurs propriétés d'oxydo-réduction, pouvaient assurer leurs fonctions antioxydantes en agissant comme donneurs d'atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle. Ce rôle leur permet de réagir avec des radicaux libres le plus souvent, des peroxydes et des alcoxydes interrompant de ce fait, la réaction en chaîne de propagation de la peroxydation. Ils peuvent chélater des métaux de transition tels que le fer et le cuivre de sorte, à empêcher ces derniers de générer des radicaux libres. Ils peuvent également éliminer directement certaines espèces réactives d'oxygène tels que, les radicaux hydroxyle, peroxyde et superoxyde (**Kris-Etherton et al., 2002; Cillard et Cillard, 2006; Halliwell, 2007**).

L'activité antioxydante des huiles essentielles dépend tout d'abord, de leur composition chimique et plus précisément, de la concentration et de la structure des molécules dotées de propriétés antioxydantes (**Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996; Číž et al., 2010**) mais aussi, de la température, la lumière, le type de substrat, l'état physique du système et des microcomposants

agissant comme pro-oxydants ou synergistes (**Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996**). La méthode utilisée est également un facteur qui peut fortement influencer l'activité (**Miguel et al., 2007**). En effet, en raison de l'existence de nombreux tests basés sur différents mécanismes, l'interprétation des données n'est pas simple. En conséquence, les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'une même espèce végétale, peuvent varier considérablement d'une étude à une autre (**Ruberto et Baratta, 2000 ; Kulisic et al., 2005**). C'est ce que nous avons d'ailleurs, constaté en comparant nos résultats à ceux de travaux antérieurs. Il est donc nécessaire de souligner qu'il n'existe pas de système parfait qui évalue la « vraie » activité antioxydante d'un seul composé ou d'un mélange complexe (**MacDonald-Wicks et al., 2006**).

V.5- Etude pharmacologique

V.5.1- Toxicité aigue

L'étude de la toxicité aigue des huiles essentielles de *T. vulgaris* (de Tlemcen et de Mostaganem) et de *J. phoenicea* (feuilles fraîches, feuilles sèches et baies) a été réalisée par administration orale chez des souris *Swiss albinos*. Les résultats nous ont permis de constater après 24 heures, la mort de 2 souris sur 3 dans le lot traité avec l'huile du thym de Tlemcen et ce, à une dose de 4500 mg/Kg de p.c. Un sédentarisme et une très forte respiration ont aussi été observés durant les premières heures. Concernant les autres huiles essentielles, aucune mort ou de modifications dans les réponses autonomes ou comportementales chez les souris, n'a été observé, à l'exception, du lot traité avec l'huile du thym de Mostaganem à 5000 mg/Kg (dose maximale testée). En effet, un sédentarisme général a été noté dans ce groupe durant les premières heures.

Notre étude s'est basée sur la méthode par classe de toxicité aigue décrite par la ligne directrice OECD code 423 (**OECD, 2001a**). Cette dernière est un processus séquentiel validé *in vivo* à l'échelle nationale (**Schlede et al., 1992**) et internationale (**Schlede et al., 1995**). Elle n'utilise que trois animaux d'un seul sexe par étape afin de réduire la variabilité et de minimiser le nombre d'animaux utilisés (**OECD, 2001b**), dans notre cas, ce sont les femelles qui ont été testées. Bien que les relevés de la littérature sur les tests DL₅₀ classiques montrent qu'il y a peu de différence dans la sensibilité entre les sexes, dans le cas où elle est observée, les femelles se montrent généralement plus sensibles (**Lipnick et al., 1995**).

Selon la classification établie par GHS (Globally Harmonized System) (**annexe n°7**), l'huile du thym de Tlemcen appartient à la catégorie 5 (2000 < DL₅₀ < 5000 mg/Kg), tandis que,

les quatre autres huiles essentielles sont inclassables ($DL_{50} > 5000$ mg/Kg). Les substances d'essai rangées dans la catégorie 5 présentent un risque de toxicité aiguë relativement faible mais qui, dans certaines circonstances, peuvent être un danger pour les populations vulnérables (OECD, 2001a). En conséquence, nous pouvons considérer que les huiles essentielles testées, y compris celle de *T. vulgaris* de Tlemcen, sont relativement sans danger.

Une étude menée par Ford *et al.* (1992) sur *J. phoenicea*, a montré un résultat similaire au notre. En effet, la DL_{50} orale de l'huile était supérieure à 5000 mg/Kg chez les rats. Deux autres études réalisées sur *T. vulgaris* par Dilaser (1979) et Fachini-Queiroz *et al.* (2012) ont indiqué des valeurs de DL_{50} orales proches de celle du thym de Tlemcen, à savoir, 4700 mg/kg et 4000 mg/Kg chez des souris et des rats, respectivement. Cela confirme que les deux espèces présentent un faible risque de toxicité.

V.5.2- Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été réalisée par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine chez la souris. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux n°15 et 16 et la figure n°43 pour les deux huiles essentielles de *T. vulgaris* et dans le tableau n°17 pour les trois huiles essentielles de *J. phoenicea*.

Tableau n°15 : Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Tlemcen sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez la souris :

| Heure | Diamètre de la patte en millimètre | | | | |
|-------|------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------|
| | Contrôle (10 ml/Kg) | Standard (10 mg/Kg) | Huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> de Tlemcen | | |
| | | | 100 mg/Kg | 200 mg/Kg | 400 mg/Kg |
| 0H | 1.85± 0.011 | 1.88± 0.006 | 1.83± 0.03 | 1.84± 0.009 | 1.84± 0.012 |
| 1H | 2.86± 0.008 | 2.84± 0.005* | 2.83± 0.008** | 2.83± 0.005** | 2.76± 0.01*** |
| 2H | 3.18± 0.008 | 2.95± 0.007*** | 3.12± 0.01** | 3.09± 0.009*** | 2.99± 0.023*** |
| 3H | 3.25± 0.01 | 2.71± 0.005*** | 3.16± 0.009*** | 3.14± 0.01*** | 3.05± 0.009*** |
| 4H | 3.31± 0.006 | 2.47± 0.009*** | 3.10± 0.007*** | 2.99± 0.012*** | 2.95± 0.007*** |
| 5H | 3.19± 0.009 | 2.23± 0.008*** | 2.87± 0.004*** | 2.76± 0.007*** | 2.67± 0.009*** |
| 6H | 3.09± 0.01 | 2.07± 0.007*** | 2.69± 0.008*** | 2.53± 0.008*** | 2.36± 0.017*** |

Valeurs exprimées en Moyenne ± S.E.M (n = 6) ; Contrôle : véhicule (Tween 80 à 1%) ; Standard : Diclofénac ; * p < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 différences statistiquement significatives comparé au groupe témoin.

Tableau n°16 : Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Mostaganem sur l'œdème induit par carragénine chez la souris :

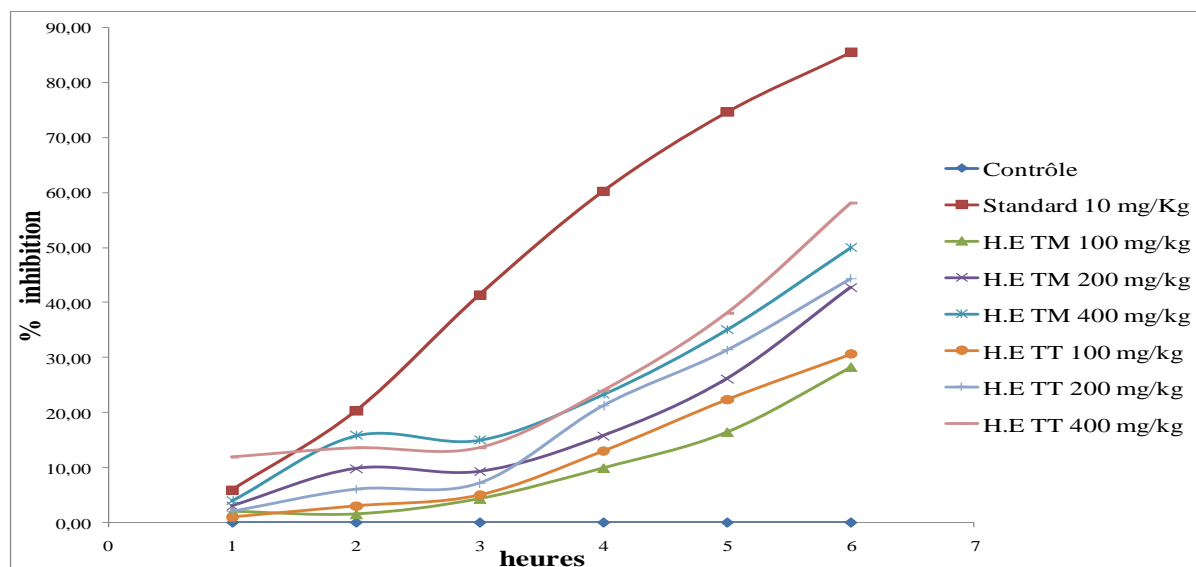
| Heure | Diamètre de la patte en millimètre | | | | |
|-------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| | Contrôle (10 ml/Kg) | Standard (10 mg/Kg) | Huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> de Mostaganem | | |
| | | | 100 mg/Kg | 200 mg/Kg | 400 mg/Kg |
| 0H | 1.85± 0.011 | 1.88± 0.006 | 1.84 ± 0.022 | 1.89 ± 0.034 | 1.92 ± 0.009 |
| 1H | 2.86± 0.008 | 2.84± 0.005* | 2.83± 0.006* | 2.87± 0.005 | 2.89± 0.012 |
| 2H | 3.18± 0.008 | 2.95± 0.007*** | 3.15± 0.005 | 3.09± 0.006*** | 3.04± 0.008*** |
| 3H | 3.25± 0.01 | 2.71± 0.005*** | 3.18± 0.009*** | 3.16± 0.007*** | 3.11± 0.007*** |
| 4H | 3.31± 0.006 | 2.47± 0.009*** | 3.16± 0.005*** | 3.12± 0.008*** | 3.04± 0.009*** |
| 5H | 3.19± 0.009 | 2.23± 0.008*** | 2.96± 0.007*** | 2.88± 0.016*** | 2.79± 0.014*** |
| 6H | 3.09± 0.01 | 2.07± 0.007*** | 2.73± 0.008*** | 2.6± 0.009*** | 2.54± 0.011*** |

Valeurs exprimées en Moyenne ± S.E.M (n = 6) ; Contrôle : véhicule (Tween 80 à 1%) ; Standard : Diclofénac ; * p < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 différences statistiquement significatives comparé au groupe témoin.

Les données des **tableaux n°15** et **16** indiquent une augmentation progressive du volume de l'œdème plantaire suite à l'injection de l'agent phlogogène, atteignant à 4 heures son seuil maximal dans le groupe témoin (3.31 ± 0.006 mm). Comparé à ce dernier, les groupes traités avec les différentes doses d'huiles essentielles de *T. vulgaris*, montrent une diminution hautement significative (p < 0.001) de l'œdème et ce, à partir de 4 heures. Toutefois, celle de Tlemcen a été légèrement plus efficace que celle de Mostaganem. En effet, 6 heures après induction de l'inflammation, la première a diminué l'épaisseur de la patte jusqu'à 2.69 mm, 2.53 mm et 2.36 mm à 100, 200 et 400 mg/Kg, respectivement, tandis que la deuxième, l'a réduit jusqu'à 2.73 mm, 2.6 mm et 2.54 mm, respectivement. Par ailleurs, l'administration du diclofénac (anti-inflammatoire de référence) a prévenu de façon hautement significative, l'évolution de l'inflammation à partir de 3 heures dans le groupe standard (2.71 ± 0.005 mm) comparé au groupe témoin (3.25 ± 0.01 mm).

La **figure n°43** montre l'effet inhibiteur exercé par les huiles essentielles du thym et le diclofénac sur le développement de l'inflammation en fonction des heures. Nous remarquons que le seuil maximal a été atteint à 6 heures. En effet, les pourcentages d'inhibitions obtenus à 100, 200 et 400 mg/Kg ont été respectivement de 30.65%, 44.35% et 58.4% pour l'huile essentielle de Tlemcen et de 28.23%, 42.74% et 50.4% pour celle de Mostaganem. Par comparaison, le

diclofénac a été plus actif étant donné que le pourcentage d'inhibition était supérieur (85.48% à 10 mg/Kg de p.c).



H.E TM : Huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Mostaganem ; H.E TT : Huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Tlemcen.

Figure n°43 : Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par les deux huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et le diclofénac

Les résultats ci-après (tableau n°17) montrent une évolution progressive de l'inflammation en fonction des heures, atteignant son maximum à 4 heures dans tous les groupes testés, mis à part, le groupe standard (traité par le diclofénac). Comparé au groupe témoin (3.31 ± 0.006 mm), le volume de l'œdème plantaire s'est révélé être légèrement supérieur dans les groupes traités par les huiles essentielles de *J. phoenicea*, à l'exception, de ceux traités par 400 mg/Kg d'huile des feuilles fraîches (3.27 ± 0.009 mm) et par 200 et 400 mg/Kg d'huile des feuilles sèches (3.29 ± 0.011 mm et 3.30 ± 0.008 mm, respectivement).

A 6 heures, une diminution significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) du gonflement a été notée pour les lots traités avec 200 et 400 mg/Kg d'huile des feuilles fraîches (3.03 ± 0.013 mm et 2.90 ± 0.006 mm, respectivement) et d'huile des feuilles sèches (3.03 ± 0.01 mm et 2.96 ± 0.008 mm, respectivement). L'huile des baies a exhibé, quant à elle, un très faible effet inhibiteur étant donné que le gonflement reste important par rapport au témoin. En outre, les pourcentages d'inhibition obtenus nous ont permis de constater qu'à la plus grande dose testée (400 mg/Kg), l'huile des feuilles fraîches a été la plus active (16.13%), suivie de très près par celle des feuilles sèches (14.52%) puis par celle des baies (5.65%). Cependant, les trois huiles restent nettement moins efficaces que l'anti-inflammatoire de référence (85.48% à seulement 10 mg/Kg).

Tableau n°17 : Effet des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez la souris :

| Traitement | Diamètre de la patte en millimètre | | | | | | |
|---------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 0H | 1H | 2H | 3H | 4H | 5H | 6H |
| Contrôle (10 ml/Kg) | 1.85± 0.011 | 2.86± 0.008 | 3.18± 0.008 | 3.25± 0.01 | 3.31± 0.006 | 3.19± 0.009 | 3.09± 0.01 |
| Standard (10 mg/Kg) | 1.88± 0.006 | 2.84± 0.005* (5.94%) | 2.95± 0.007*** (20.30%) | 2.71± 0.005*** (41.43%) | 2.47± 0.009*** (60.27%) | 2.23± 0.008*** (74.63%) | 2.07± 0.007*** (85.48%) |
| H.E FF (100 mg/Kg) | 1.93± 0.008 | 2.93± 0.010*** (0.99%) | 3.25± 0.009*** (0.75%) | 3.33± 0.011*** (2.14%) | 3.36± 0.009** (2.05%) | 3.23± 0.014* (2.99%) | 3.09± 0.016 (6.45%) |
| H.E FF (200 mg/Kg) | 1.92± 0.012 | 2.91± 0.006** (1.98%) | 3.23± 0.006*** (1.50%) | 3.28± 0.012 (2.86%) | 3.32± 0.011 (4.11%) | 3.19± 0.004 (5.22%) | 3.03± 0.013** (10.48%) |
| H.E FF (400 mg/Kg) | 1.86± 0.008 | 2.84± 0.007 (2.97%) | 3.15± 0.011 (3.01%) | 3.23± 0.011 (2.14%) | 3.27± 0.009** (3.42%) | 3.15± 0.013* (3.73%) | 2.90± 0.006*** (16.13%) |
| H.E FS (100 mg/Kg) | 1.95± 0.008 | 2.94± 0.006*** (1.98%) | 3.26± 0.006*** (1.50%) | 3.33± 0.007*** (1.43%) | 3.38± 0.009*** (2.05%) | 3.26± 0.006*** (2.24%) | 3.15± 0.007*** (3.23%) |
| H.E FS (200 mg/Kg) | 1.89± 0.008 | 2.88± 0.007 (1.98%) | 3.19± 0.011 (2.26%) | 3.25± 0.008 (2.86%) | 3.29± 0.011 (4.12%) | 3.18± 0.010 (3.73%) | 3.03± 0.01** (8.06%) |
| H.E FS (400 mg/Kg) | 1.90± 0.006 | 2.89± 0.006* (0.99%) | 3.19± 0.008 (3.01%) | 3.26± 0.005 (2.86%) | 3.30± 0.008 (4.11%) | 3.17± 0.009 (5.22%) | 2.96± 0.008*** (14.52%) |
| H.E B (100 mg/Kg) | 1.99± 0.002 | 2.99± 0.006*** (0.99%) | 3.31± 0.006*** (0.75%) | 3.38± 0.007*** (0.71%) | 3.42± 0.007*** (2.05%) | 3.32± 0.008*** (0.75%) | 3.22± 0.009*** (0.81%) |
| H.E B (200 mg/Kg) | 1.98± 0.005 | 2.98± 0.006*** (0.99%) | 3.30± 0.004*** (1.50%) | 3.37± 0.007*** (1.42%) | 3.42± 0.006*** (1.37%) | 3.30± 0.006*** (1.49%) | 3.20± 0.008*** (1.61%) |
| H.E B (400 mg/Kg) | 1.97± 0.005 | 2.98± 0.007*** (1.98%) | 3.29± 0.007*** (1.50%) | 3.34± 0.008*** (2.86%) | 3.39± 0.008*** (3.42%) | 3.26± 0.008*** (4.48%) | 3.15± 0.009** (5.65%) |

Valeurs exprimées en moyenne ± S.E.M (n = 6) ; Contrôle : Véhicule (Tween 80 à 1%) ; Standard : Diclofénac ; H.E : Huile essentielle ; FF : Feuilles fraîches ; FS : Feuilles sèches ; B : Baies ; * p < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 différences statistiquement significatives comparé au groupe témoin.

L'œdème plantaire est l'un des principaux facteurs utilisés pour l'évaluation du degré d'une inflammation aiguë et de l'efficacité des nouveaux médicaments anti-inflammatoires (**Begum et Sadique, 1988**). Son induction par injection de la carragénine est utilisée comme modèle expérimental standard (**Banerjee et al., 2000**). Ce phénomène se caractérise habituellement par une réponse biphasique. La première phase (1 - 2 heures) dépend de la libération de médiateurs chimiques tels que, l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. La deuxième phase (3 – 6 heures) est soutenue par la libération de prostaglandines, leucotriènes, lysozymes, protéases et oxyde nitrique (NO) (**DiRosa et al., 1971; Olajide et al., 1999; Posadas et al., 2004**). Les eicosanoïdes (leucotriènes et prostanoïdes) induisent la biosynthèse d'élastase, collagénase et d'autres composés. Ces enzymes décomposent les protéines structurales en peptides provoquant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la pression hydrostatique. Cela entraîne par conséquent, la formation d'un œdème et la migration des neutrophiles vers les tissus endommagés (**Havsteen, 2002**). Ces derniers produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui contribuent à la réponse inflammatoire en causant des dommages cellulaires (**Posadas et al., 2004; Kumar et Kuttan, 2009**).

D'autre part, les cyclooxygénases-2 (COX-2), enzymes inductibles par les cytokines (facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et interleukines IL-6 et IL-1 β), sont présentes dans les cellules inflammatoires activées et sont connues pour jouer un rôle crucial dans l'inflammation en libérant le médiateur prostanoïde (prostaglandines et thromboxane) (**Nussler et Billiar, 1993; Nantel et al., 1999**). De même, l'inductible oxyde nitrique synthase (iNOS) génère de l'oxyde nitrique (NO) et est considéré comme ayant un rôle central dans les réponses inflammatoires (**Fialkow et al., 2007**). Il est reconnu que l'expression du iNOS et des COX-2 est maximale au cours de la deuxième phase (3 – 6 heures) de l'œdème plantaire (**Loram et al., 2007; Eddouks et al., 2012**). Cette phase est sensible à la majorité des médicaments anti-inflammatoires cliniquement efficaces (**Vinegar et al., 1969**). Il a été démontré que l'inhibition de la production du NO et des prostaglandines par suppression de l'expression du iNOS et des COX-2 était bénéfique dans le traitement des maladies inflammatoires (**Sawatzky et al., 2005**).

A travers nos résultats, nous avons constaté que les huiles essentielles testées à différentes doses, et plus particulièrement celles de *T. vulgaris*, possédaient un effet anti-inflammatoire considérable, ce qui leur a permis, à partir de 4 heures, d'inhiber l'inflammation de façon hautement significative comparé au groupe témoin (**tableaux n°15 et 16**). Cela pourrait

suggérer qu'aux doses administrées, les deux huiles de thym auraient empêché la libération des médiateurs pro-inflammatoires de la phase tardive (3 – 6 heures) en inhibant l'expression des principaux précurseurs (iNOS et COX-2) (**Vigo et al., 2004**). De plus, de part leurs propriétés antioxydantes, ces dernières auraient également pu agir en inhibant la production des espèces réactives oxygénées (ERO) responsables des lésions cellulaires (**Middleton et al., 2000 ; Preethi et al., 2012**). Les huiles essentielles de *J. phoenicea* n'ont quant à elles, exhibé un effet anti-inflammatoire qu'à partir de 5 heures (**tableau n°17**). Toutefois, celle-ci est très faible voire négligeable à certaines doses d'huiles testées étant donné que le volume de l'œdème reste supérieur à celui du groupe témoin.

Très peu d'études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur l'activité anti-inflammatoire de *T. vulgaris* (**Juhás et al., 2008**). Nous pouvons toutefois citer celle de **Juhás et al. (2008)** et de **Vetvicka et Vetvickova (2016)**. La première étude a montré que l'huile de l'espèce avait diminué significativement le volume de l'œdème plantaire chez les souris comparé au groupe témoin et ce, après 2 H ($p < 0.05$), 4 H et 24 H ($p < 0.01$) avec une dose de 5000 ppm soit 5000 mg/Kg et seulement après 24 H ($p < 0.01$) avec la dose de 2500 ppm. La deuxième étude, portée sur 7 huiles commerciales de l'espèce, a indiqué, une heure après injection de la carragénine, que quatre des échantillons étaient actifs (n°1, 3, 4 et 5), et après 4 heures, deux échantillons seulement sont restés actifs (n°1 et 5).

Par ailleurs, d'après nos recherches, aucune étude n'a été effectuée, jusqu'à présent, par le test de l'œdème plantaire pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de *J. phoenicea*. Cependant, il a été démontré auparavant que l'espèce possédait des propriétés anti-inflammatoires. En effet, selon **Tumen et al. (2012)**, l'huile essentielle de *J. phoenicea* permettrait un remodelage rapide dans le processus de cicatrisation des plaies. L'étude basée sur la méthode de Whittle a montré que l'huile administrée oralement à des souris *Swiss albinos*, avait effectivement exercé un effet sur la phase inflammatoire de la cicatrisation cutanée en inhibant à une dose de 200 mg/Kg, jusqu'à 27.3% la perméabilité capillaire induite par l'acide acétique. De plus, l'application topique d'une pommade préparée à base de cette huile, a permis de déterminer au 10^{ème} et au 12^{ème} jour de traitement, des contractions de plaies à des valeurs respectives de 33.28% et 40.74%.

L'activité anti-inflammatoire des deux huiles essentielles de *Thymus vulgaris* peut être principalement attribuée à leur composé majeur, le thymol. En effet, des travaux antérieurs ont démontré que ce dernier possédait des propriétés anti-inflammatoires (**Fachini-Queiroz et al.,**

2012 ; Riella *et al.*, 2012). Ce composé peut inhiber les enzymes COX (Veras *et al.*, 2013) et semble interférer avec l'activité de l'élastase, un marqueur de maladies inflammatoires produit par des neutrophiles activés (Braga *et al.*, 2009). Le fort potentiel antioxydant que l'on connaît au thymol pourrait aussi jouer un rôle dans l'activité anti-inflammatoire (Tsai *et al.*, 2011). D'autres constituants importants comme le *p*-cymène et le linalool, pourraient avoir une part de contribution à l'activité. Le premier composé est en effet capable d'inhiber les enzymes COX (Veras *et al.*, 2013) et de bloquer les voies de signalisation du NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et du MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) entraînant alors une réduction dans la sécrétion des cytokines incluant TNF- α et IL-1 β (Zhong *et al.*, 2013). Le second composé peut, quant à lui, inhiber l'iNOS et donc les effets pro-inflammatoires du NO (Peana *et al.*, 2006).

D'autre part, bien que très faible, l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* peut être due à l' α -pinène qui est l'un de leurs principaux composés. Ses effets anti-inflammatoires ont d'ailleurs été signalés par de nombreuses études (Sever et Özbek, 2005 ; Carrera-Martínez *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2015). Il est connu pour inhiber la formation des enzymes COX-1 et COX-2, TNF- α et IL-6 (Miguel, 2010 ; Carrera-Martínez *et al.*, 2014). D'autres composés présents à des teneurs appréciables pourraient également y avoir contribué tels que, le *p*-cymène, le limonène et le myrcène. Les deux derniers ont la propriété d'inhiber la production du NO (Rufino *et al.*, 2015). Par ailleurs, aucun effet anti-inflammatoire probable n'a été démontré, à notre connaissance, pour le β -phellandrène qui est le composé majeur des huiles des feuilles fraîches et des feuilles sèches.

Conclusion

Le présent travail a été mené dans le cadre de la valorisation de la flore méditerranéenne algérienne et plus particulièrement, de deux espèces végétales, à savoir, *Thymus vulgaris* L. et *Juniperus phoenicea* L., poussant à l'état spontané au nord ouest de l'Algérie et ce, en analysant leur composition chimique, leur toxicité ainsi que celle de leurs huiles essentielles mais aussi, en évaluant quelques unes de leurs propriétés biologiques telles que, l'activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire.

Le criblage phytochimique des parties aériennes des deux espèces sélectionnées a révélé la présence de différentes familles de métabolites secondaires. Il s'agit essentiellement des alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, stérols et triterpènes, coumarines et glucides. Ces constituants sont connus de part leurs diverses propriétés biologiques pouvant ainsi, contribuer à l'utilisation de *J. Phoenicea* et de *T. vulgaris* comme remèdes en médecine traditionnelle.

La minéralisation a indiqué que les feuilles et les tiges des deux espèces étaient d'une part, riches en minéraux incluant le calcium, le potassium, le sodium, le magnésium et le phosphore et d'autre part, elles ne contenaient les métaux lourds qu'à de très faibles quantités voire en traces tandis que, la majorité d'entre eux, n'a pas été détectée. Par conséquent, le thym et le genévrier rentrent dans les normes permises pour les herbes médicinales et peuvent être consommés sans risque de toxicité pour la santé humaine.

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de *T. vulgaris* de Mostaganem (HE.TM) et de Tlemcen (HE.TT), a donné des rendements respectifs de 2.2% et 4.2%. L'analyse des huiles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) a permis d'identifier 66 composés volatiles représentant 99.3% et 99.0% du total de HE.TM et HE.TT, respectivement. Les deux huiles sont dominées par le thymol avec 59.5% pour HE.TM et 67.3% pour HE.TT. D'autres composants se trouvent également à des taux appréciables. Il s'agit notamment du γ -terpinene (8.7 - 10.1%), *p*-cymene (5.6 - 6.0%), α -pinene (1.6 - 5.7 %) and linalool (2.7 - 5.1 %).

L'extraction par vapo-distillation des huiles essentielles des feuilles fraîches (HE.FF), feuilles sèches (HE.FS) et des baies (HE.B) de *J. phoenicea* (originaire de Mostaganem), ont donné des rendements respectifs de 0.15%, 0.21% et 0.14%. L'analyse chimique des huiles par CPG-SM a indiqué la présence de 63, 46 et de 78 composés volatiles représentant un total de 98.1%, 98.3% et 96.4% de HE.FF, HE.FS et de HE.B, respectivement. Les HE.FF et HE.FS sont dominées par β -phellandrene (43.9 - 44.9%), α -pinene (20.3 - 25.1%), myrcene (8.2 - 8.5%), α -phellandrene (4.5 - 4.7%), *p*-cymene (2.7 - 3.0%) et limonene (2.3 - 2.5%). Tandis que, l'HE.B

est composée majoritairement de α -pinene (43.7%), *p*-cymene (5.8%), β -phellandrene (4.6%), α -terpineol (4.3%) et α -campholenal (4.0%).

Les résultats de travaux antérieurs ont également rapporté la présence de certains de ces composés majoritaires à des teneurs variées mais aussi, l'absence de certains d'autres par comparaison avec nos échantillons. Les différences de composition chimiques rencontrées dans les huiles essentielles du point de vue qualitatif et quantitatif, peuvent être attribuées à un ou plusieurs facteurs aussi bien extrinsèques qu'intrinsèques.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme, un grand effet inhibiteur des deux huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur les sept souches de référence testées. Les plus sensibles sont *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Candida albicans* ATCC 10231. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées à des diamètres de 50.33 mm pour HE.TM et de 59.67 mm pour HE.TT. Les trois huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* n'ont, quand à elles, été actives que contre *Bacillus cereus* et *Candida albicans*. Les plus grandes zones d'inhibition ont été notées à des diamètres de 34.67 mm (HE.FF), 31.67 mm (HE.FS) et 16.67 mm (HE.B).

La méthode de macrodilution en milieu liquide a permis d'obtenir les concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) à des valeurs allant de 0.312 à 1.25 μ l/ml, 0.312 à 10 μ l/ml et de 0.625 à 2.5 μ l/ml, respectivement concernant HE.TM et de 0.312 à 5 μ l/ml, 0.312 à 10 μ l/ml et à 1.25 μ l/ml, respectivement concernant HE.TT. Tandis que pour *J. phoenicea*, les valeurs de CMI et de CMB ont été enregistrées à des gammes allant respectivement de 0.312 à 1.25 μ l/ml et de 0.625 à 2.5 μ l/ml pour *Bacillus cereus* ATCC 10876 alors que la CMI et la CMF pour *Candida albicans* ATCC 10231, n'ont pu être obtenues que pour l'huile essentielle des baies et ce, à 2.5 μ l/ml et 10 μ l/ml, respectivement.

L'activité antimicrobienne exercée par les huiles de *T. vulgaris* pourrait être attribuée au thymol, γ -terpinène, *p*-cymène, α -pinène et linalool tandis que celle de *J. phoenicea*, pourrait être liée au β -phellandrène, α -pinène, limonène, α -phellandrène, *p*-cymène et myrcène.

Par comparaison aux huiles et plus particulièrement à celles du thym, les antibiotiques n'étaient pas tous actifs contre les souches testées, certains étaient même inactifs contre plus de deux souches tels que l'ampicilline, l'oxacilline et l'érythromycine. Le plus grand diamètre d'halo d'inhibition a été enregistré par la carbénicilline (44.5 mm) contre *Proteus mirabilis* ATCC 35659 tandis que pour les antifongiques, il s'agit de ceux de l'éconazole (29.33 et

29.67 mm) contre *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, respectivement.

L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH et le test de FRAP a montré que les deux huiles essentielles de *T. vulgaris* possédaient une grande activité. En effet, HE.TM et HE.TT ont été capables de piéger le radical libre DPPH. Les valeurs de CE₅₀ ont été obtenues respectivement à 34.13 mg/ml et 24.89 mg/ml pour HE.TM et HE.TT. Celle de l'acide ascorbique a été quant à elle, obtenue à 0.28 mg/ml. Par ailleurs, les trois huiles essentielles de *J. phoenicea* ont exercé un effet antioxydant très faible comparé à l'antioxydant de référence et aux huiles du thym. Seule la valeur de CE₅₀ de l'huile des baies a pu être calculée (9980 mg/ml). En ce qui concerne le test de FRAP, les valeurs de CE₅₀ ont été obtenues à 1.73 mg/ml et 1.71 mg/ml pour HE.TM et HE.TT, respectivement. Ces valeurs sont élevées par rapport à celle de l'acide ascorbique (0.037 mg/ml) mais restent cependant, très faibles comparé à celles des huiles essentielles de *J. phoenicea* et qui sont de l'ordre de, 2057, 1633 et 57.75 mg/ml pour HE.FF, HE.FS et HE.B, respectivement.

L'étude pharmacologique réalisée *in vivo* sur des souris *Swiss albinos* a montré d'une part, que les huiles essentielles administrées par voie orale, ne présentaient relativement pas de risque de toxicité aigue. En effet, toutes les DL₅₀ ont été supérieures à 5000 mg/Kg (Dose maximale), seule celle de HE.TT a été déterminée à 4500 mg/Kg. D'autre part, le test de l'œdème plantaire induit par la carragénine, a permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles de *T. vulgaris*. En effet, ces dernières ont réduit de façon hautement significative ($p < 0.001$) le diamètre de l'œdème formé donnant, ainsi, à la plus grande dose d'huile testée (400 mg/Kg), des pourcentages d'inhibition de 50.4% pour HE.TM et de 58.4% pour HE.TT et ce, six heures après l'injection de la carragénine. Cependant, ces résultats sont inférieurs comparés à celui du diclofénac (85.48% à 10 mg/Kg de p.c). Les huiles de *J. phoenicea* n'ont, quant à elles, exercé qu'un très faible effet sur l'œdème, donnant ainsi, à 400 mg/Kg, des pourcentages d'inhibition de 16.13% pour HE.FF, 14.52% pour HE.FS et 5.65% pour HE.B.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre investigation, constitue une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active, il serait intéressant d'étayer ce travail en :

- Testant d'autres méthodes d'extraction et leurs influences sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles ;
- Extrayant les huiles de d'autres parties des plantes et les étudier ;
- Fractionnant les huiles essentielles, isolant et caractérisant les composants responsables des différentes activités biologiques ;
- Testant les effets des composants actifs séparément et comparant leurs pouvoirs avec ceux des huiles essentielles ;
- Etudiant les mécanismes d'action et les facteurs influençant l'efficacité des huiles essentielles ;
- Elargissant le spectre des propriétés biologiques que peuvent posséder les huiles essentielles en évaluant d'autres activités tant au niveau *in vitro* qu'*in vivo* telles que l'activité antitumorale, antivirale, insecticide et allélopathique.

Références

bibliographiques

- Aafi A, 2003**, Ecosystèmes naturels des zones semi-arides, arides et hyper-arides du Maroc. Dakar. *Edition Enda, Maghreb*, 78p
- Aazza S., Lyoussi B., Miguel M.G, 2012**, Antioxidant activity of eight hydrosols from Morocco. *Asian Journal of Plant Sciences*, **11**(3), 137-142p
- Abdessamed K, 1981**, Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.) dans les massifs de l'Aurès et de Belezma : Etude phytosociologique et problèmes de conservation et d'aménagement. *Thèse de docteur-ingénieur, Université de Marseille, France*, 149p
- Abdirahman A., Batool R, 2016**, Evaluation of bioactivity and preliminary phytochemical investigation of herbal plants against ampicillin resistant bacteria. *Journal of Basic & Applied Sciences*, **12**, 109-117p
- Aboul-Ela M., El-Shaer N., El-Azim T.A, 2005**, Chemical constituents and antihepatotoxic effect of the berries of *Juniperus phoenicea* Part II. *Natural Produc. Sciences*, **11**(4), 240-247p
- Abu-Darwish M.S, 2009**, Essential oils yield and heavy metals content of some aromatic medicinal plants grown in Ash-Shoubak region, south of Jordan. *Advances in Environmental Biology*, **3**(3), 296-301p
- Abu-Darwish M.S., Ofir R, 2014**, Heavy metals content and essential oil yield of *Juniperus phoenicea* L. in different origins in Jordan. *Environmental Engineering and Management Journal*, **13**(12), 3009-3014p
- Aburjai T., Natsheh F.M, 2003**, Plants used in cosmetics. *Pytother. Res*, **17**, 987-1000p
- Achak N, 2006**, Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région Tensift Al Haouz-Marrakech. *Thèse III^e cycle, Université de Marrakech, Maroc*, 304p
- Achak N., Romane A., Alifriquie M., Adams R.P, 2009**, Chemical studies of leaf essential oil of three species of *Juniperus* from Tensift Al-Haouz- Marrakech region (Morocco). *Journal of Essent Oil Res*, **21**, 337-341p
- Adams R.P, 2001**, Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. *Allured Pub. Corp., Carol Stream, IL*
- Adams P.R, 2004**, *Juniperus* of the world: The genus *Juniperus*. *Trafford Publishing Co, Vancouver*
- Adams R.P., Rumeu B., Nogales M., Fontinha S.S, 2009**, Geographic variation and systematics of *Juniperus phoenicea* L. from Madeira and the Canary Islands: Analyses of leaf volatile oils. *Phytologia*, **91**(1), 40-53p
- Adams R.P, 2014**, *Junipers of the world: The genus Juniperus. 4th edition, Trafford Publishing*, 415p
- Adams R.P., Arista M., Boratynski A., Houari H.H., Leschner H., Liber Z., Minissale P., Sciandrello S., Mataraci T, 2014**, Geographic variation in the leaf essential oil of

- Juniperus turbinata* from throughout its range in the Mediterranean. *Phytologia*, **96**(3), 149-158p
- Adossides A, 2003**, La filière plantes aromatiques & médicinales, *FAO Projet. Assistance au recensement agricole*, 70p
- Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F, 2006**, Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk. J. Biol*, **30**, 239-242p.
- Affi M.S., El-Sharkawy S.H., Maatoog G.T., Sohly M., Rosazza J.P.N, 1992**, Essential oils of *Thuja occidentalis*, *Thuja orientalis*, *Cupressus sempervirens* and *Juniperus phoenicea*. *Mandura. J. Pharm. Sci*, **8**, 37-46p
- AFNOR (Association Française de Normalisation), 1986**, Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. *AFNOR, Paris*, 57p
- AFNOR NF X 31-151, 1993**, Sols, sédiments, boues de station d’épuration- Mise en solution d’éléments métalliques en traces (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) par attaques acides. *In* Qualité des sols, AFNOR, 139-145p
- AFNOR (Association Française de Normalisation), 2000**, Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. Monographies relatives aux huiles essentielles. *AFNOR, Paris*
- Agili F.A, 2014**, Chemical composition, antioxidant and antitumor activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *Middle-East Journal of Scientific Research*, **21**(10), 1670-1676p
- Agyare C., Obiri D.D., Boakye Y.D., Osafo N, 2013**, Anti-inflammatory and analgesic activities of African medicinal plants. *In: Medicinal plant research in Africa* (edited by V Kuete), pp 725-752, 1st edition, Elsevier
- Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R., Conchello P, 2012**, Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, **45**, 313-319p
- Ait Youssef M, 2006**, Plantes médicinales de Kabylie. *Edition Ibis Press, Paris*, 349p
- Al-Maqtari M.A.A., Alghalibi S.M., Alhamzy E.H, 2011**, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turkish Journal of Biochemistry*, **36**(4), 342-349p
- Alessandra L.O., Roberta B.L., Fernando A.C., Marcos N.E, 2005**, Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chem*, **99**, 1-5p
- Alfandari S, 1997**, Infections nosocomiales. Epidémiologie, critères du diagnostic, prévention et principe du traitement. *Impact internat: Maladies infectieuses*, **4**, 161-168p
- Alfitori M.O., Lamlom S.H., Aly H.M, 2014**, Essential oil composition of leaves of *Juniperus phoenicea* grown at Al-Jabel Al-Akhdar region, Libya. *Middle-East Journal of Scientific Research*, **22**(3), 368-370p

- Allali H., Benmehdi H., Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N, 2008**, Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian J. Chem*, **20**, 2701-2710p
- Alzand K.I., Aziz D.M., Tailang M, 2014**, Isolation, structural elucidation and biological activity of the flavonoid from the leaves of *Juniperus phoenicea*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **3**(10), 951-965p
- Amalich S., Fadili K., Fahim M., El Hilali F., Zaïr T, 2016**, Polyphenols content and antioxidant power of fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L. from Tounfite (Morocco). *Mor. J. Chem*, **4**(1), 177-186p
- Amer M.M.A., Wasif M.M., Abo-Aytta A.M, 1994**, Chemical and biological evaluation of *Juniperus phoenicea* as a hypoglycaemic agent. *J. Agric. Res*, **21**, 1077-1091p
- Angell M., Kassirer J.P, 1998**, Alternative medicine-The risks of untested and unregulated remedie. *N Engl J Med*, **339**(12), 839-841p
- Angioni A., Barra A., Russo M.T., Coroneo V., Dessi S., Cabras P, 2003**, Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food. Chem*, **51**, 3073-3078p
- Anton R., Lobstein A, 2005**, Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc, Paris*
- Anyasor G.N., Ogunwenmo K.O., Oyelana O.A., Akpofunure B.E, 2010**, Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl (*Costaceae*). *Afr J Biotechnol*, **9**(31), 4880-4884p
- Aprotosoai A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U, 2010**, The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, **58**(1), 46-54p
- Archana B., Dasgupta N., De B, 2005**, *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem*, **90**(4), 727-733p
- Arias C.A., Murray B.E, 2012**, Antibiotic-resistant bugs in the 21st century: A clinical super challenge. *N. Engl. J. Med*, **360**(5), 439-443p
- Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P, 1995**, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, *Edition Masson, Paris*, 700p
- Aruoma O.I, 1998**, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc*, **75**(2), 199-212p
- Assche F.V., Clijsters H, 1990**, Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, **13**(3), 195-206p
- Astagneau P, 1998**, Epidémiologie des infections nosocomiales. *Rev Prat*, **48**, 1525-1529p
- Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbach N., Atmani D, 2009**, Antioxidant capacity and phenol content of slected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, **112**(2), 303-309p

- Ayoola G.A., Coker H.A.B., Adesegun S.A., Adepoju-Bello A.A., Obaweya K., Ezennia E.C., Atangbayila T.O, 2008**, Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7**(3), 1019-1024p
- Azaz A.D., Irtem H.A., Kurkcuoğlu M., Baser K.H, 2004**, Composition and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. *Z Naturforsch*, **59**(1-2), 75-80p
- Aziz E.E., Hendawi S.T., Azza E.E.D., Omer E.A, 2008**, Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. *American-Eurasian J. Agric & Environ Sci*, **4**(4), 443-450p
- Badi N.H., Yazdani D., Mohammad Ali S., Nazari F, 2004**, Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris*. *Ind. Crops. Prod*, **19**, 231-236p
- Bajpai V.K., Kang S.C, 2010**, Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, **87**(3), 327-336p
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M, 2008**, Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446-475p
- Banerjee S., Sur T.P., Mandal S., Das P.C., Sikdar S, 2000**, Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. *Indian J Pharmacol*, **32**, 21-24p
- Baranauskiene R., Venskutonis P.R., Viskelis P., Dambrauskiene E, 2003**, Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J.Agr. Food Chem*, **51**(26), 7751-7758p
- Barnes P, 1998**, Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: Molecular mechanisms. *Clinical Science*, **94**(6), 557-572p
- Barry N, 2001**, Art d'extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi même. *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 125-128p
- Baser K.H.C., Buchbauer G, 2010**, Handbook of essential oils: Science, technology, and applications. *CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton. New York*, 994p
- Bassolé I.H.N., Juliani H.R, 2012**, Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, **17**(4), 3989-4006p
- Baudin B, 2006**, Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*, **2**(1), 43-52p
- Baudry C., Brezellec H, 2006**, Microbiologie-immunologie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 2^{ème} édition, *Groupe Liaisons*, 126p
- Begum V.H., Sadique J, 1988**, Long term effect of herbal drug *Withania somnifera* on adjuvant induced arthritis in rats. *Indian J Exp Biol*, **26**(11), 877-882p

- Bekhechi C., Atik Bekkara F., Consiglio D., Bighelli A., Tomi F, 2012**, Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, **9**(12), 2742-2753p
- Belaqziz R, 2007**, Contribution à la valorisation de substances naturelles : Etude de certaines lamiacées. Synthèse chimio-enzymatique de thiols d'intérêt organoleptique. *Thèse de doctorat, Université de Marrakech, Maroc*, 171p
- Bellakhdar J, 1997**, La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Edition Ibis Press, Paris*, 272p
- Benabid A, 2000**, Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité. *Ibis Press, Paris*, 360p
- Bensouilah J., Buck P, 2006**, Aromadermatology: Aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions. *Radcliffe Publishing, Abingdon, UK*, 249p
- Berche P., Gallard J.L., Simonnet M, 1991**, Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leur prévention. Bactériologie des infections humaines de la biologie à la clinique. *Flammarion, Paris*, 64-71p
- Berger M.M, 2006**, Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**, 48-53p
- Bernadet M, 2000**, Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Dictionnaire thérapeutique de 530 affections courantes. *Dangles, Toulouse, France*, 384p
- Berrebi W, 2009**, Diagnostics et thérapeutique de poche : Guide pratique du symptôme à la prescription. 5^{ème} édition, *ESTEM, Paris*, 1826p
- Berset C., Cuvelier M.E, 1996**, Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Science des Aliments*, **16**, 219-245p
- Besombes C, 2008**, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France*, 289p
- Bolou G.E.K., Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan J.D., Djaman A.J, 2011**, Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **80**, 772-790p
- Bontoux D., Debiais F., Azais I, 2014**, Rhumatologie. 2^{ème} édition, *Lavoisier, Paris*, 737p
- Borugă O., Jianu C., Mișcă C., Goleț I., Gruia A.T., Horhat F.G, 2014**, *Thymus vulgaris* essential oil : Chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, **7**(3), 56-60p
- Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T, 1999**, Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. *Spectra Analyse*, **207**, 11-25p

- Bouchonnet S., Libong D, 2002**, Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de chimie, Laboratoire des mécanismes réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex
- Bouguerra N., Djebbar F.T., Soltani N, 2017**, Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research*, **4**(1), 37-42p
- Bouhassira D., Calvino B, 2009**, Douleurs : Physiologie, physiopathologie et pharmacologie. *Arnette*, 384p
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J, 2006**, *Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. In: Congrès International de Biochimie. *Agadir*, Morocco, May 9-12, 2006, pp. 1-4
- Bouilet L, 2007**, Notes sur la technique traditionnelle d'extraction du goudron végétal. *Projet Machrek & Maghreb III, Algérie*
- Bounihi A, 2016**, Criblage phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). *Thèse de doctorat, Université de Rabat, Maroc*, 199p
- Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B, 2009**, Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *AgroSolutions*, **20**(1), 45-48p
- Bouyahyaoui A., Bahri F., Romane A., Höferl M., Wanner J., Schmidt E., Jirovetz L, 2016**, Antimicrobial activity and chemical analysis of the essential oil of Algerian *Juniperus phoenicea*. *Natural Product Communications*, **11**(4), 519-522p
- Bouyahyaoui A, 2017**, Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des Cupressacées de la région de l'Atlas algérien. *Thèse de doctorat, Université de Mostaganem, Algérie*
- Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M.M, 2008**, Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Société Chimique de Tunisie*, **10**, 119-125p
- Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C., Padurariu C, 2009**, Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 36-39p
- Bozin B., Mimica-dukic N., Simin N., Anackov G, 2006**, Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **54**, 1822-1828p
- Brada M., Achour D., Wathelet J.-P., Lognay G, 2009**, Study of essential oils of some plants from Algeria (*Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Ruta chalepensis*). In: 8ème congrès de la Société Algérienne de Chimie, *Béjaia, Algérie*, May 26-28, 2009

- Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., Galastri L., Marceca M.T., Guffanti E.E, 2006**, Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, **76**, 61-68p
- Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.d.O., Moreira F.O., Scio E., Coimbra E.S, 2007**, Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 396-402p
- Braga P.C., Dal Sasso M., Fonti E., Culici M, 2009**, Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil burst and cell-free systems. *Pharmacology*, **83**(2), 110-115p
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C, 1995**, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, **28**(1), 25-30p
- Brochant de Villers A.J.F.M., Brongniart A., Turpin P.J.F., Cuvier F.G., Cloquet H., Dumériel A.M.C., Ducrotay de Blainville H.M., Desmarest A.-G, 2008**, Dictionnaire des sciences naturelles. *Volume 18, Edition Levrault, Paris*, 594p
- Bruneton J, 1993**, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition, *Tec & Doc. Lavoisier. Paris*, 915p
- Bruneton J, 1999**, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 1120p
- Bruneton J, 2009**, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition, *Tec & Doc, Lavoisier, Paris*, 1292p
- Buchbauer G., Jirovetz L, 1994**, Aromatherapy- Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, 217-222p
- Buchmann A.L, 2001**, Side effects of corticosteroid therapy. *J. Clin. Gastroent*, **33**(4), 289-294p
- Burt S, 2004**, Essential oils: Antibacterial properties and potential applications in food: A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(3), 223-253p
- Burt S.A., van der Zee R., Koets A.P., De Graaff A.M., van Knapen F., Gaastra W., Haagsman H.P., Veldhuizen E.J.A, 2007**, Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibit synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **73**(14), 44484-44490p
- Caillet S., Lacroix M, 2007**, Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS- Institut Armand- Frappier, Université de Laval, Québec, Canada*, 89p
- Calcagno F., Lacroix R, 2011**, Pharma-memo infectiologie. *Vernazobres-Greco, Paris*, 246p
- Campbell P.G.C., Pelletier E., Denizeau F, 2004**, Ecotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. *PUQ, Québec, Canada*, 462p

- Carette A.S, 2000**, La lavande et son huile essentielle. *Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France*, 100p
- Carillon A, 2009**, Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXI^{ème} siècle. *In: Conférence SIPAM, Djerba, Tunisie, Mars 2009*, 7p
- Carlson L.H.C., Machado R.A.F., Spricigo C.B., Pereira L.K., Bolzan A, 2001**, Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **21**, 33-39p
- Carrera-Martínez C.A., Rosas-López R, Rodríguez-Monroy M.A., Canales-Martínez M.M., Román-Guerrero A., Jiménez-Alvarado R, 2014**, Chemical composition and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **17**(5), 758-768p
- Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Proença da Cunha A, 2001**, Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**, 1175-1183p
- Cavalli J.-F, 2002**, Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. *Thèse de doctorat en chimie organique et analytique, Université de Corse, France*, 274p
- CCLIN Paris-Nord, décembre 2007**, Le bulletin n°31 : Réseaux de surveillance, 22p, disponible en ligne <http://www.cclinparisnord.org/Bulletin/Bull31.pdf>
- Chao L.K., Hua K.-F., Hsu H.-Y., Cheng S.-S., Liu J.-Y., Chang S.-T, 2005**, Study of anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Agric. Food. Chem*, **53**, 7274-7278p
- Charles D.J, 2012**, Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *Springer Science & Business Media*, 612p
- Charpentier B., Hamon-Lorleac'h F., Harlay A., Huard A., Ridoux L., Chanselle S, 2008**, Guide du préparateur en pharmacie. 3^{ème} édition, *Elsevier Masson, Paris*, 1358p
- Chalus-Dancla E., Cloeckert A., Payot S., Baucheron S, 2002**, Les multiples façons de faire de la résistance aux antibiotiques. *In : Antibiothérapie bovine. Acquis et consensus* (coordonné par C Legrand), pp 53-67. *Le Point Vétérinaire, Maisons-Alfort*
- Chazel M., Chazel L, 2012**, Découverte naturaliste des garrigues. *Quae édition*, 208p
- Chun H., Shin D.H., Hong B.S., Cho H.Y., Yang H.C, 2001**, Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L.. *Biol. Pharm. Bull*, **24**(8), 941-946p
- Cillard J., Cillard P, 2006**, Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, **13**(1), 24-29p
- Číž M., Čížová H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A, 2010**, Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, **21**, 518-523p

- Clos J, 2012**, Immunité chez les animaux et les végétaux : Aspects fondamentaux et physiopathologiques. *Lavoisier, Paris*, 432p
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2002**, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. *Wayne (Approved Standard M38-A)*
- Coates A.R.M, 2012**, Antibiotic resistance. *Springer Science & Business Media*, 192p
- Comte G., Allais D.P., Chulia A.J., Vercauteren J., Bosso C, 1996**, Phoeniceroside, the first natural Bis-Furanone Propane derivatives from *Juniperus phoenicea* L. *Tetrahedron Letters*, **37** (17), 2955-2960p
- Comte G., Vercauteren J., Chulia A.J., Allais D.P., Delage C., Pinaud N, 1997**, Three phenylpropanoids from *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry*, **44**(6), 1167-1173p
- Conner D.E., Beuchat L.R, 1984**, Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J Food Sci*, **49**, 429-434p
- Constantin E, 1996**, Spectrométrie de masse, *Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 126p
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M.V., Arzedi E., Palmas F, 1999**, *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol*, **29**, 130-135p
- Cosentino S., Barra A., Pisano B., Cabisa M., Pirisi F., Palmas M, 2003**, Composition and antimicrobial properties of Sardinian *Juniperus* essential oils against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *J. Food. Prot.*, **66**, 1288-1291p
- Couplan F, 2000**, Dictionnaire d'étymologie de botanique : Comprendre facilement tous les noms scientifiques. *Edition Lausanne : Delachaux et Niestlé, Paris*, 238p
- Cousins M.J., Power I, 1999**, Acute and postoperative pain. *In: Textbook of pain* (edited by P.D Wall., R Melzack), pp 447-491, *Edinburgh, Churchill Livingston*
- Cowan M.M, 1999**, Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(4), 564-582p
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G, 2000**, The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**(1), 170-175p
- Crespo M.E., Jiménez J., Navarro C, 1991**, Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*. *In: Modern Methods of Plant Analysis*, (edited by H.F. Linskens and J.F. Jackson), pp 41-46. *Vol 12, New series, Essential oils and waxes. Springer-Verlag, Berlin*
- Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D, 2007**, Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(15), 6300-6308p
- Crouzilles C., Siebert C, 2012**, Processus inflammatoires et infectieux : Unité d'enseignement 2.5. *Vol 14, Elsevier Masson, Paris*, 216p

- D'Auria F., Tecca M., Strippoli V., Salvatore G., Battinelli L., Mazzanti G, 2005**, Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, **43**(5), 391-396p
- da Silva F.C., Chalfoun S.M., de Siqueira V.M., Botelho D.M.d.S., Lim N., Batista L.R, 2012**, Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **22**(5), 1002-1010p
- Dacosta Y, 2003**, Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. édition Yves Dacosta, Paris, 317p
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G, 2000**, GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agr. Food Chem*, **48**(6), 2576-2581p
- Dakki M, 2003**, Embouchure de la Moulouya. *Rapport de synthèse, projet MedWetWoast, Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Eau et de l'Environnement, Maroc*, 114p
- Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T.A., Linssen J.P.H, 1998**, Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture*, **77**(1), 140-146p
- Dapkevicius I., van Beek T.A., Lelyveld G.P., van Veldhuizen A., de Groot A., Linssen J.P., Venskutonis R, 2002**, Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J Nat Prod*, **65**(6), 892-896p
- Davidson P.M, Parish M.E, 1989**, Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*, **43**(1), 148-155p
- Davidson P.M, 2001**, Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. *In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (Edited by M.P Doyle., L.R Beuchat and T.J Montville), pp 593-628. 2nd edition, ASM Press, Washington
- Davies J.E, 1997**, Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp*, **207**, 15-27p
- Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O, 2009**, Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 4022-4034p
- Dayer J.-M., Schorderet M, 1998**, Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation : Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. *In : Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* (coordonné par M Schorderet), pp 569-581. 3^{ème} édition, Frison-Roche, Slatkine, Paris-Genève
- De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A, 1999**, Condensed vegetables tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical System Ecology*, **27**, 445-459p
- de Cássia da Silveira e Sá R., Andrade L.N., de Sousa D.P, 2013**, A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, **18**, 1227-1254p

- Debazac E.-F, 1991**, Manuel des conifères. *E.N.G.R.E.F*, 2^{ème} édition, Nancy, 172p
- Degryse A.C., Delpla I and Voinier M.A, 2008**, Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement-IGS-EHESP*, 87p
- Delamare G, 1999**, Dictionnaire des termes de médecine. 25^{ème} édition, Maloine, Paris
- Delitala F.L, 1980**, Ricerche chemiotassonomiche sul genere *Juniperus* Linnaeus. *Riv Ital EPPOS*, 62, 303-309p
- Demoré B., Grare M., Duval R.E, 2012**, Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation. *In : Pharmacie clinique et thérapeutique* (coordonné par J Calop., S Limat., C Fernandez et G Aulagner), pp 801-844. 4^{ème} édition, Elsevier Masson, Paris
- Deng C., Yao N., Wang A., Zhang X, 2005**, Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 536(1-2), 237-244p
- Denis F, 2002**, Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. *John Libbey Eurotext, Paris*, 484p
- Denyer S.P., Hugo W.B, 1991**, Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *In: Mechanisms of action of chemical biocides*, The Society for Applied Bacteriology, Technical Series n°27 (edited by S.P Denyer and W.B Hugo), pp 171-188. *Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK*
- Deroin T, 1988**, Biologie florale d'une Annonacée introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thoms. *Bulletin du Musée National d'Histoire Naturelle*, 10(4), 377-393p
- Derwich E., Benziane Z., Boukir A, 2010**, Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12(2), 199-204p
- Desmares C., Laurent A., Delerme C, 2008**, Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS. Anatole, France*, 18p
- Dethier M, 1996**, Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi. *Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France*, 182p
- Díaz-Maroto M.C., Díaz-Maroto Hidalqo I.J., Sánchez-Palomo E., Pérez-Coello M.S, 2005**, Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food. Chem*, 53(13), 5385-5389p.
- Dilaser M, 1979**, Intoxication par le camphre et le menthol par voie trans-cutanée d'un nourrisson de six semaines. *Bull. Sign*, 40, 194p

- DiRosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A., 1971**, Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Patho*, **104**(1), 15-29p.
- Djingova R., Kuleff I., 2000**, Instrumental techniques for trace analysis. *In: Trace elements: Their distribution and effects in the environment* (Edited by J.P Vernet), pp 137-185, *Vol 4, Elsevier, London, UK*
- Dolara P., Luceri C., De Filippo C., Femia A.P., Giovannelli., Carderni G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A., 2005**, Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*, **591**(1-2), 237-246p
- Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A., Menut C., 2010**, Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (*Burseraceae*) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am*, **1**(4), 606-611p
- Donsì F., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G., 2011**, Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci Technol*, **44**, 1908-1914p
- Dorman H.J., Deans S.G., 2000**, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol*, **88**(2), 308-316p
- Drogoul C., Germain H., 1998**, Santé animale : Bovins, ovins, caprins. 1^{ère} édition, *Educagri, Dijon*, 346p
- Duarte M.C., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L., Delarmelina C., 2005**, Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **97**(2), 305-311p
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J., 2004**, Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, **135**(4), 1893-1902p
- Dugo G., Di Giacomo A., 2002**, *Citrus: The genus Citrus, Collection Medicinal & Aromatic Plants, Taylor & Francis Ltd, London*, 656p
- Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C., 2008**, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(12), 3632-3639p
- Duplan B., Marty M., 2001**, Bien soigner le mal de dos. *Odile Jacob, Paris*, 346p
- Durand G., Beaudeau J.-L., 2011**, Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2^{ème} édition, *Lavoisier, Paris*, 607p
- Ebrahimabadi A.H., Mazoochi A., Kashi F.J., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H., 2010**, Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food Chem. Toxicol*, **48**(5), 1371-1376p
- Eddouks M., Chattopadhyay D., Zeggwagh N.A., 2012**, Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:14. doi: 10.1155/2012/142087.142087

- Edris A.E, 2007**, Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res*, **21**, 308-323p
- El-Akhal F., Greche H., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R., El Ouali Lalami A, 2015**, Composition chimique et activité larvicide sur *Culex pipiens* d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* cultivées au Maroc. *J. Mater. Environ. Sci*, **6**(1), 214-219p
- El-Sawi S.A., Motawae H.M., Ali A.M, 2007**, Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *Afr. J. Trad. CAM*, **4**(4), 417-426p
- El-Sawi S.A., Motawae H.M, 2008**, Labdane, Pimarane and Abietane diterpenes from the fruits of *Juniperus phoenicea* L. Grown in Egypt and their activities against human liver carcinoma. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*, **2**(1), 115-122p
- El-Sawi S.A., Motawae H.M., Sleem M.A.-F., El-Shabrawy A.-R.O., Sleem A., Ismail M A.-N, 2014**, Phytochemical screening, investigation of carbohydrate contents, and antiviral activity of *Juniperus phoenicea* L. growing in Egypt. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **20**(1), 83-91p
- Ennajjar M., Mehrez R., Manef A, 2007**, Influence de la période de récolte sur la teneur et la composition de l'huile essentielle du genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea* L.). *Revue des Régions Arides (Tunis)*, **2**, 647-651p
- Ennajjar M., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Abderraba M., Raies A., Romdhane M, 2009**, Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressacees). *Journal of Food Science*, **74**(7), 364-371p
- Ennajjar M., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Savagnac A., Abderraba M., Raies A., Romdhane M, 2010**, The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *J Sci Food Agric*, **90**(3), 462-470p
- Eyob S., Martinsen B.K., Tsegaye A., Appelgren M., Skrede G, 2008**, Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen). *African Journal of Biotechnology*, **7**(15), 2585-2592p
- Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevão-Silva C.F., Carvalho M.D.d.B., Cunha J.M., Grespan R., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K.N, 2012**, Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, e657026
- Fadel H., Benayache F., Benayache S, 2016**, Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus phoenicea* L., *Marrubium vulgare* L. and *Cedrus atlantica* (Manetti ex Endl). *Der Pharmacia Lettre*, **8**(3), 72-79p
- Fadli M., Chevalier J., Saad A., Mezrioui N.E., Hassani L., Pages J.M, 2011**, Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, **38**(4), 325-330p

- Fantino N.S, 1990**, Etude du polymorphisme d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. *Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France*, 41-45p
- FAO/WHO, 1984**, List of maximum levels recommended for contaminants by the joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, *2nd edition, FAO/WHO, Rome, Italy*, 1-8p
- Faria L.R.D., Lima C.S., Perazzo F.F., Carvalho J.C.T, 2011**, Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **7**(2), 1-8p
- Farjon A, 2005**, A monograph of *Cupressaceae* and *Sciadopitys*. *Royal Botanic Gardens edition. Michigan, USA*, 643p
- Farrell K.T, 1998**, Spices, condiments and seasonings. *2^{ème} édition, Springer Science & Business Media*, 414p
- Favier A, 2003**, Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **14**, 108-115p
- Favier A, 2006**, Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr*, **64**(6), 390-396p
- Fayad N.K., Al-Obaidi O.H.S., Al-Noor T.H, 2013**, Water and alcohol extraction of thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*, **4**(1), 41-51p.
- Fazel M., Omid B.M., Barzegar M., Naghdi B.H, 2007**, Influence of heating on antiradical activity of essential oils of thyme, summer savory and clove by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. *J. Med. Plants*, **2**(22), 54-63p
- Fialkow L., Wang Y., Downey G.P, 2007**, Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine*, **42**(2), 153-164p
- Filipowicz N., Kaminski M. Kurlenda J., Asztemborska M, 2003**, Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytother Res*, **17**(3), 227-231p
- Fillatre Y, 2011**, Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. *Thèse de doctorat. Université d'Angers. France*, 288p
- Fischer N.H., Williamson G.B., Weidenhamer J.D., Richardson D.R, 1994**, In search of allelopathy in the Florida Scrub- the role of terpenoids. *J. Chem. Ecolo*, **20**, 1355-1380p
- Fisher K., Phillips C, 2008**, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? A review. *Trends in Food Science and Technology*, **19**(3), 156-164p

- Fisher K., Phillips C, 2009**, In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.*, **66**(4), 180-185p
- Forbes J.C., Watson R.D, 1992**, Plants in agriculture. *Cambridge University Press*, 355p
- Ford R.A., Api A.M., Letizia C.S, 1992**, Monographs on fragrance raw materials: Special issue VIII. *Food Chem. Toxicol.*, **30**(S), 1S-138S
- Franchomme P., Pénoel D, 1990**, L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Edition Roger Jallois, Limoges, France*, 445p
- Frank P, 1986**, La végétation d'Afrique, *Edition IRD*, 169p
- Franz-Xaver R., 2010**, Guide pratique de toxicology. 2^{ème} édition, De Boeck, Bruxelles, Belgique, 360p
- Furmanowa M., Olszowska O, 1992**, Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: High-Tech and micropropagation III (coordonné par Y.P.S Bajaj). pp 230-243. *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 19. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.*
- Gandini J, 2006**, Pistes du Maroc à travers l'histoire : Haut et moyen Atlas, *Volume 1, Edition SERRE*, 524p
- Garnéro J, 1991**, Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. *Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France*, 2-20p
- Garnéro J, 1996**, Huiles essentielles. *Techniques de l'ingénieur, K 345, Paris*, 39p
- Garnier B., Jarlier V, 1996**, Bêta-lactamines et bacilles à Gram négatif. *Feuillets de Biologie, XXXVII*(212), 13-20p
- Geetha T.S., Geetha N, 2014**, Phytochemical screening, quantitative analysis of primary and secondary metabolites of *Cymbopogon citratus* (DC) stapf. leaves from Kodaikanal hills, Tamilnadu. *International Journal of PharmTech Research*, **6**(2), 521-529p
- Ghalem B.R., Otsmane M., Sebaa F, 2016**, Antioxidant capacity of essential oils of two *Juniperus* species from Northwest of Algeria. *American Journal of Applied and Industrial Chemistry*, **2**(6), 33-36p
- Gholivand M.B., Rahimi-Nasrabadi M., Batooli H., Ebrahimabadi A.H, 2010**, Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food Chem. Toxicol.*, **48**(1), 24-28p
- Ghrabi Z, 2001**, La végétation de la zone littorale de Zouarâa. *Edition APAL*, 25p
- Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H, 2004**, Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res*, **18**(12), 990-995p
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J, 2008**, Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, **79**(3), 199-203p

- Goetz P., Ghédira K, 2012**, Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer Science & Business Media*, 394p
- Goldmann D.A., Weinstein R.A., Wenzel R.P., Tablan O.C., Duma R.J., Gaynes R.P., Schlosser J., Martone W.J, 1996**, Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. *JAMA*, **275**(3), 234-240p
- Gómez-Estaca J., López de Lacey A., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C, Montero P, 2010**, Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol*, **27**(7), 889-896p
- Goudable J., Favier A, 1997**, Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **11**, 115-120p
- Gouilly P., Petitdant B, 2006**, Comprendre la kinésithérapie en rhumatologie. *Elsevier Masson, Paris*, 318p
- Grysole J, 2005**, La commercialisation des huiles essentielles. *In : Huile essentielle : de la plante à la commercialisation : Manuel pratique* (coordonné par F.-X Garneau., G.J Collin., Université du Québec à Chicoutimi., Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales), pp 1-24. *Corporation Laseve. Québec, Canada*
- Guba R, 2001**, Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, **11**, 76-83p
- Guesmi A., Boudabous A, 2006**, Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, 224-230p
- Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A., Benmansour A, 2009**, Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*, **5**(2), 246-259p
- Hale A.L, 2003**, Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. *PhD, Office of Graduate Studies of Texas A & M University, Genetics, USA*, 260p
- Halliwell B, 1993**, The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health*, **9**(1-2), 1-21p
- Halliwell B, 1994**, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?. *Lancet*, **344**(8924), 721-724p
- Halliwell B., Whiteman M, 2004**, Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, **142**(2), 231-255p
- Halliwell B, 2007**, Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health ?. *Cardiovasc Res*, **73**(2), 341-347p

- Hanberger H., Garcia-Rodriguez J.A., Gobernado L., Goossens H., Nilsson L.E., Struelens M.J., 1999**, Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA*, **281**(1), 67-71p
- Harley R.M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P.H., Conn B., Grayer R., Harley M.M., Kok R., Krestovskaja T., Morales A., Paton A.J., Ryding O., Upson T., 2004**, *Labiatae*. In: Kadereit, J.W. (ed.). The families and genera of vascular plants (Kubitzki, K: ed.). Vol 7, pp 167-275
- Harley R.M., França F., Santos E.P., Santos J.S., 2010**, *Lamiaceae*. In : Catálogo de plantas e fungos do Brasil, Vol 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 1130-1146
- Hashim S., Gamil M., 1988**, Plants and herbs between the iraqi folk medicine and scientific research. *Baghdad, Dar revolution of Press and Publication*
- Havsteen B.H., 2002**, The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96**(2-3), 167-202p
- Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A.R., Faleiro M.L., Miguel M.G., 2009**, Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, **116**(3), 714-721p
- Heide L., 1991**, Traditionelle arzneipflanzen in der gesundheitsversorgung der dritten welt-möglichkeiten und grenzen. *Zeitschrift für Phytotherapie*, **12**, 1-8p
- Hellal Z., 2011**, Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*).Mémoire de magister. Université de Tizi-Ouzou, Algérie, 120p
- Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A., 2007**, Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, **54**, 44-50p
- Hernandez-Ochoa L.R., 2005**, Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/Actif ». D'origine végétale. *Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France*
- Hocquet-Berg S., Py B., 2006**, La responsabilité du médecin. *Heures de France, Paris*, 179p
- Hoffman D., 2003**, Medical herbalism: The science and practice of herbal medicine. *Healing Arts Press, Rochester, Vermont*, 666p.
- Homburger F., Boger E., 1968**, The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review. *Cancer Res*, **28**, 2372-2374p
- Hossain M.A., Al-Raqmi K.A.S., Al-Mijizy Z.H., Weli A.M., Al-Riyami Q., 2013**, Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**(9), 705-710p

- Huang H.S., Chang L.H., Jong T.T., Nien Y.F., Chang C.M.J, 1995**, Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn. And purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*, **47**, 119-125p
- Hudaib M., Aburjai T, 2007**, Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 322-327p
- Huguette M, 2008**, La route des épices, aromatisants, condiments et mélange d'épices. *Edition Sang de la terre, Paris*, 190p
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., Dufossé L, 1998**, Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, **18**(6), 563-582p
- Hureau J, 1999**, Les infections nosocomiales : Risques, préventions, responsabilités. *Experts*, **42**, 20-24p
- Hygis N, 1998**, Hygiène hospitalière. *Presses Universitaires de Lyon, France*, 666p
- Hyun J.-E., Bae Y.-M., Song H., Yoon J.-H., Lee S.-Y, 2015**, Antibacterial effect of various essential oils against pathogens and spoilage microorganisms in fresh produce. *Journal of Food Safety*, **35**(2), 206-219p
- Ibrahim K.N., Yet Z.R., Som A.M., Razali N., Rahaizah N.A.M., Othman E.N., Burok N.A., Yunus Y.M., Othman R., Yahya T.F.T, 2015**, Heavy metal concentration (Pb, Cu, Fe, Zn, Ni) in plant parts of *Zea Mays* L. cultivated in agricultural area near Alor Gajah, Melaka, Malaysia. *American Journal of Environmental Engineering*, **5**(3A), 8-12p
- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri A, 2009**, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture & Biology*, **11**(2), 205-208p
- Imelouane B., Tahri M., Elbatrioui M., Aouinti F., Elbachiri A, 2011**, Mineral contents of some medicinal and aromatic plants growing in eastern Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*, **2**(2), 104-111p
- Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hamashima H., Shimada J, 2004**, The antibacterial effects of myrcene on *Staphylococcus aureus* and its role in the essential oil of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*). *Natural Medicines*, **58**(1), 10-14p
- Iserin P. Vican P, 2001**, Encyclopédie des plantes médicinales/ Identification, préparations, soins. Larousse édition, Paris, 335p
- Isman M.B, 2000**, Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, **19**, 603-608p
- Isman M.B., Miresmailli S., Machial C, 2010**, Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, DOI: 10.1007/s11101-010-9170-4

- Jadia C.D., Fulekar M.H., 2009**, Phytoremediation of heavy metals: recent techniques. *African Journal of Biotechnology*, 8(6), 921-928p
- Jain P., Pandey R., Shukla S.S., 2014**, Inflammation: Natural resources and its applications. *Springer, India*, 156p
- Jalas J., 1971**, Notes on *Thymus* L. (*Labiatae*) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.*, 64, 199-215p
- Janssen A.M., Scheffer J.J., Baerheim Svendsen A., 1987**, Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med.*, 53(5), 395-398p
- Jarlier V., 2004**, Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : Des premiers indicateurs au réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). *Bull Epidemiol Hebdo*, 32-33, 148-151p
- Jaset Dongmo P.M., Tatsadjieu N.L., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P.H., Menut C., 2008**, Antiradical potential and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Citrus latifolia* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(22), 4045-4050p
- Jaume Saint-Hilaire J.H., 2010**, Plantes de la France: décrites et peintes d'après nature. *Volume 7, Edition Chez l'auteur, Paris*, 360p
- Jia H.L., Ji Q.L., Xing S.L., Zhang P.H., Zhu G.L., Wang X.H., 2010**, Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. And *Thymus proximus* Serg.. *J. Food Sci.*, 75(1), E59-65
- Johnson T., 1998**, CRC ethnobotany desk reference. *CRC Press*, 1224p
- Jordán M.J., Martínez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A., Sotomayor J.A., 2006**, Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 253-263p
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P., 2002**, Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. *De Boeck université, Paris-Bruxelles*, 467p
- Juhás S., Bujňáková D., Reháč P., Čikoš Š., Czikková S., Veselá J., Il'ková G., Koppel J., 2008**, Anti-inflammatory effects of thyme essential oil in mice. *Acta Vet. Brno*, 77, 327-334p
- Just M.J., Recio M.C., Giner R.M., Cuéllar M.U., Máñez S., Billia A.R., Ríos J.L., 1998**, Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticosum*, *Planta Med.*, 64(5), 404-407p
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., 2005**, Comparative antibacterial activity of five *Lamiaceae* essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 15(3), 129-133p
- Kadi Z., Golliot F., Astagneau P., 1995**, Guide de définition des I.N. *CCLIN, Paris-Nord*

- Kalemba D., Kunicka A, 2003**, Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, **10**, 813-829p
- Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F, 2008**, Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, **6**(3), 160-164p
- Kaloustian J., Hadji-Minaglou F, 2013**, La connaissance des huiles essentielles: Qualitologie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. *Springer Science & Business Media*, 226p
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.-A, 1996**, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**(7), 671-701p
- Kamatou G.P.P., Viljoen A.M, 2010**, A review of the application and pharmacological properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc*, **87**(1), 1-7p
- Kar A, 2007**, Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. 2nd edition, *New Age International Publishers*, 898p
- Karagözler A., Erdag B., Calmaz Emek Y, 2008**, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, **111**(2), 400-407p
- Kazemi M., Mousavi E., Bandrez N, 2012**, Chemical compositions and antibacterial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Tanacetum parthenium*. *Research Journal of Soil Biology*, **4**(2), 21-31p
- Kelen M., Tepe B, 2008**, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, **99**(10), 4096-4104p
- Keramat M., Golmakani M.T, 2016**, Effect of *Thymus vulgaris* and *Bunium persicum* essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas Aceites*, **67**(4), 1-11p
- Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F., Pirmoradei M.R, 2005**, Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, **91**, 639-644p
- Kidd B.L., Urban L.A, 2001**, Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, **87**(1), 3-11p
- Kim N.S., Lee D.S, 2002**, Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatographymass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **98**, 31-47p
- Kim D.S., Lee H.J., Jeon Y.D., Han Y.H., Kee J.Y., Kim H.J., Shin H.J., Kang J.W., Lee B.S., Kim S.H., Kim S.J., Park S.H., Choi B.M., Park S.J., Um J.Y., Hong S.H, 2015**, Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine*, **43**(4), 731-742p

- Kirschvink N., de Moffarts B., Lekeux P, 2008**, The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, **177**(2), 178-191p
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A, 2004**, A new hydroxyjasnone glucoside and its related compounds from the leaf of thyme. *Chem. Pharm. Bull*, **52**(8), 1013-1014p
- Ko S.-G., Yin C.S., Du B., Kim K.H, 2014**, Herbal medicines for inflammatory diseases. *Hindawi Publishing Corporation*, 108p
- Kocić-Tanackov S.D., Dimić G.R, 2013**, Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *In: Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education* (edited by A Méndez-Vilas), pp 838-849. *Formatex Research Center, Badajoz, Spain*
- Koechlin-Ramonatxo C, 2006**, Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**(4), 165-177p
- Kokate K.C, 1997**, Practical pharmacognosy, 4th ed. *Delhi: Vallabh Prakashan*, 218p
- Konan Kouadio F., Guessennd N.K., Karamoko O., Bahi C., Adama C., Dosso M, 2013**, Action antibactérienne de l'extrait éthanolique 70% de *Clerodendrum splendens* (G. Don) (*Verbenaceae*) sur des souches bactériennes isolées de selles chez des enfants diarrhéiques. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, **7**(3), 1332-1337p
- Koné W.M., Kamanzi Atindehou K., Kacou-n'douba A., Dosso M, 2007**, Evaluation of 17 medicinal plants from Northern Côte d'Ivoire for their in vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, **4**(1), 17-22p
- Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D, 2002**, Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, **113**, 71S-88S
- Kuhn M.A., Winston D, 2008**, Winston & Kuhn's herbal therapy & supplements: A scientific & traditional approach. 2nd edition, *Lippincott Williams & Wilkins*, 560p
- Kuklinski C, 2000**, Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Edition Omega S.A, Barcelone, Espagne
- Kulisic T., Radonic A., Milos M, 2005**, Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian J. Food Sci*, **17**(3), 1-10p
- Kumar P.P., Kuttan G, 2009**, *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **31**(1), 94-102p
- Kumar V., Abbas A., Fausto N, 2010**, Robbins and Cotran, pathologic basis of disease, 8th edition, *Sauders, Philadelphia*, 1464p

- Kumar S., Bajwa B.S., Kuldeep S., Kalia A.N, 2013**, Anti-inflammatory activity of herbal plants: A review. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, **2**(2), 272-281p
- Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y, 1981**, Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**(4), 945-952p
- Lagunez Rivera L, 2006**, Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. *Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France*, 335p
- Lahlou M, 2004**, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, **18**, 435-448p
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E, 2001**, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**(3), 453-462p
- Langenheim J.H, 1994**, Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, **20**(6), 1223-1280p
- Lanhers M.C., Fleurentin J., Rolland A., Vinche A, 1992**, Activité anti-inflammatoire d'un extrait de *Peumus boldus* Molina (*Monimiaceae*). *Phytotherapy*, 38-39, 12-13p
- Latif A., Amer H.M., Hamad M.E., Alarifi S.A.R., Almajhdi F.N, 2014**, Medicinal plants from Saudi Arabia and Indonesia: *In vitro* cytotoxicity evaluation on Vero and HEP-2 cells. *Journal of Medicinal Plant Research*, **8**(34), 1065-1073p
- Lawrence B.M, 1989**, Juniper-berry oil. Essential oils (1987-1988). *Allured Publishing Corporation, Wheaton*, 240-241p
- Lawrence B.M., Tucker A.O, 2002**, The genus *Thymus* as a source of commercial products. In: Thyme: The genus *Thymus* (coordonné par E Stahl-Biskup., F Saez), pp 252-262. *Taylor & Francis, Londres*
- Le Floch E, 1983**, Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. *Publ. Sc. Tunisiennes*. Programme « Flore et végétation tunisienne ». Imprimerie officielle de la république Tunisienne, 402p
- Le Loir Y., Gantier M, 2009**, *Staphylococcus aureus*. *Lavoisier, Paris*, 300p
- Le Maout E., De Jussieu A, 2012**, Botanique : Organographie et taxonomie : histoire naturelle des familles végétales et des principales espèces, suivant la classification de M. Adrien de Jussieu avec l'indication de leur emploi dans les arts, les sciences et le commerce. *Edition L. Curmer, Paris*, 387p
- Lechat P., Calvo F., De Crémoux P., Giroud J.-P., Lagier G., Lechat Ph., Rouveix B., Weber S, 1990**, Pharmacologie médicale, 5^{ème} édition, *Masson, Paris*, 741p
- Lee S., Lee I., Mar W, 2003**, Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. *Arch Pharm Res*, **26**(10), 832-839p

- Leffingwell J.C.**, (Consulté le 24 Janvier 2011), Rose (*Rosa damascena*). Disponible sur <http://www.leffingwell.com/rose.htm>
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M, 2001**, Stress oxydant et pathologies humaines : Bilan et perspectives préventives. *La Presse Médicale*, **30**(21), 1076-1081p
- Lemoine C, 2005**, Les fleurs méditerranéennes. *Jean-Paul Gisserot édition*, 32p
- Li W., Hydamaka A.W., Lowry L., Beta T, 2009**, Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Cent. Eur. J. Biol*, **4**(4), 499-506p
- Limbour P., De Melo G, 1995**, La prescription post-opératoire en chirurgie buccale. *Actual. Odonto-Stomatol*, **190**, 205-213p
- Lingarao M., Savithramma N, 2011**, Phytochemical studies of *Svensonia hyderabadensis* (Walp.) Mold, A rare medicinal plant. *Der Pharm Lett*, **3**, 51-55p
- Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I. Goddard M., Segal L., Springer J.A., Myers R.C, 1995**, Comparison of the up-and-down, Conventional LD50 and fixed dose acute toxicity procedures. *Fd. Chem. Toxicol*, **33**(3), 223-231p
- Livermore D.M, 1995**, Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, **8**(4), 557-584p
- Longevialle P, 1981**, Spectrométrie de masse des substances organiques, *Edition Masson, Paris*, 208p
- Loram L.C., Fuller A., Fick L.G., Cartmell T., Poole S., Mitchell D, 2007**, Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *Journal of Pain*, **8**(2), 127-136p
- Louni D, 1994**, Les forêts algériennes. *Forêt Méditerranéenne*, **1**, 59-63p
- Loziene K., Venskutonis P.R., Sipailiene A., Labokas J, 2007**, Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food chemistry*, **103**, 546-559p
- Lu F., Foo L.Y, 2001**, Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**(2), 197-202p
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J, 2004**, Solvent-free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr A*, **1043**(2), 323-327p
- Lucchesi M.E, 2005**, Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat en Sciences, Université de la Réunion, France*, 146p
- Maataoui B.S., Hmyene A., Hilali S, 2006**, Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, **7**(1), 3-8p

- Mabberley D.J., 1997**, The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants. *Cambridge University Press*, 858p
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L., 2006**, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. *J. Sci. Food Agric*, **86**, 2046-2056p
- Maghrabi I.A., 2014**, Determination of some mineral and heavy metals in Saudi Arabia popular herbal drugs using modern techniques. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **8**(39), 1000-1005p
- Mainardi J.L., Goldstein F.W., Gutmann L., 1996**, Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. *Encycl Méd Chir. Maladies infectieuses (Elsevier, Paris)*, 8-006-N-10, 8p
- Makhloufi A., Bouyahyaoui A., Seddiki N., Benlarbi L., Mebarki L., Boulanouar A., 2014**, Phytochemical screening and anti-listerial activity of essential oil and crude extracts from some medicinal plants growing wild in Bechar (south west of Algeria). *International Journal of Phytotherapy*, **4**(2), 95-100p
- Mancini E., Senatore F., Del Monte D., De Martino L., Grulova D., Scognamiglio M., Snoussi M., De Feo V., 2015**, Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, **20**(7), 12016-12028p
- Mann J., 1987**, Secondary metabolism. *Clarendon Press, Oxford, UK*, 374p
- Mao K., Hao G., Liu J., Adams R.P., Milne R.I., 2010**, Diversification and biogeography of *Juniperus* (*Cupressaceae*): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytol*, **188**(1), 254-272p
- Mapoli G., 2003**, Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville). *Mémoire d'études approfondies, Université de Congo*, 58p
- Marmonier A.A., 1990**, Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, techniques usuelles. *DOIN édition, Paris, France*, 227-236p
- Martini M.-C., Seiller M., 1999**, Actifs et additifs en cosmétologie. *Tec & Doc édition, Paris*, 656p
- Mathieu A., 2008**, Flore forestière : Description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France et des essences importantes de l'Algérie. 2^{ème} édition, *Nicolas Grosjean-Mme et Bouchard Huzard*, 455p
- May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L., 2000**, Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*, **45**(5), 639-643p
- Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C., Fernandez X., 2010**, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L.. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(10), 959-964p
- Mazur M., Boratynska K., Marcysiak K., Gomez D., Tomaszewski D., Didukh J., Boratynski A., 2003**, Morphological variability of *Juniperus phoenicea* (*Cupressaceae*)

- from three distant localities on Iberian peninsula. *Acta Asocietatis Botanicorum Poloniae*, **72**(1), 71-78p
- Mazzoleni S., di Pasquale G., Mulligan M., di Martino P., Rego F., 2004**, Recent dynamics of the Mediterranean vegetation and landscape. *John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK*, 320p
- Mc Nair H.M., Miller J.M., 1997**, Basic gas chromatography- Techniques in analytical chemistry. *A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, INC*, 204p
- Medini H., Elaissi A., Khouja M.L., Chemli R., 2013**, Phytochemical screening and antioxidant activity of *Juniperus phoenicea* ssp. *phoenicea* L. extracts from two Tunisian locations. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, **1**(2), 77-82p
- Mehreen A., Waheed M., Liaqat I., Arshad N., 2016**, Phytochemical, antimicrobial, and toxicological evaluation of traditional herbs used to treat sore throat. *BioMed Research International*, 2016:8503426. doi: 10.1155/2016/8503426
- Menaceur F., Benchabane A., Hazzit M., Baaliouamer A., 2013**, Chemical composition and antioxidant activity of Algerian *Juniperus phoenicea* L. extracts. *TBAP*, **3**(1), 87-96p
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., dos Santos T.C., Coube C.S., Leitão S.G., 2001**, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*, **15**(2), 127-130p
- Meredith R., 1998**, Engineers handbook of industrial microwave heating, *IET edition, Volume 25*, 363p
- Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., 2004**, Inflammation et douleur : Thérapie génique expérimentale. *Médecine/Sciences*, **20**, 325-330p
- Middleton E.J., Kandaswami C., Theoharides T.C., 2000**, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharm Rev*, **52**(4), 673-751p
- Miguel M.G., Costa L.A., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., 2007**, Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *Th. Mastichina*, *Th. Camphoratus* and *Th. Carnosus* essential oils by TBARS and micellar model systems. *Natural Product Communications (special edition)*, **2**, 399-406p
- Miguel M.G., 2010**, Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short Review. *Molecules*, **15**, 9252-9287p
- Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008**, Plan écophyto 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018. *Ecophyto 2018*, 24p
- Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N., 2002**, Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J Agric Food Chem*, **50**(7), 1845-1851p

- Molyneux R.J., Nash R.J., Asano N, 1996**, The chemistry and biological activity of calystegines and related nortropane alkaloids. *In: Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, (edited by S.W Pelletier), pp 303-343. *Vol II, Pergamon, Oxford*
- Molyneux P, 2004**, The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, **26**(2), 211-219p
- Morales R, 1997**, Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, **19**(1-2), 249-262p
- Morales R, 2002**, The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *In: Thyme: The genus Thymus* (coordonné par E Stahl-Biskup., F Saez), pp 1-43. *Taylor & Francis, London*
- Moreira M.R., Ponce A.G., De Valle C.E., Roura S.I, 2005**, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie-LWT*, **38**, 565-570p
- Morin P., Richard H, 1985**, Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation in *Proc. 4 Fh Weurman Flav. Res. Symp. Elsevier Sci. Publ., B.V. Amsterdam*, 563-576p
- Morrissey J.P., Osbourn A.E, 1999**, Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiological and Molecular Biological Reviews*, **63**(3), 708-724p
- Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K., Someya T, 1985**, A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res*, **278**, 31-36p
- Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S., Ghorbani A, 2005**, *Labiatae* family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2**, 63-79p
- Namsa N.D., Tag H., Mandal M., Kalita P., Das A.K, 2009**, An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit Community of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, **125**, 234-245p
- Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M., Chan C.C, 1999**, Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, **128**(4), 853-859
- Napoli E.M., Curcuruto G., Ruberto G, 2010**, Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**, 816-822p
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L, 2000**, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol*, **31**(4), 247-256p
- Nauciel C., Vildé J.-L, 2005**, Bactériologie médicale : Abrégés. Connaissances et pratique. 2^{ème} édition, *Elsevier Masson, Paris*, 257p
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997**, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard M2-A7. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA*

- Nedjimi B., Beladel B., Guit B, 2015**, Multi-element determination in medicinal juniper tree (*Juniperus phoenicea*) by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **8**, 243-246p
- Nema S.S., Tohamy M.A., El-Banna H.A., Radi A.M., El-Gendy A.A., Owis A.I, 2015**, Phytochemical and pharmacological studies of ethanolic extract of *Thymus vulgaris*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**(10), 1988-2001p
- Nicolas J.-F., Hospices civils de Lyon, Cousin F., Thivolet J, 2001**, Immunologie clinique et allergologie. *John Libbey Eurotext, Paris*, 141p
- Nikaido H., Vaara M, 1985**, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, **49**(1), 1-32p
- Nikolić M., Glamočlija J., Ferreira I.C.F.R., Calhelha R.C., Fernandes A., Marković T., Marković D., Giweli A., Soković M, 2014**, Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, **52**, 183-190p
- Normak H.B., Normak S, 2002**, Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med*, **252**(2), 91-106p
- Novelli G.P, 1997**, Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol*, **48**, 517-527p
- Nussler A.K., Billiar T.R, 1993**, Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, **54**(2), 171-178p
- Nyarko A.A., Addy M.E, 1990**, Effects of aqueous extract of *Adenia cissampeloides* on blood pressure and serum analyse of hypertensive patients. *Phytotherapy Research*, **4**(1), 25-28p
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2001a**, Test n°423: Acute oral toxicity – Acute toxic class method. *Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris*. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071001-en>
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2001b**, Guidance document on acute oral toxicity testing. Environment, health and safety publications. *Series on testing and assessment n°24, Paris*
- Okou O.C., Kra A.K.M., Zirihi G.N., Dosso M., Guede G.F, 2006**, Activité antibactérienne des extraits de *Mitracarpus scaber* sur la croissance in vitro des streptocoques B hémolytiques. *J. Sci. Pharm. Biol*, **7**(1), 17-27p
- Olajide O.A., Makinde M.J., Awe S.O, 1999**, Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *J Ethnopharmacol*, **66**(1), 113-117p
- Oliva d.I.M., Beltramino E., Gallucci N., Casero C., Zygadlo J., Demo M, 2010**, Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Mecedinales*, **9**, 29-37p

- Olivero-Verbel J., Gonzalez-Cervera T., Guette-Fernandez J., Jaramillo-Colorado B., Stashenko E., 2010**, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **20**(4), 568-574p
- Olle M., Bender I., 2010**, The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, **8**(3), 687-696p
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 1998**, Réglementation des médicaments à base de plantes : La situation dans le monde. *WHO/TRM/98.1, Genève, Suisse*, 65p
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2002**, Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. *WHO/EDM/TRM/2002.1, Genève, Suisse*, 135p
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 2013**, Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. ISBN 978 92 4 250609 9, *Genève, Suisse*, 72p
- Opal S.M., Mayer K.H., Medeiros A.A., 2000**, Mechanisms of bacterial antibiotic resistance: Control of antibiotic resistance. *In: Principles and practice of infectious disease* (edited by G.L Mandell., J.E Bennett and R Dolin), pp 236-253. *5th edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA*
- Oulebsir-Mohandkaci H., Ait Kaki S., 2015**, Essential oil of two Algerian aromatic plants *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus* as bio-insecticides against aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Wulfenia Journal*, **22**(2), 185-197p
- Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M., Bellabas M.A., 2005**, Etude de l’activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, **4**, 147-157p
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2006**, Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, **73**, 236-244p
- Oussou K.R., Kanko C., Guessennd K.N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N’guessan Y.T., Figueredo G., Chalchat J.-C., 2004**, Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d’Ivoire. *C. R. Chimie*, **7**(10-11), 1087-1086p
- Oyaizu M., 1986**, Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, **44**, 307-315p
- Oyewole O.I., Owoseni A.A., Faboro E.O., 2010**, Studies on medicinal and toxicological properties of *Cajanus cajan*, *Ricinus communis* and *Thymus vulgaris* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(19), 2004-2008p
- Özcan M., Chalchat J.-C., 2004**, Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulg. J. Plant. Physiol*, **30**(4), 68-73p
- Ozel M.Z., Gogus F., Lewis A.C., 2003**, Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*, **82**, 381-386p

- Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X., Zhang J., Huang F, 2008**, Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, **106**(3), 1264-1270p
- Paschapur S.M., Patil M.B., Kumar R., Sachin R.P, 2009**, Evaluation of aqueous extract of leaves of *Ocimum kilimandscharicum* on wound healing activity in albino wistar rats. *Int. J. Pharm. Tech. Res*, **1**(3), 544-550p
- Pauli A, 2001**, Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromathérapie*, **11**(3), 126-133p
- Pavel M., Ristic M., Stevic T, 2009**, Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc*, **75**(1), 27-34p
- Peana A.T., Marzocco S., Popolo A., Pinto A, 2006**, (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, **78**(7), 719-723p
- Pellerin P, 1991**, Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor*, **16**(4), 37-39p
- Pérez G.S., Zavala S.M., Garcia A.L., Ramos L.M, 2011**, Anti-inflammatory activity of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, **23**(5), 38-44p
- Pérez-Jiménez J., Arranz S., Taberner M., Diaz-Rubio M.E., Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F, 2008**, Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, **41**(3), 274-285p
- Peter K.V, 2004**, Handbook of herbs and spices. *Elsevier*, 376p
- Pibiri M.-C, 2005**, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. *Thèse de doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne. France*
- Pina-Vaz C., Gonçalves Rodrigues A., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L., Cavaleiro C., Gonçalves M.J., Martinez-de-Oliveira J, 2004**, Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **18**(1), 73-78p
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O, 2002**, Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**(4), 233-239p
- Piochon M, 2008**, Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. *Mémoire. Université du Québec à Chicoutimi. Canada*, 200p
- Pitman V, 2004**, Aromatherapy: A practical approach. *édition Nelson Thornes*, 364p
- Polese J.-M, 2006**, La culture des plantes aromatiques. *Edition Artemis*, 93p

- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C.E., Roura S.I., 2003**, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-LWT*, **36**, 679-684p
- POPI, 2003**, Maladies infectieuses: Guide de traitement, référence pour une bonne pratique médicale. 8^{ème} édition. *CMIT, Paris*, 337p
- Porte A., Godoy R.L.O., 2008**, Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *J. Serb. Chem. Soc*, **73**(3), 307-310p
- Posadas L., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G., 2004**, Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, **142**(2), 331-338p
- Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S., 2007**, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr A*, **1163**(1-2), 2-24p
- Pradeau D., Cohen Y., 1992**, L'analyse du médicament. *Edition Médicales Internationales*, 1067p
- Preethi K., Premasudha P., Keerthana K., 2012**, Anti-inflammatory activity of *Muntingia calabura* fruits. *Pharmacognosy Journal*, **4**(30), 51-56p
- Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005**, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem*, **53**(10), 4290-4302p
- PROTA, 2008**, Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Vol **11**(1). *Plantes médicinales, tome 1*, G.H. Schmelzer & A. Gurib-Fakim. Wageningen, Fondation PROTA - Backhuys - CTA, 869p
- Proust B., 2006**, Petite géométrie des parfums, *Edition du Seuil, Paris*, 126p
- Quezel P., Santa S., 1962**, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS, Paris*, 636p
- Quezel P., Santa S., 1963**, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. *CNRS, tome 2, Paris*, 1170p
- Quezel P., Medail F., 2003**, Ecologie et biogéographie de la forêt du bassin méditerranéen. *Edition Elsevier, Collection Environnement, Paris*, 573p
- Radaelli M., da Silva B.P., Weidlich L., Hoehne L., Flach A., da Costa L.A.M.A., Ethur E.M., 2016**, Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47**(2), 424-430p
- Raghavan S., 2006**, Handbook of spices, seasonings, and flavorings. 2nd edition, *CRC Press*, 330p

- Ramanoelina P.A.R., Bianchini J.P., Andriantsiferana M., Viano J., Gaydou E.M, 1992**, Chemical composition of niaouli essential oils from Madagascar. *J. Essent. Oil Res*, **4**(6), 657-658p
- Ramdani M., Lograda T., Zeraib A., Chalard P., Figueredo G., Bouchaala M., Zerrar S, 2013**, Characteristics of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med*, **2**(9), 613-623p
- Rameau J.-C., Mansion D., Dume G, 2008**, Flore forestière française : guide écologique illustré. Région méditerranéenne. *Forêt privée française, Volume 3*, 2426p
- Rattan R.K., Datta S.P., Chhonkar P.K., Suribabu K., Singh A.K, 2005**, Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater- a case study. *Agric. Ecosyst. Environ*, **109**(3-4), 310-322p
- Razafindrakoto B.S, 1988**, Huiles essentielles d'*Eucalyptus* de Madagascar ; Variabilité de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte ; essais de classement chemotaxonomique et propriétés pharmacodynamiques. *Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France*, 225p
- Razzaghi-Abyaneh M., Rai M, 2013**, Antifungal metabolites from plants. *Springer Science & Business Media*, 469p
- Regnault-Roger C., Hamraoui A, 1995**, Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Stored Prod. Res*, **31**, 291-299p
- Renata P.S., Edson P.N., Ronaldo F.N., Gilvandete M.P.S., Gustavo H.M.A., Edilberto S.R., Otilia D.L, 2006**, Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc*, **17**(5), 1027-1030p
- Rey C, 1990**, La culture du thym en Suisse. *Revue horticole suisse*, **63**, 20-22p
- Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Proença da Cunha A., Casanova J, 2001**, Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol*, **29**, 179-188p
- Rhind J.P, 2012**, Essential oils: A handbook for aromatherapy practice. *2nd edition, Singing Dragon*, 304p
- Riahi L., Chograni H., Ziadi S., Zaouali Y., Zoghlami N., Mliki A, 2013**, Chemical profiles and antioxidant activities of the essential oils of two medicinal plant species grown in Tunisia. *The Journal of Essential Oil Research*, **25**(4), 324-329p
- Richard H, 1992**, Epices et aromates. *Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 339p
- Richter G, 1993**, Métabolisme des végétaux- Physiologie et biochimie. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, 526p
- Riella K.R., Marinho R.R., Santos J.S., Pereira-Filho R.N., Cardoso J.C., Albuquerque-Junior R.L., Thomazzi S.M, 2012**, Anti-inflammatory and cicatrizing activities of

- thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **143**(2), 656-663p
- Robert P.A., Barrero A.F., Lara A, 1996**, Comparisons of the leaf essential oils of *Juniperus phoenicea*. *J. Essent. Oil Res*, **8**, 367-371p
- Roberts C.K., Sindhu K.K, 2009**, Oxidative stress and letabolic syndrome. *Life Sciences*, **84**(21-22), 705-712p
- Rodriguez S.A., Murray A.P, 2010**, Antioxidant activity and chemical composition of essential oil from *Atriplex undulata*. *Nat Prod Commun*, **5**(11), 1841-1844p
- Rota M.C., Carramiñana J.J., Burillo J., Herrera A, 2004**, *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, **67**, 1252-1256p
- Rota M.C., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J.A., Jordán M.J, 2008**, Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, **19**(7), 681-687p
- Rote N.S.V, 1998**, Inflammation. *In* : Pathophysiology (edited by K.L McCance., S.E Huether), pp 205-236, 3rd edition, Mosby, St. Louis
- Roux D., Catier O, 2007**, Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3^{ème} édition, Wolters Kluwer, 141p
- Roux D, 2008**, Conseil en aromathérapie, 2^{ème} édition, Pro-Officina, 187p
- Ruberto G., Baratta M.T, 2000**, Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*, **69**(2), 167-174p
- Ruckebusch Y, 1981**, Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales, 2^{ème} édition, Maloine S. A, Paris
- Rufino A.T., Ribeiro M., Sousa C., Judas F., Salgueiro L., Cavaleiro C., Mendes A.F, 2015**, Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of *E-caryophyllene*, *myrcene* and *limonene* in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology*, **750**, 141-150p
- Russo-Marie F, 1998**, L'inflammation. *John Libbey Eurotext, Paris*, 565p
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R, 2005**, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, **91**(4), 621-632p
- Sadik C.D., Sies H., Schewe T, 2003**, Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: Structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol*, **65**(5), 773-781p
- Safaei-Ghomi J., Ebrahimabadi A.H., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H, 2009**, GC/MS analysis and *in vitro* antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem*, **115**(4), 1524-1528p
- Sallé J.-L, 2004**, Les huiles essentielles, Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. 2^{ème} édition, Frison Roche, 168p

- San Feliciano A., Miguel Del Corral J.M., Gordaliza M., Salin Ro M.A., 1992**, Neutral diterpenoids and aromatic compounds from leaves of *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata*. *Anales de Quimica*, **88**, 512-516p
- Sany J., 2003**, Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : Conception actuelle. *John Libbey Eurotext*, 298p
- Sariburun E., Şahin S., Demir C., Türkben C., Uylaşer V., 2010**, Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci*, **75**(4), 328-335p
- Sarikurkcu C., Ozer M.S., Eskici M., Tepe B., Can S., Mete E., 2010**, Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and chemical Toxicology*, **48**(7), 1801-1805p
- Sawatzky D.A., Megson I.L., Rossi A.G., 2005**, Sildenafil offers protection against NSAID-induced gastric injury. *The British Journal of Pharmacology*, **146**(4), 447-478p
- Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh D., Gupta A., 2013**, Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **1**(6), 168-182p
- Schlede E., Mischke U., Roll R., Kayser D., 1992**, A national validation study of the acute-toxic-class method- An alternative to the LD50 test. *Arch Toxicol*, **66**(7), 455-470p
- Schlede E., Mischke U., Diener W., Kayser D., 1995**, The international validation study of the acute-toxic-class method (oral). *Arch. Toxicol*, **69**(10), 659-670p
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R., 2002**, Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Rad. Res*, **36**(2), 177-187p
- Schwarz K., Ernst H., Ternes W., 1996**, Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *J. Sci. Food Agric*, **70**(2), 217-223p
- Sefidkon F., Jalili A., Mirhaji T., 2001**, Essential oil composition of three *Artemisia* spp. from Iran. *Flavour Fragr. J*, **17**(2), 150-152p
- Sefidkon F., Nikkhah F., Ashoorabadi E.S., 2009**, The effect of distillation methods and plant growth stages on the essential oil content and composition of *Thymus vulgaris* L.. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **25**(3), 309-320p
- Seigue A., 1985**, La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. *Edition Maisonneuve et Larose, Paris*, 502p
- Senatore F., 1996**, Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food. Chem*, **44**, 1327-1332p
- Seol G.-H., Kang P., Lee H.S., Seol G.H., 2016**, Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *BMC Neurology*, **16**(17), 1-6p
- Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W., 2010**, Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press, New York*, 473p

- Sever B., Özbek H., 2005**, Investigation of lethal doses and anti-inflammatory effect of Alpha-pinen on mice and rats. *Turkish Pharmacological Society 18th National Pharmacology Congress, September, Izmir-Turkey*, 72p
- Shabnum S., Wagay G.M., 2011**, Micropropagation of different species of *Thymus*. *J. Res. Dev*, *11*, 71-80p
- Sharma N., Tripathi A., 2006**, Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, *22*(6), 587-593p
- Sienkiewicz M., Lysakowska M., Denys P., Kowalczyk E., 2012**, Antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microbial Drug Resistance*, *18*(2), 137-148p
- Sieradzki K., Roberts R.B., Haber S.W., Tomasz A., 1999**, The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *NEJM*, *340*(7), 517-523p
- Sies H., 1991**, Oxidative stress: Introduction. In: Oxidative stress: oxidants and antioxidants (Edited by H. Sies), pp XV-XXII. *Academic Press Ltd, London*
- Silba J., 1986**, An international census of the *Coniferae*. *Phytologia Memoir*, *8*, 1-217p
- Simic N., Palic R., Vajs V., Milosavljevic S., Djokovic D., 2002**, Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil. *J Essent Oil Res*, *14*, 76-78p
- Simpson M.G., 2006**, Plant systematics. *Edition Elsevier/Academic Press, Amsterdam*, 590p
- Singh V.P., 2006**, Gymnosperm (naked seeds plant). *Sarup & Sons edition. India*, 694p
- Singh A., 2011**, Herbalism, phytochemistry and ethnopharmacology. *CRC Press*, 440p
- Sizer F., Whitney E., 2013**, Nutrition: Concepts and controversies. *13th edition, Cengage Learning, Ohio, USA*, 848p
- Skandamis P.N., Nychas G.J.E., 2001**, Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(6), 1011-1022p
- Skaria B.P., 2007**, Aromatic plants, *Vol 1, New India Publishing*, 290p
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003**, Principes d'analyse instrumentale, *1^{ère} édition, De Boeck*, 945p
- Slifman N.R., Obermeyer W.R., Aloï B.K., Musser S.M., Correll W.A.J., Clichowicz S.M., Betz J.M., Love L.A., 1998**, Contamination of botanical dietary supplements by *Digitalis lanata*. *N Engl J Med*, *339*(12), 806-811p
- Small E et Deutsch G., 2001**, Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid. *NRC Research Press*, 193p
- Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart A.T., Hotchkiss S.A., 2000**, Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, *168*, 189-199p

- Snoussi S.A., Djazouli Z.E., Aroun M.E.F., Sahli Z, 2003**, Les plantes maraichères, industrielles, condimentaires, aromatiques, médicinales et ornementales. *Annexes sur La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31*
- Sofiev M., Bergmann K.-C, 2012**, Allergenic pollen: A review of the production, release, distribution and health impacts. *Springer Science & Business Media*, 252p
- Sofowora A, 1993**, Medicinal plants and traditional medicine in Africa. *Spectrum Books, Ibadan*, 150p
- Soković M., Vukojević J., Martin P.D., Brkić D.D., Vajs V., van Griensven L.J.L.D, 2009**, Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, **14**(1), 238-249p
- Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L.J.L.D, 2010**, Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, **15**(11), 7532-7546p
- Somboro A.A., Patel K., Diallo D., Sidibe L., Chalchat J.-C., Figueredo G., Ducki S., Troin Y., Chalard P, 2011**, An ethnobotanical and phytochemical study of the African medicinal plant *Guiera senegalensis* J. F. Gmel. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(9), 1639-1651p
- Soto-Medivil E.A., Moreno-Rodríguez J.F., Estarrón-Espinosa M., García-Fajardo J.A., Obledo-Vázquez E.N, 2006**, Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *e-Gnosis [online]*, **4**(16), 1-7p
- Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M., Lima E.O, 2006**, Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm*, **87**(1), 22-25p
- Soylu S., Yigitbas H., Soyly E.M., Kurt S, 2007**, Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, **103**(4), 1021-1030p
- Spencer R, 1995**, Horticultural flora of South Eastern Australia: Ferns, Conifers and their Allies. *Royal Botanic Gardens edition, volume 1, Melbourne*, 358p
- Stahl-Biskup E., Sáez F, 2002**, Thyme: The genus *Thymus*. *CRC Press*, 346p
- Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A, 2006**, Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* Var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. PI. Med, Botucatu*, **8**, 86-90p
- Stobo J., Traill T., Hellmann D., Ladenson P., Petty B, 1996**, The principles and practice of medicine. *McGraw Hill Professional*, 1064p
- Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W, 2003**, Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging. *J. Agric. Food Chem*, **51**(11), 3197-3207p

- Syamasundar K.V., Srinivasulu B., Stephen A., Ramesh S., Rao R.R., 2008**, Chemical composition of volatile oil of *Thymus vulgaris* L. from Western Ghats of India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, **17**(3), 255-258p
- Taiz L., Zeiger E., 2003**, Plant physiology. *Annals of Botany*, **91**(6), 750-751p
- Takechi M., Matsunami S., Nishizawa J., Uno C., Tanaka Y., 1999**, Haemolytic and antifungal activities of saponins or anti-ATPase and antiviral activities of cardiac glycosides. *Planta Medica*, **65**(6), 585-586p
- Takeuchi H., Lu Z.G., Fujita T., 2004**, New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **68**(5), 1131-1134p
- Teibi M., 1992**, Contribution à l'étude de l'estimation de biomasse aérienne d'un taillis de chêne vert (*Quercus ilex*) et de deux Genévriers : Genévrier oxycèdre, Genévrier de Phénicie dans la région de Kasserou. *Mémoire d'ingénieur en agroalimentaire, Université de Batna, Algérie*, 80p
- Ternes W., Gronemeyer M., Schwarz K., 1995**, Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol and carvacrol in different foodstuffs. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, **201**(6), 544-577p
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005**, Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 521p
- Tisserand R.B., Balacs T., 1995**, Essential oil safety: A guide for health care professionals. *Churchill Livingstone edition, London*, 172p
- Tisserand M., 2014**, Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug. *Singing Dragon*, 192p
- Tiwari M., Tandon V., 2004**, Medicinal plants. *Vol 2, Gyan Publishing House*, 653p
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J., 2009**, Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food. Chem*, **57**, 5987-6000p
- Tohidpour A., Sarrari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J., 2010**, Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, **17**, 142-145p
- Traoré A., Bonini M., Dano S.D., Creppy E.E., 1999**, Synergistic effects of some metals contaminating mussels on the cytotoxicity of the marine toxin okadaic acid. *Arch. Toxicol*, **73**(6), 289-295p
- Traore F., Faure R., Ollivier E., Gasquet M., Azas N., Debrauwer L., Keita A., Timon-David P., Balansard G., 2000**, Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. *Planta Medica*, **66**(4), 368-371p
- Trease G.E., Evans W.C., 2002**, Pharmacognosy, 15th edition, *Saunders Publishers, London*, 584p

- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., 2005**, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(6), 2474-2478p
- Tsai M.L., Lin C.C., Lin W.C., Yang C.H., 2011**, Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**(10), 1977-1983p
- Tumen I., Süntar I., Keleş H., Akkol E.K., 2012**, A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:728281. doi: 10.1155/2012/728281
- Turgis M., Han J., Caillet S., Lacroix M., 2009**, Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, **20**(12), 1073-1079p
- Twidwell E.K., Wagner J.J., Thiex N.J., 2002**, Use a microwave oven to determine moisture content of forages. A Service of SDSU Extension (Extra n°8077), SDSU, USDA
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002**, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, **68**(4), 1561-1568p
- Uribe S., Ramirez J., Peña A., 1985**, Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol*, **161**(3), 1195-1200
- Valero M., Salmerón M.C., 2003**, Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*, **85**(1-2), 73-81p
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J., 2007**, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*, **39**(1), 44-84p
- van den Dool H., Kratz D.P., 1963**, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**, 463-471p
- van Royen P., 1979**, The alpine flora of New Guinea: Taxonomic part *Cupressaceae* to *Poaceae*. *Cramer J. volume 2. Germany*, 1232p
- van Vuuren S.F., Suliman S., Viljoen A.M., 2009**, The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol*, **48**(4), 440-446p
- Varlet E., 1992**, Découvrez les fruits sauvages, *Edition Ellebore, Paris*, 104p
- Varlet E., 2008**, Découvrez les fruits sauvages. *Edition Ellebore, Paris*, 254p
- Vasudevan M., Gunnam K.K., Parle M., 2006**, Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Daucus carota* seeds extract. *Journal of Health Science*, **52**(5), 598-606p

- Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C., Vamvakias M, 2002**, Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **5**(1), 147-153p
- Veldhuizen T.J.A., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L.M., Zweijtzer C., Burt S.A., Haagsman H.P, 2006**, Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(5), 1874-1879p
- Veras H.N.H., Araruna M.K.A., Costa J.G.M., Coutinho H.D.M., Kerntopf M.R., Botelho M.A., Menezes I.R.A, 2013**, Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* CHAM: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research*, **27**(2), 179-185p
- Verzele L., Moudachirou S., Ramanoelina G, 1988**, Perfumer and flavorist. *Flavour and Fragrance Journal*, **13**, 61-67p
- Vetvicka V., Vetvickova J, 2016**, Essential oils from thyme (*Thymus vulgaris*): Chemical composition and biological effects in mouse model. *Journal of Medicinal Food*, **19**(12), 1180-1187p
- Vidaković M., Soljan M, 1991**, Conifers: Morphology and variation. *Grafički zavod Hrvatske*, 754p
- Vigo E., Cepeda A., Gualillo O., Pérez-Fernandez R, 2004**, *In-vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *J Pharm Pharmacol*, **56**(2), 257-263p
- Vinegar R., Schreiber W., Hugo R, 1969**, Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **166**(1), 96-103p
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J, 2008**, Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. *Food Control*, **19**(12), 1130-1138p
- Viuda-Martos M., El Gendy A.-N., Sendra E., Fernández-López J., Abd El Razik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A, 2010**, Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *J Agric Food Chem*, **58**(16), 9063-9070p
- Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., Abd El Razik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A., Sendra E, 2011**, *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, **22**, 1715-1722p
- Voda K., Boh B., Vrtacnik M, 2004**, A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. *Journal of Molecular Modeling*, **10**(1), 76-84p
- Wallace J.L., Vong L, 2008**, NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*, **9**(11), 1151-1156p

- Wan J., Wilcock A., Coventry M.J, 1998**, The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol*, **84**(2), 152-158p
- Wang M., Kikuzaki H., Lin C.C., Kahyaoglu A., Huang M.T., Nakatani N., Ho C.T, 1999**, Acetophenone glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *J. Agric. Food. Chem*, **47**(5), 1911-1914p
- Wannisorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T., Thubthimthed S, 2005**, Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, **76**(2), 233-236p
- Warnke P.H., Becker S.T., Podschun R., Sivananthan S., Springer I.N., Russo P.A., Wiltfang J., Fickenscher H., Sherry E, 2009**, The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J Craniomaxillofac Surg*, **37**(7), 392-397p
- Weil B., Batteux F, 2003**, Immunopathologie et réactions inflammatoires. *1^{ère} édition, De Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique*, 312p
- Wenzel R.P, 1997**, Prevention and control of nosocomial infections. *3rd edition, Williams and Wilkins, Baltimore*
- Werner M, 2002**, Les huiles essentielles: réveil du corps et de l'esprit. *Edition Vigot, Collection Santé Bien-être*, 95p
- WHO (World Health Organization), 2002**, Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. *2nd edition, Ducl G., Fabry J., Nicolle L editors, Geneva-Lyon-Winnipeg*, 72p
- Wichtl M, 2004**, Herbal drugs and pharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis. *3rd edition, CRC Press*, 704p
- Wilson R, 2002**, Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty. *Penguin edition*, 340p
- Winkel-Shirley B, 2001**, Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*, **126**(2), 485-493p
- Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W, 1962**, Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y)*, **111**, 544-547p
- Wise R., Hart T., Cars O., Streulens M., Helmuth R., Huovinen P., Sprenger M, 1998**, Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. *BMJ*, **317**(7159), 609-610p
- Wood J.A., Bernards M.A., Wan W., Charpentier P.A, 2006**, Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **39**, 40-47p

- Wuthi-udomlert M., Kupittayanant P., Gritsanapan W, 2010**, *In vitro* evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. *Journal of Health Research*, **24**(3), 117-122p
- Yakhlef G, 2010**, Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L.. *Mémoire de Magister, Université de Batna, Algérie*, 110p
- Yamamoto F., Kozłowski T.T, 1987**, Effect of flooding, tilting of stem, and ethrel application on growth, stem anatomy, and ethylene production of *Acer platanoides* seedlings. *Scand J For Res*, **2**(1), 141-156p
- Yaniv Z., Dudai N, 2014**, Medicinal and aromatic plants of the Middle-East. *Vol 2, Springer*, 337p
- Youdim K.A., Deans S.G, 1999**, Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, **109**(3), 163-175p
- Youdim K.A., Deans S.G, 2000**, Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition*, **83**(1), 87-93p
- Yvan T, 1997**, Pharmacologie, 8^{ème} édition, *Masson, Paris-Milan-Barcelone*, 388p
- Zarzuelo A., Crespo E, 2002**, The medicinal and non medicinal uses of thyme. *In: Thyme: The genus Thymus* (coordonné par E Stahl-Biskup., F Sáez), pp 263-292. *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles, New York, Taylor and Francis*
- Zhiri A, 2006**, Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix*, **12**, 8p
- Zhong W., Chi G., Jiang L., Soromou L.W., Chen N., Huo M., Guo W., Deng X., Feng H, 2013**, *p*-Cymene modulates *in vitro* and *in vivo* cytokine production by inhibiting MAPK and NK- κ B activation. *Inflammation*, **36**(3), 529-537p
- Zohoun A., Ngoh E., Bajjou T., Sekhsokh Y., Elhamzaoui S, 2010**, Epidemiological features of multidrug resistant bacteria isolated from urine samples at the Mohammed V Military Teaching Hospital in Rabat, Morocco. *Med Trop*, **70**(4), 412-413p
- Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Karray A., Neffati M., Ayadi M.A, 2011**, Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (*Lamiaceae*). *Food and Bioproducts Processing*, **89**(4), 257-265p

Annexes

Annexe n°1

Milieux de culture

Bouillon nutritif (BN) (g/l)

| | |
|-------------------------|---------|
| Peptone..... | 10 g |
| Extrait de viande..... | 5 g |
| Chlorure de sodium..... | 5 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH = 7,3 ± 0,2 | |

Gélose nutritive (GN) (g/l)

| | |
|-------------------------|---------|
| Peptone..... | 10 g |
| Extrait de viande..... | 3 g |
| Extrait de levure..... | 3 g |
| Chlorure de sodium..... | 5 g |
| Agar..... | 18 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH = 7,3 ± 0,2 | |

Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Extrait de viande..... | 3 g |
| Hydrolysate acide de caséine..... | 17,5 g |
| Amidon..... | 1,5 g |
| Agar..... | 16 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH = 7,3 | |

Potato Dextrose Agar (PDA) (g/l)

| | |
|--------------------------------|---------|
| Filtrat de pomme de terre..... | 200 g |
| Glucose..... | 20 g |
| Agar..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH = 5,6

Sabouraud additionné de chloramphénicol gélosé (g/l)

| | |
|----------------------|---------|
| Peptone..... | 10 g |
| Glucose | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Chloramphénicol..... | 0.5 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

pH = 6

Annexe n°2

Tableau : Liste des antibiotiques utilisés

| Antibiotique | Sigle | Charge du disque |
|--------------------------------|-------|------------------|
| Amikacine | AK | 30 µg |
| Amoxicilline | AML | 30 µg |
| Ampicilline | AMP | 10 µg |
| Carbénicilline | CAR | 100 µg |
| Céfazoline | KZ | 30 µg |
| Céphalotine | KF | 30 µg |
| Chloramphénicol | C | 30 µg |
| Acid clavulanique | AUG | 30 µg |
| Doxycycline | DXT | 30 µg |
| Erythromycine | E | 15 µg |
| Gentamicine | CN | 30 µg |
| Acide nalidixique | NA | 30 µg |
| Néomycine | N | 30 µg |
| Norfloxacin | NOR | 10 µg |
| Oxacilline | OX | 5 µg |
| Pipéracilline | PRL | 30 µg |
| Polymyxine B | PB | 100 IU |
| Triméthoprime-Sulfaméthoxazole | SXT | 25 µg |
| Tobramycine | TOB | 10 µg |

Annexe n°3

Composition des réactifs utilisés pour le screening phytochimique des plantes

I- Caractérisation des alcaloïdes :

Réactif de Mayer

Chlorure mercurique.....6.7 g

Iodure de potassium.....25 g

Eau distillée.....200 ml

Réactif de Wagner

Iodure de potassium.....2 g

Iode.....1.27 g

Eau distillée.....100 ml

II- Caractérisation des tanins

Réactif de Stiasny

Formol à 40%.....10 ml

HCl concentré.....5 ml

III- Caractérisation des hétérosides cyanogénétiques

Préparation du papier picrosodé imbibé du réactif de Guignard

Acide picrique.....1 g

Carbonate de sodium.....10 g

Eau distillée tiède.....100 ml

Chauffer le liquide à 50°C, tremper les bandes de papier filtre puis sécher.

Annexe n°4

Préparation de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6)

Peser 35.6 g/l de phosphate disodique (Na_2HPO_4) (A) et 31.2 g/l de phosphate monosodique (NaH_2PO_4) (B). Mélanger 26.5 ml de (A) et 73.5 ml de (B) et compléter jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée et ajuster le pH à 6.6.

Annexe n°5

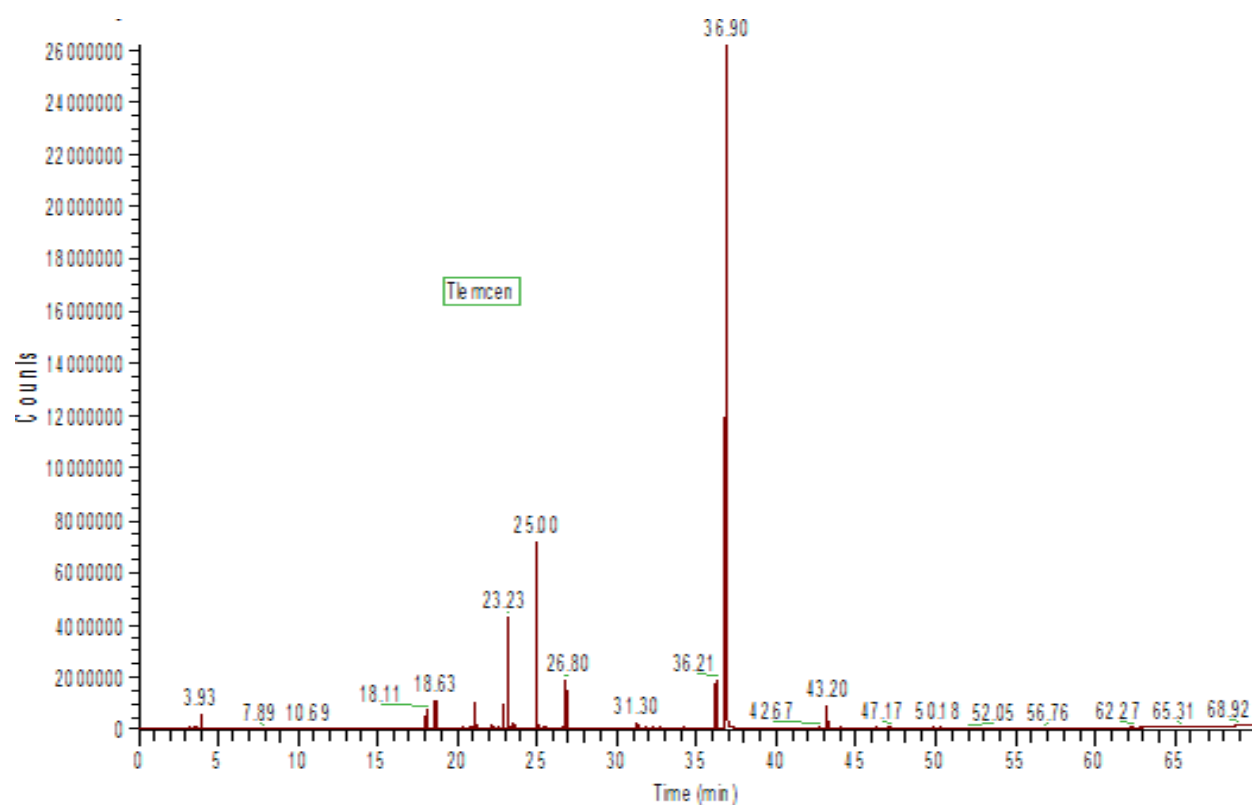


Figure n°1 : Chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* originaire de Tlemcen obtenu par CPG-SM

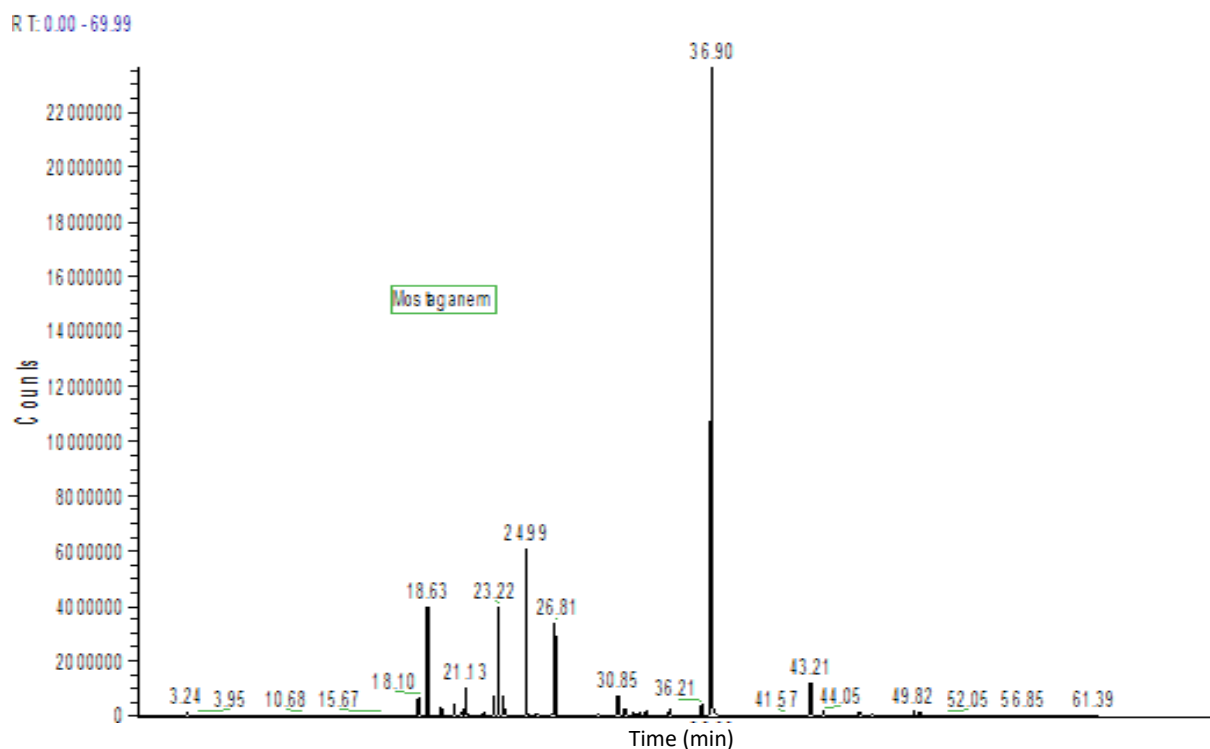


Figure n°2 : Chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* originaire de Mostaganem obtenu par CPG-SM

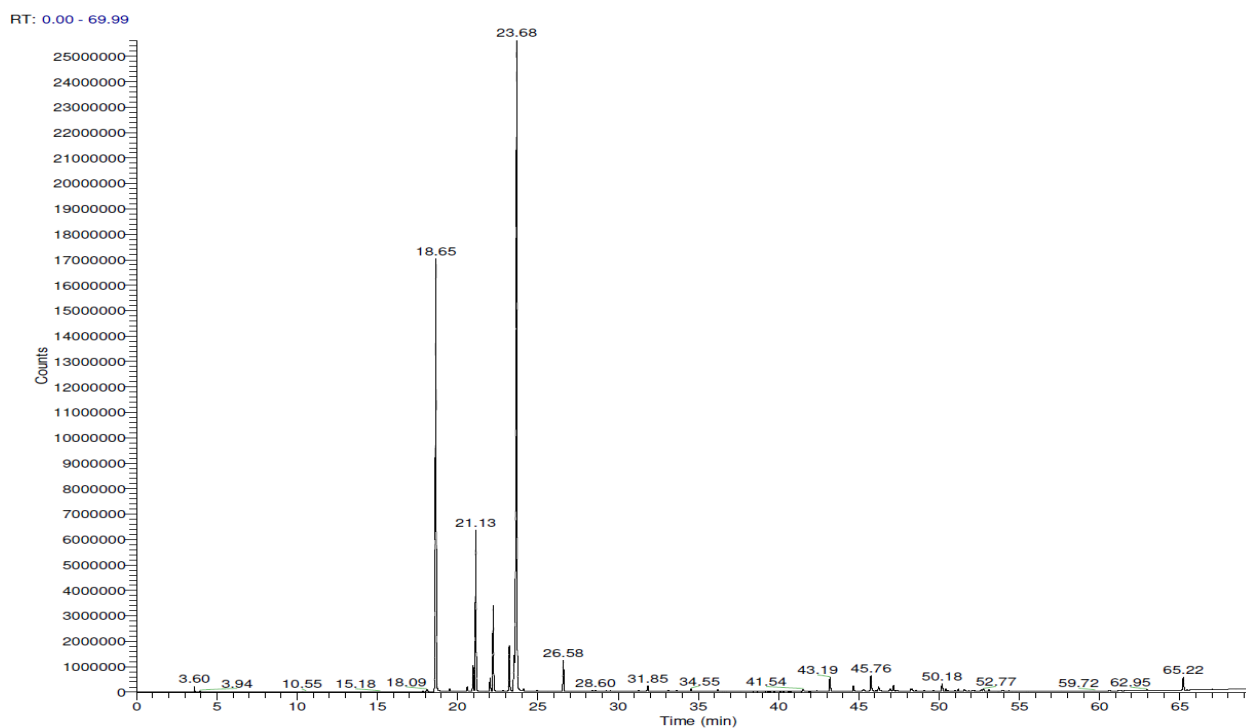


Figure n°3 : Chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles fraîches de *Juniperus phoenicea* originaire de Mostaganem obtenu par CPG-SM

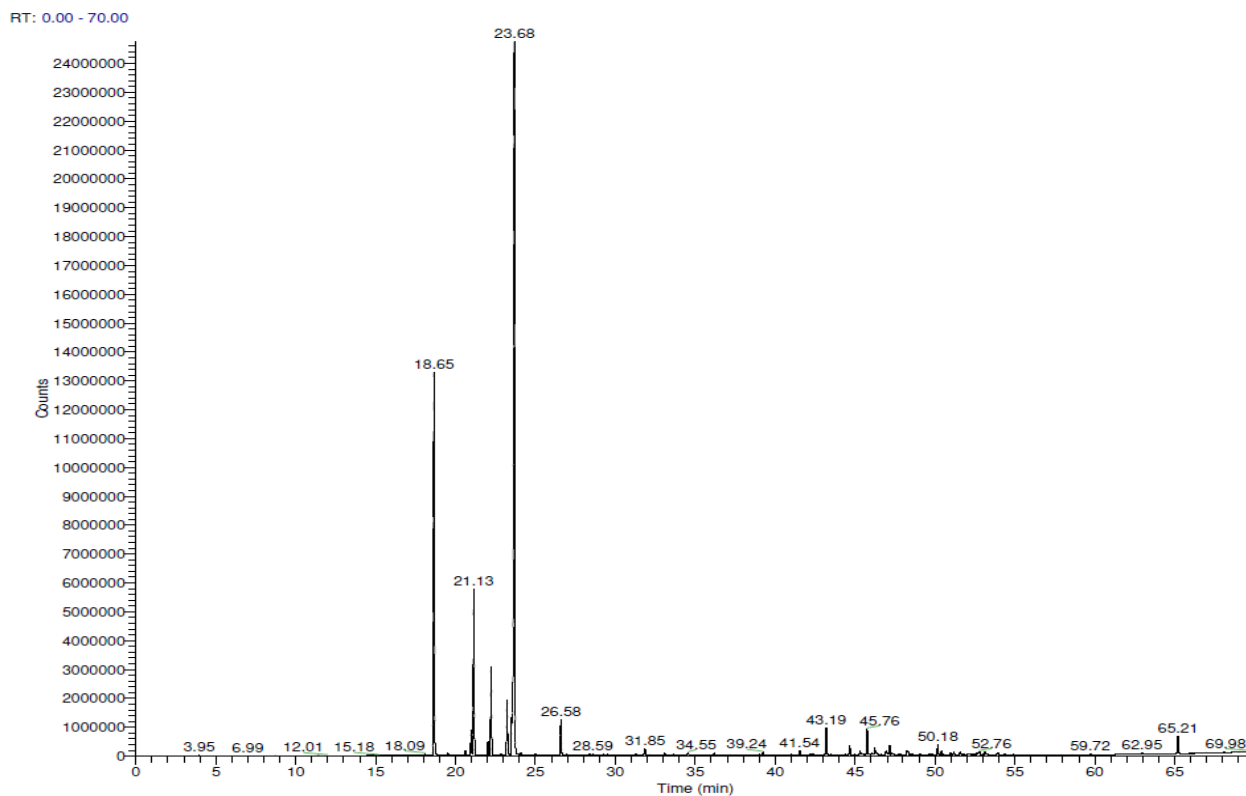


Figure n°4 : Chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Juniperus phoenicea* originaire de Mostaganem obtenu par CPG-SM

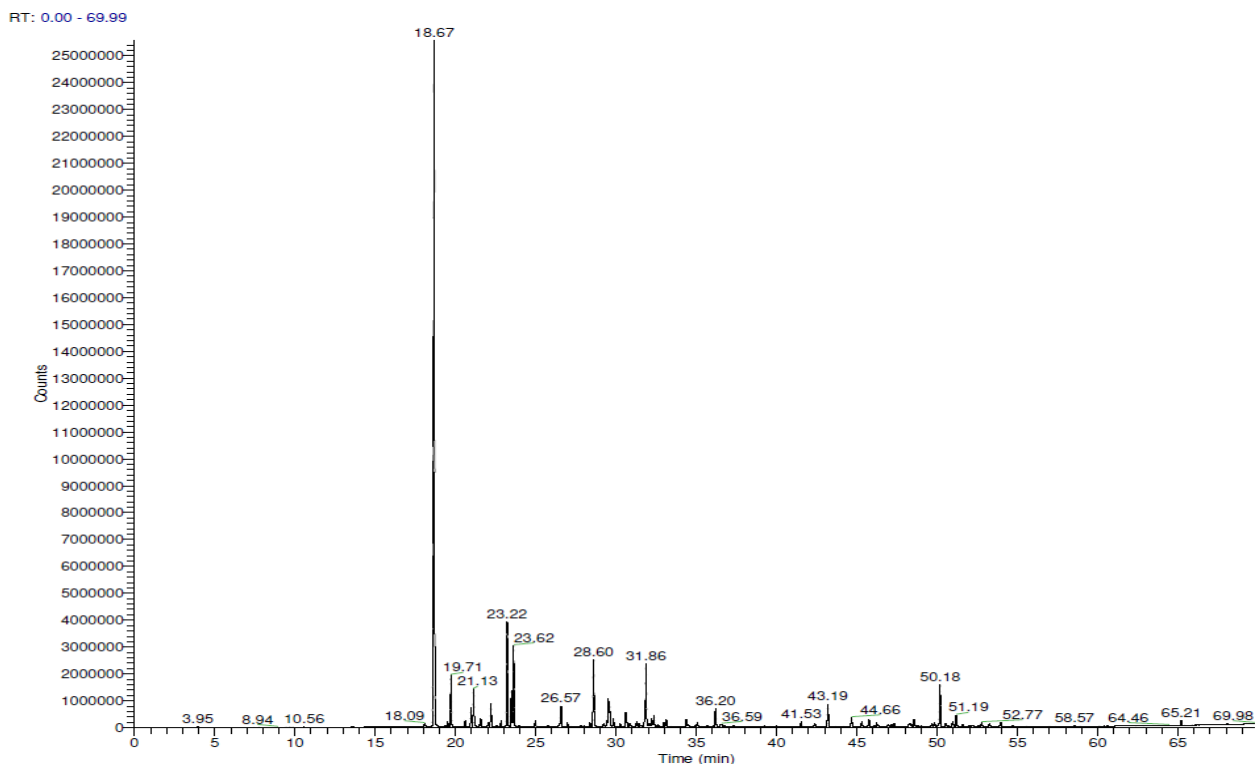


Figure n°5 : Chromatogramme de la composition chimique de l'huile essentielle des baies de *Juniperus phoenicea* originaire de Mostaganem obtenu par CPG-SM

Annexe n°6

Composition de la nourriture des souris

La nourriture fournie aux souris est composée de dérivés d'origine végétale, céréales, graines, fruits à coque.

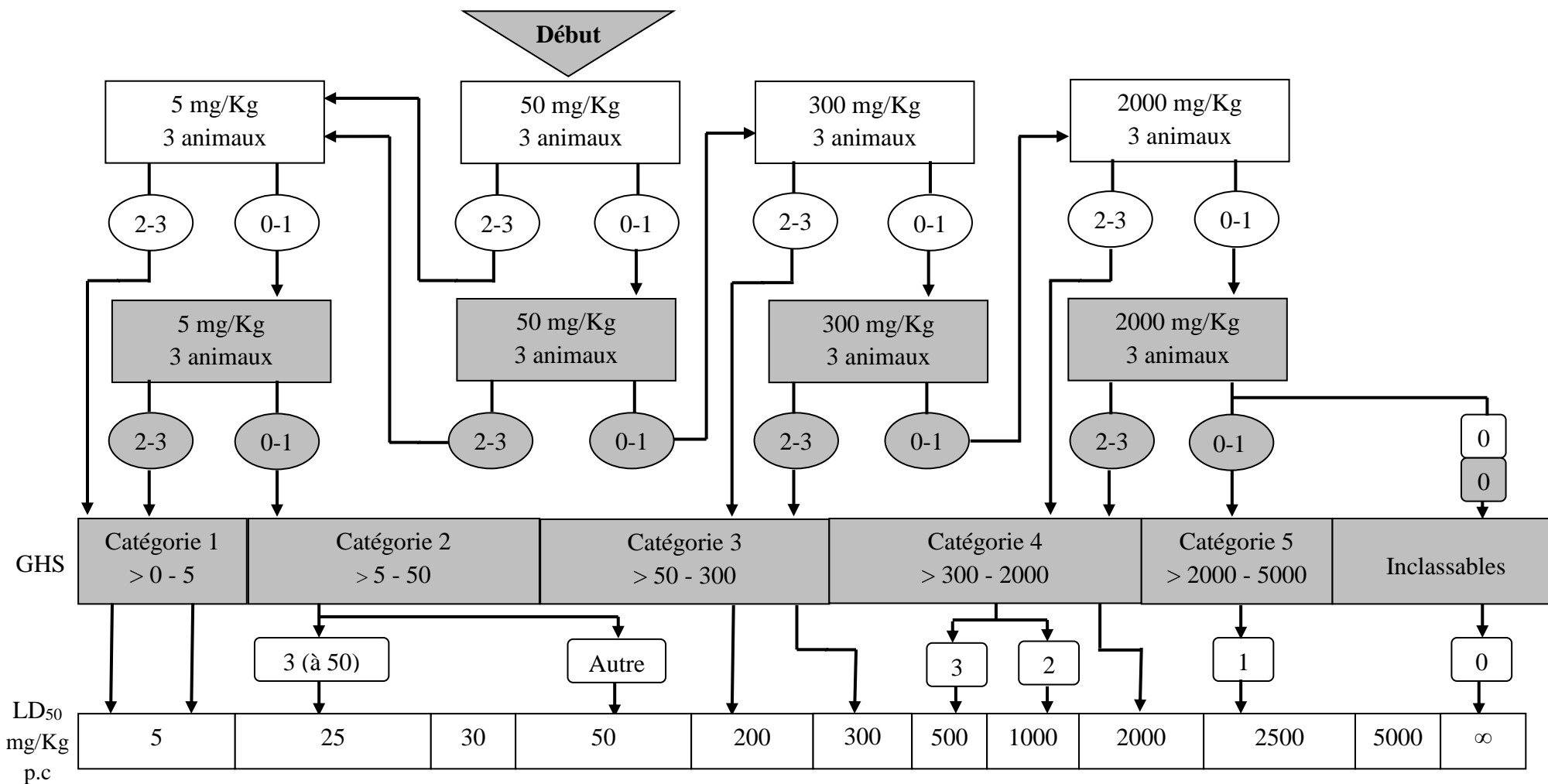
Constituants analytiques :

Protéine brute (14%), matières grasses brutes (10%), cellulose brute (13%), cendres brutes (3.6%), phosphore (0.4%), calcium (0.4%), sodium (0.1%).

Additifs nutritionnels/Kg :

4410 I.E. vitamine A, 677 I.E. vitamine D3, 56 mg vitamine E, 43 mg fer (E1), 0.1 mg iode (E2), 0.1 mg cobalt (E3), 3 mg cuivre (E4), 11 mg manganèse (E5), 8 mg zinc (E6), 0.1 mg sélénium (E8), colorants, antioxydants.

Annexe n°7 : Etude *in vivo* de la toxicité aiguë selon la méthode décrite par la ligne directrice OECD code 423 et détermination des DL₅₀ selon la classification établie par GHS (Globally Harmonized System) :



Trois animaux d'un seul sexe sont utilisés (généralement des femelles) ; 0, 1, 2, 3 : nombre d'animaux morts à chaque étape ; GHS : Globally Harmonized Classification System (mg/Kg p.c) ; ∞: inclassable.

Annexe n°8:

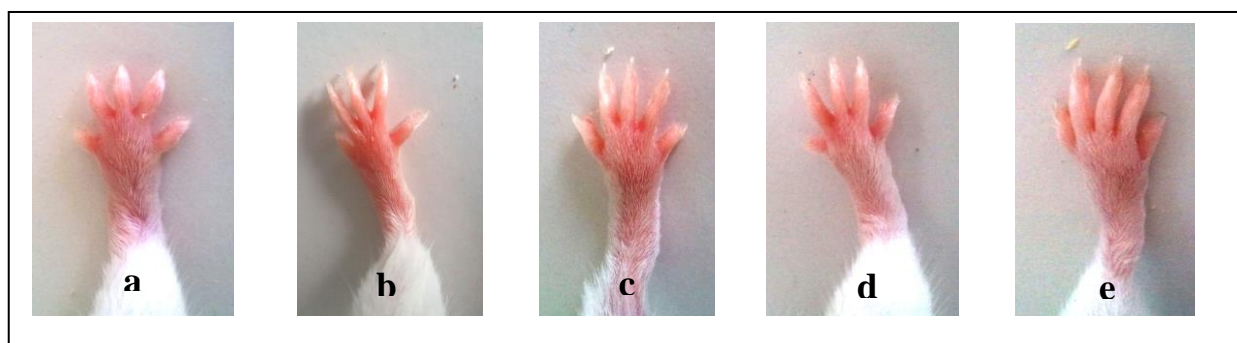


Figure n°1 : Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. de Mostaganem sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez la souris

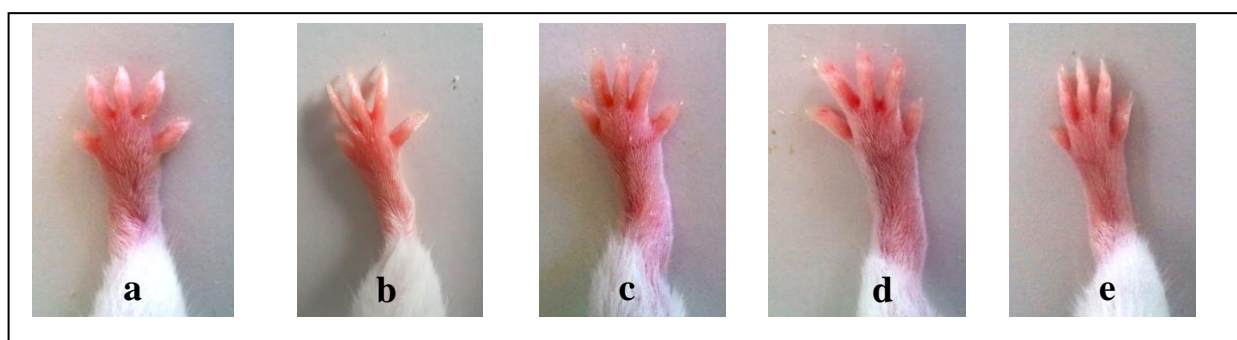


Figure n°2 : Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. de Tlemcen sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez la souris

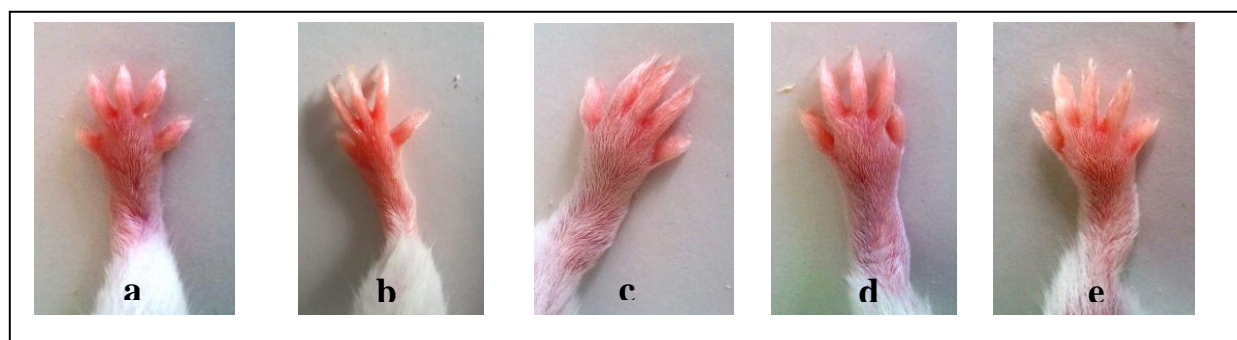


Figure n°3 : Effet de l'huile essentielle des feuilles fraîches de *Juniperus phoenicea* L. sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez la souris

a : Groupe I (Contrôle) ; **b** : Groupe II (Standard : Diclofénac à 10 mg/Kg de p.c) ; **c** : Groupe III (100 mg/Kg de p.c d'huile essentielle) ; **d** : Groupe IV (200 mg/Kg de p.c d'huile essentielle) ; **e** : Groupe V (400 mg/Kg de p.c d'huile essentielle).

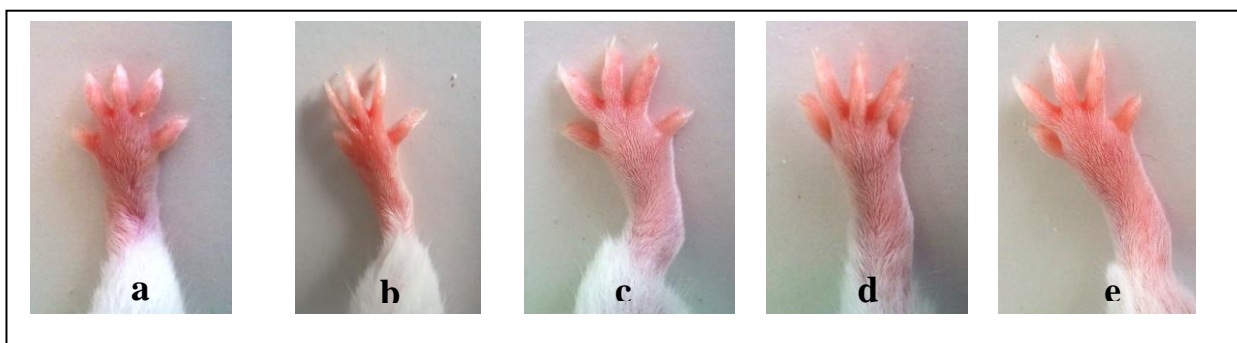


Figure n°4 : Effet de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Juniperus phoenicea* L. sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez la souris

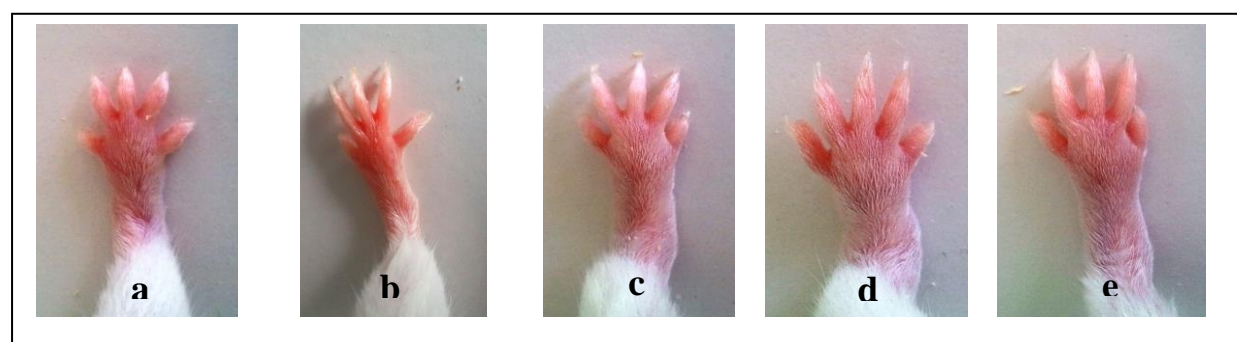


Figure n°5 : Effet de l'huile essentielle des baies de *Juniperus phoenicea* L. sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez la souris

a : Groupe I (Contrôle) ; **b** : Groupe II (Standard : Diclofénac à 10 mg/Kg de p.c) ; **c** : Groupe III (100 mg/Kg de p.c d'huile essentielle) ; **d** : Groupe IV (200 mg/Kg de p.c d'huile essentielle) ; **e** : Groupe V (400 mg/Kg de p.c d'huile essentielle).

Annexe n°9

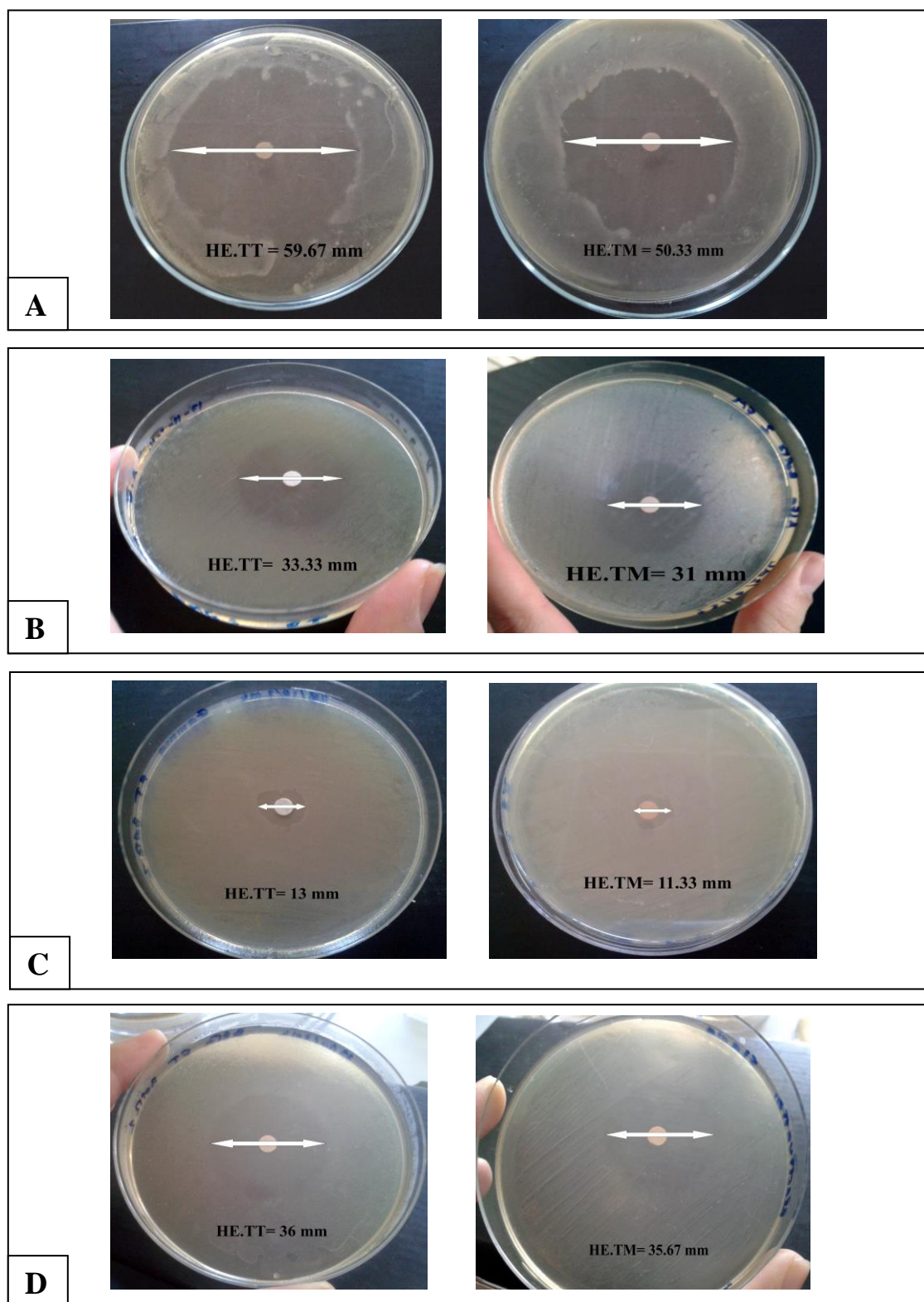


Figure n°1 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. de Tlemcen (HE.TT) et de Mostaganem (HE.TM)

A : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; **B** : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; **C** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; **D** : *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

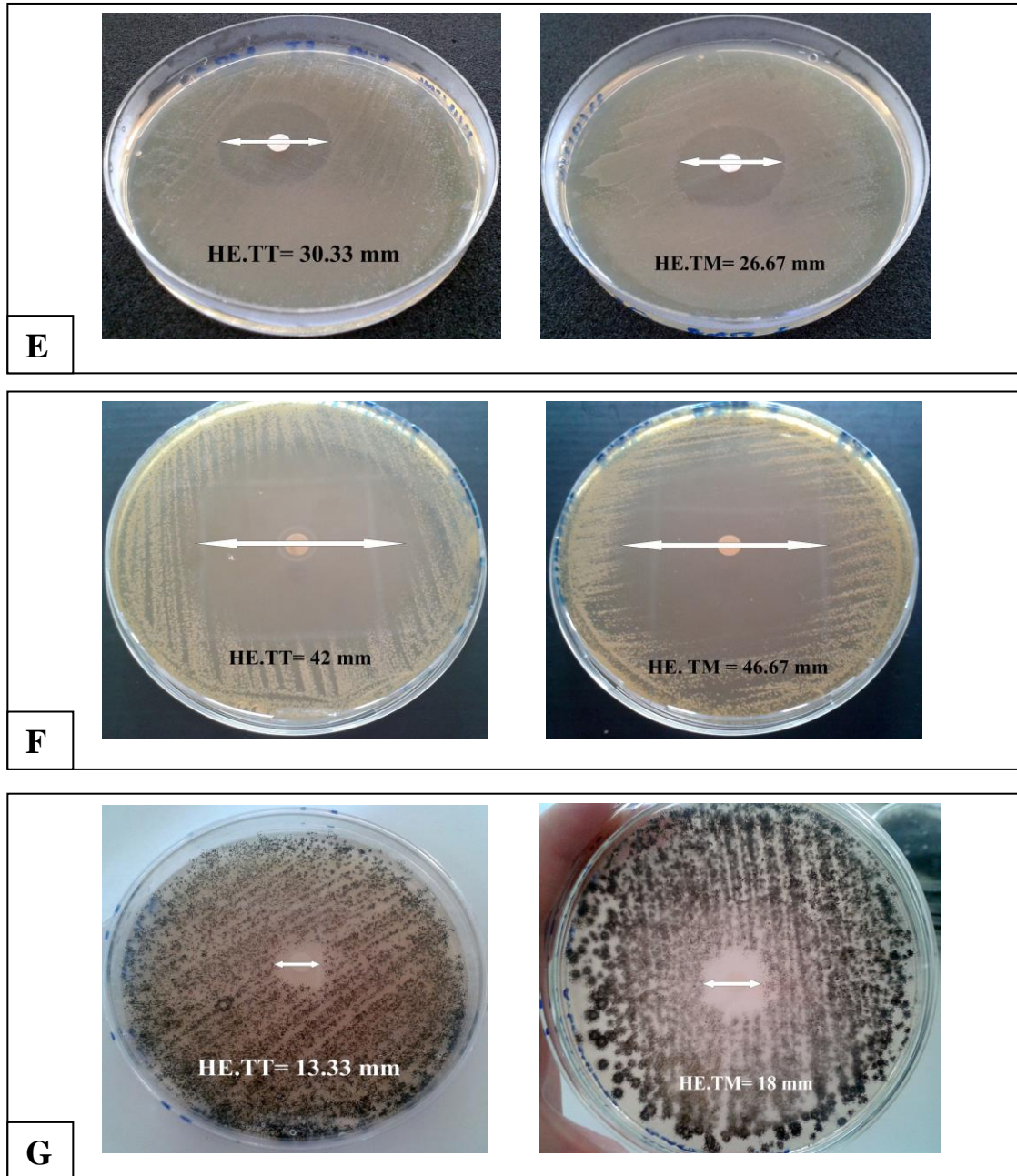


Figure n°2 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. de Tlemcen (HE.TT) et de Mostaganem (HE.TM) (Suite)

E : *Proteus vulgaris* ATCC 6380 ; **F** : *Candida albicans* ATCC 10231 ; **G** : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

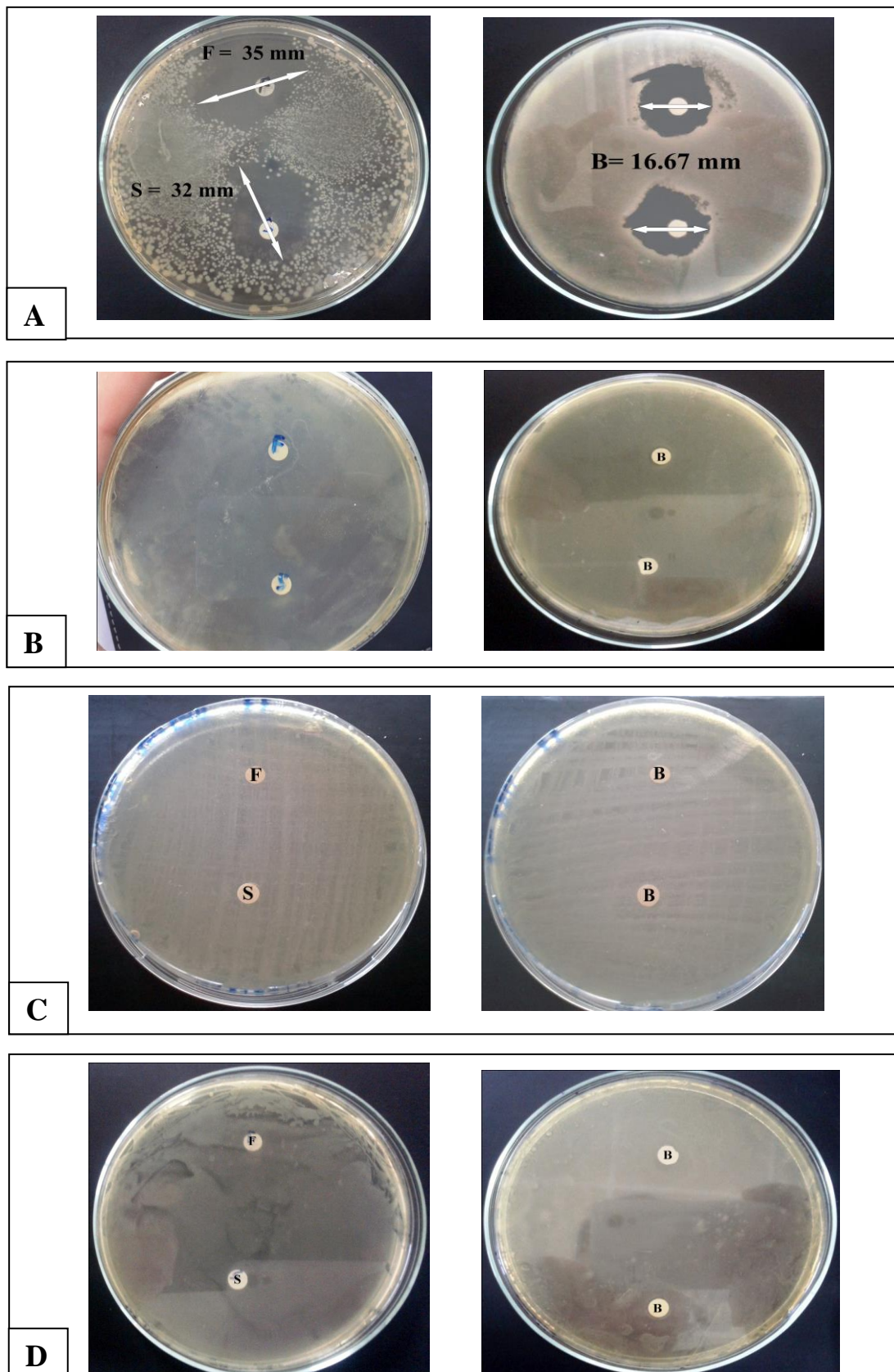


Figure n°3 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de feuilles fraîches (F), feuilles sèches (S) et des baies (B) de *Juniperus phoenicea* L.

A : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; **B :** *Escherichia coli* ATCC 25922 ; **C :** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; **D :** *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

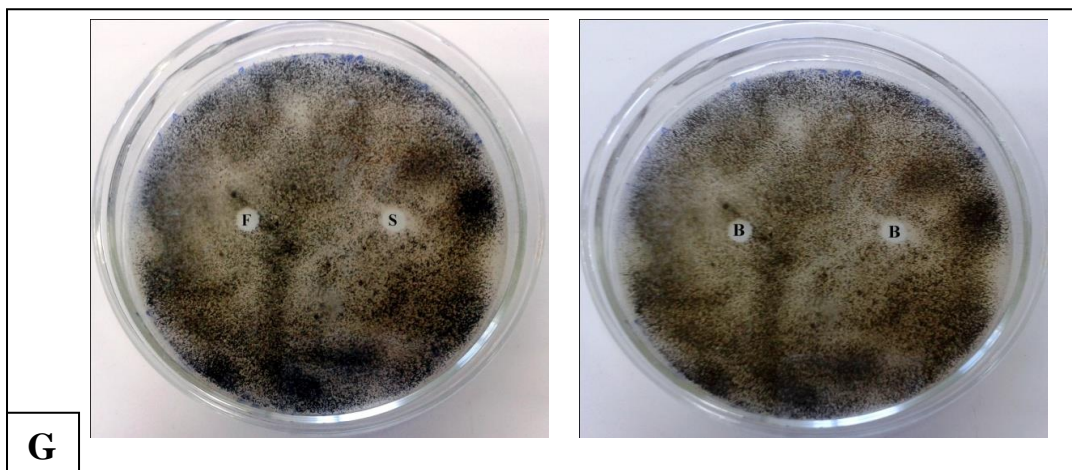
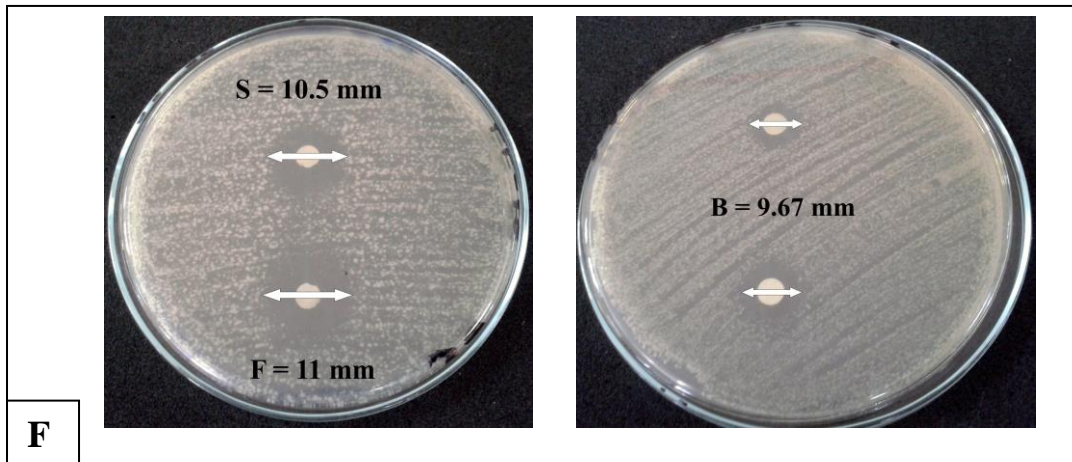
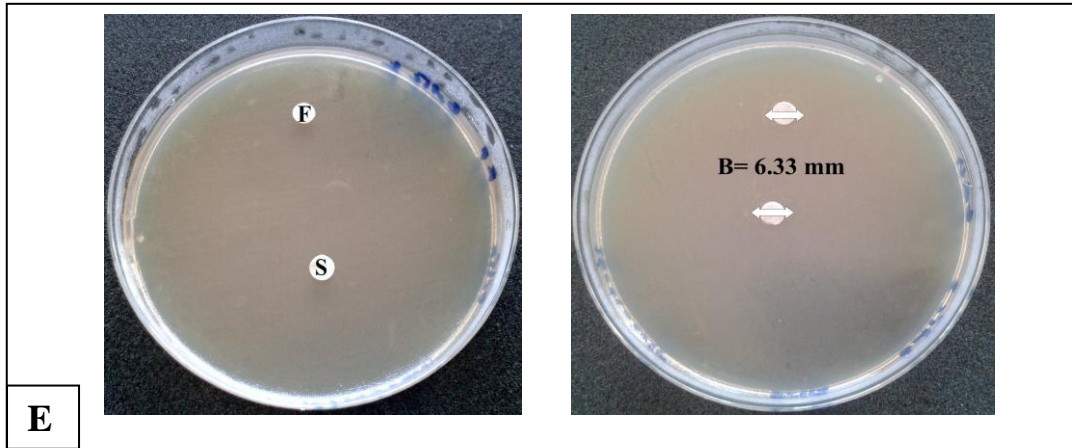


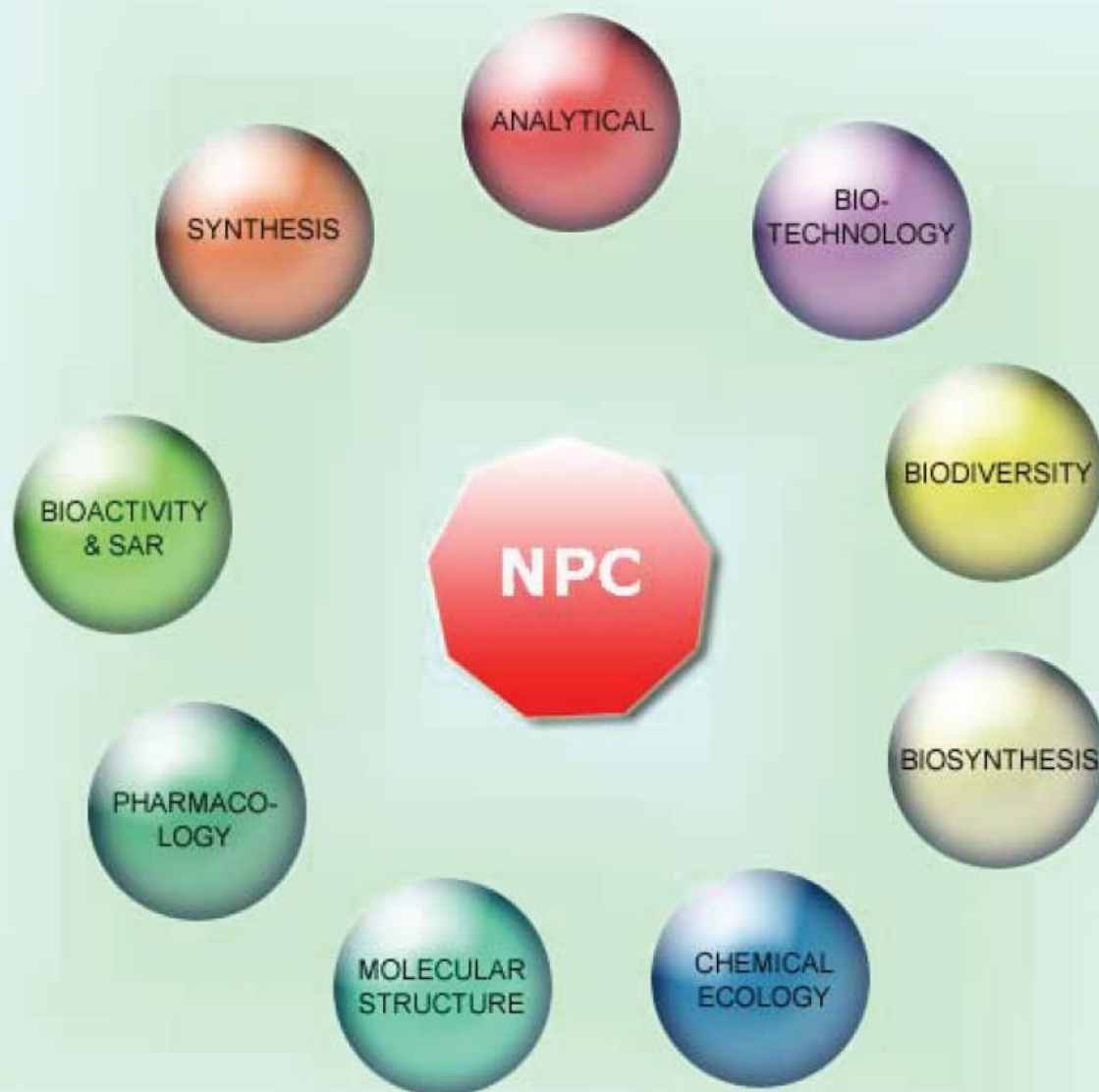
Figure n°4 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles de feuilles fraîches (F), feuilles sèches (S) et des baies (B) de *Juniperus phoenicea* L. (Suite)

E : *Proteus vulgaris* ATCC 6380 ; **F** : *Candida albicans* ATCC 10231 ; **G** : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Publication

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 12. Issue 4. Pages 475-640. 2017
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian *Thymus vulgaris* Essential Oil

Wafae Abdelli^a, Fouad Bahri^a, Abderrahmane Romane^b, Martina Höferl^c, Juergen Wanner^d, Erich Schmidt^c and Leopold Jirovetz^c

^aLaboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria

^bLaboratory of Applied Organic Chemistry, Semlalia, Cadi Ayyad University, Marrakech, Morocco

^cDepartment of Pharmaceutical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria

^dKurtKitzing Co., Hintern Alten Schloss, Wallerstein, Germany

bahrfouad13@gmail.com

Received: November 15th, 2016; Accepted: January 2nd, 2017

This work aims to elucidate the chemical composition of two essential oil (EO) samples obtained from the leaves of *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*) collected in two regions of Northwestern Algeria (Tlemcen and Mostaganem) and to assess their *in vivo* acute toxicity and anti-inflammatory activity. Sixty-six compounds could be identified by means of simultaneous GC-FID and GC-MS, accounting for 99.3% of total thyme oil of Mostaganem (EO.TM) and 99.0% of Tlemcen (EO.TT). In both samples, thymol was the major component, amounting to 59.5% (EO.TM) and 67.3% (EO.TT) of the total oil. EO.TT proved to be acutely toxic to mice at a dose of 4500 mg/kg p.o., whereas EO.TM did not show signs of acute toxicity, even at the highest dose tested (5000 mg/kg p.o.). Both EO samples were proven to possess anti-inflammatory activities, significantly reducing carrageenan-induced paw edema in mice (after 6 hours at a dose of 400 mg/kg p.o.) at 58.4% for EO.TT and 50.4% for EO.TM, respectively. In conclusion, it could be demonstrated that EOs of *T. vulgaris* exhibit a considerable *in vivo* anti-inflammatory activity at non-toxic doses.

Keywords: *Thymus vulgaris* L., Essential oil, Chemical composition, Acute toxicity, Anti-inflammatory activity.

Inflammatory processes are non-specific defense mechanisms developed to protect tissues against damage by harmful stimuli, e.g. pathogens, physical damage or chemical irritants, and initiating repair mechanisms [1]. Unfortunately, inflammation is accompanied by various undesirable symptoms, e.g. edema, erythema and pain, alleviated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs with well-known gastrointestinal, renal and cardiovascular adverse effects. Thus, there has recently been an increasing interest in highly effective anti-inflammatory agents from natural sources with as little adverse reaction as possible.

Thyme (*Thymus vulgaris* L., *Lamiaceae*) is widely used in traditional medicine and phytotherapy [2]. Its essential oil has been proven to possess a great variety of biological properties, including antibacterial [3, 4], antifungal [5], anthelmintic [6], insect repellent [7], antioxidant [8] and anticancer [4, 9] effects, often attributed to its high yield of phenolic compounds, i.e. thymol and carvacrol. Up to now, only little is known about anti-inflammatory effects of thyme EOs [10] though there is strong evidence that the antioxidant potential of phenols such as thymol are associated with inhibitory effects on inflammatory processes [11].

In the present study, we aimed at examining the composition of the leaf EOs of *T. vulgaris*, collected in two regions of Northwestern Algeria, Mostaganem and Tlemcen, and evaluating their *in vivo* acute oral toxicity and anti-inflammatory properties using the carrageenan-induced paw edema test. To our best knowledge, this is the first time that *T. vulgaris* EOs from western Algeria have been analyzed.

The EO yields were 2.2% for EO.TM and 4.2% for EO.TT, respectively, determined on dry weight basis, confirming previous

results for a *T. vulgaris* EO from Algeria [12]. The EO compositions, analyzed by simultaneous GC-FID and GC-MS, are presented in Table 1. In total, 66 volatile compounds could be identified, accounting for 99.3% of EO.TM and 99% of EO.TT. Both samples are dominated by monoterpenes and their oxygenated derivatives, the major component being thymol with 59.5% in EO.TM and 67.3% in EO.TT, respectively, whereas carvacrol was only found in traces in both EOs. Thus, it can be concluded that the analyzed EOs are typical representatives of the *T. vulgaris* chemotype thymol [13]. In both samples, thymol is accompanied by minor amounts of its biosynthetic precursors [14], γ -terpinene (8.7% in EO.TM; 10.1% in EO.TT) and *p*-cymene (5.6% in EO.TM; 6.0% in EO.TT). The present results are in accordance with results of *T. vulgaris* EOs of the same chemotype [3]. Interestingly, a previous study on Algerian thyme EO [12] revealed an unusually high content of *p*-cymene (26.4%) compared with thymol (25.6%), which may be explained by differences in plant age and harvesting times [15].

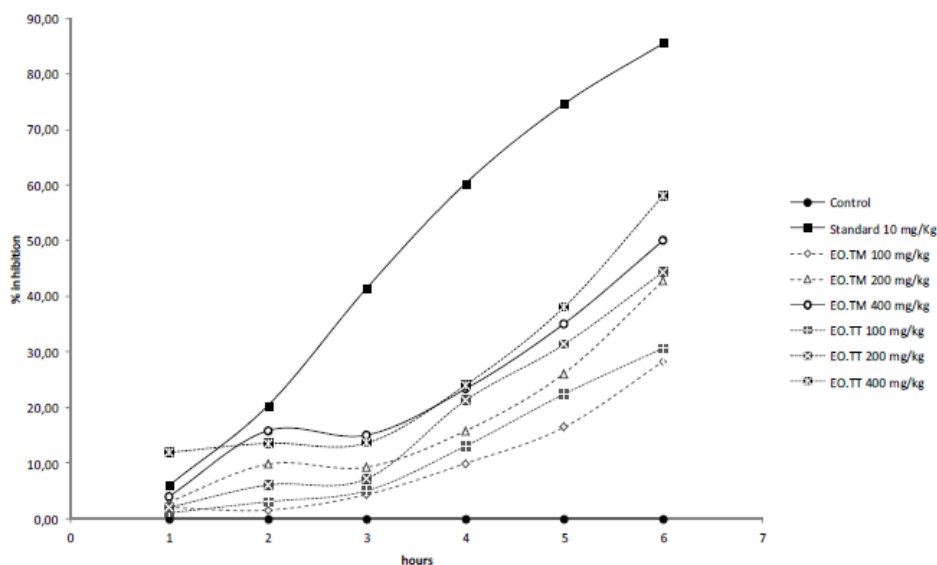
Concerning the acute toxicity study of *T. vulgaris* EOs, mortality was observed in 2 out of 3 mice 24 hours after testing EO.TT at a dose of 4500 mg/kg. Sedation and dyspnea were also noted during the first hours after treatment with this dose. According to the guidelines [16], a toxic dose 4500 mg/kg can be concluded for mice. Concerning EO.TM, no mortality was recorded in the mice tested, but sedation was observed during the first hours after treatment with 5000 mg/kg.

The results of the assessment of anti-inflammatory activity by carrageenan-induced paw edema in mice are given in Table 2 and Figure 1. The edema volume increases progressively depending on hours, reaching its peak in the control group four hours after carrageenan injection.

Table 1: Chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oils from Algeria.

| N° | Compound | <i>T. vulgaris</i> (Mostaganem) | | <i>T. vulgaris</i> (Tlemcen) | | N° | Compound | <i>T. vulgaris</i> (Mostaganem) | | <i>T. vulgaris</i> (Tlemcen) | |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|----------|------------------------------|----------|----|-----------------------------|---------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | | RI | Area (%) | RI | Area (%) | | | RI | Area (%) | RI | Area (%) |
| 1 | Methyl-2-methylbutanoate | 775 | tr | 775 | 0.1 | 34 | Terpinen-4-ol | 1192 | 0.4 | 1192 | 0.4 |
| 2 | Ethyl butyl ketone | 885 | tr | 886 | tr | 35 | p-Cymen-8-ol | 1194 | 0.1 | 1194 | tr |
| 3 | α -Thujene | 934 | 1.0 | 934 | 1.0 | 36 | α -Terpineol | 1203 | 0.1 | 1203 | 0.1 |
| 4 | α -Pinene | 944 | 5.7 | 944 | 1.6 | 37 | cis-Dihydrocarvone | 1211 | 0.2 | 1211 | 0.1 |
| 5 | Thuja-2,4(10)-diene isomer | 952 | tr | 953 | tr | 38 | trans-Dihydrocarvone | 1220 | 0.3 | 1220 | 0.1 |
| 6 | Camphene | 961 | 0.4 | 961 | 0.1 | 39 | trans-Carveol | 1230 | tr | 1230 | tr |
| 7 | Thuja-2,4(10)-diene | 965 | tr | 965 | tr | 40 | Carvacrol methyl ether | 1251 | 0.3 | 1251 | 0.1 |
| 8 | 1-Octen-3-ol | 978 | 0.6 | 978 | 0.1 | 41 | Carvone | 1259 | 0.1 | 1259 | tr |
| 9 | Sabinene | 983 | tr | 983 | tr | 42 | Thymol methyl ether | 1294 | 0.7 | 1294 | 2.9 |
| 10 | 3-Octanone | 986 | 0.3 | 986 | 0.1 | 43 | Carvacrol | 1300 | tr | 1300 | tr |
| 11 | β -Pinene | 990 | 0.4 | 990 | 0.2 | 44 | Thymol | 1309 | 59.5 | 1309 | 67.3 |
| 12 | Myrcene | 993 | 1.4 | 993 | 1.4 | 45 | Eugenol | 1370 | tr | 1369 | tr |
| 13 | 3-Octanol | 995 | 0.1 | 995 | 0.1 | 46 | α -Copaene | 1400 | tr | 1400 | tr |
| 14 | α -Phellandrene | 1014 | 0.2 | 1014 | 0.2 | 47 | β -Bourbonene | 1413 | 0.1 | 1413 | tr |
| 15 | δ -3-Carene | 1021 | 0.1 | 1021 | 0.1 | 48 | (E)- β -Caryophyllene | 1451 | 1.9 | 1451 | 1.4 |
| 16 | α -Terpinene | 1026 | 1.1 | 1026 | 1.3 | 49 | β -Copaene | 1458 | 0.1 | 1458 | tr |
| 17 | p-Cymene | 1033 | 5.6 | 1033 | 6.0 | 50 | Aromadendrene | 1471 | 0.2 | 1471 | 0.1 |
| 18 | Limonene | 1038 | 1.0 | 1038 | 0.4 | 51 | α -Humulene | 1486 | 0.1 | 1486 | tr |
| 19 | β -Phellandrene | 1041 | 0.3 | 1041 | 0.2 | 52 | allo-Aromadendrene | 1494 | 0.1 | 1493 | tr |
| 20 | (E)- β -Ocimene | 1050 | 0.1 | 1050 | 0.1 | 53 | γ -Muurolene | 1501 | 0.1 | 1501 | 0.1 |
| 21 | γ -Terpinene | 1067 | 8.7 | 1067 | 10.1 | 54 | Germacrene D | 1512 | 0.1 | 1511 | tr |
| 22 | cis-Sabinene hydrate | 1077 | 0.1 | 1077 | 0.1 | 55 | Ledene | 1525 | 0.2 | 1525 | 0.1 |
| 23 | 3-Nonen-1-ol | 1079 | 0.2 | 1080 | 0.1 | 56 | Bicyclogermacrene | 1527 | 0.1 | 1527 | tr |
| 24 | 3-Nonanone | 1087 | tr | 1087 | tr | 57 | γ -Cadinene | 1542 | 0.1 | 1541 | 0.1 |
| 25 | trans-Linalool oxide | 1096 | tr | 1096 | tr | 58 | δ -Cadinene | 1546 | 0.2 | 1546 | 0.1 |
| 26 | Terpinolene | 1098 | 0.1 | 1098 | 0.1 | 59 | Cadina-1,4-diene | 1559 | tr | 1559 | tr |
| 27 | Linalool | 1102 | 5.1 | 1102 | 2.7 | 60 | α -Cadinene | 1564 | tr | 1564 | tr |
| 28 | Nonanal | 1105 | 0.1 | 1105 | 0.1 | 61 | Spathulenol | 1612 | 0.3 | 1612 | 0.1 |
| 29 | trans-Sabinene hydrate | 1109 | 0.1 | 1109 | 0.1 | 62 | Caryophyllene oxide | 1622 | 0.2 | 1621 | 0.2 |
| 30 | trans-Pinocarveol | 1156 | 0.1 | 1156 | tr | 63 | Globulol | 1630 | tr | 1630 | tr |
| 31 | cis-Verbenol | 1158 | 0.1 | 1158 | tr | 64 | Isospathulenol | 1670 | 0.1 | 1670 | 0.1 |
| 32 | p-Mentha-1,5-dien-8-ol | 1178 | tr | 1179 | tr | 65 | r-Cadinol | 1672 | tr | 1672 | tr |
| 33 | Borneol | 1183 | 1.2 | 1183 | 0.1 | 66 | α -Cadinol | 1685 | tr | 1685 | tr |
| Total identified | | | | | | | | 99.3 | | 99.0 | |

RI: Retention index; tr: Traces < 0.05 %.

Figure 1: Inhibition (in %) of paw edema by *Thymus vulgaris* essential oils and diclofenac during 6 hours after carrageenan injection.

Carrageenan-induced paw edema is a commonly used experimental model of acute inflammation characterized by a biphasic development of edema [17]. The first phase (1 – 2 hours) is dependent on mediator release, e.g. histamine, serotonin and bradykinin [17], whereas the second phase (3 – 6 hours) is sustained by the release of prostaglandins, leukotrienes, lysozymes, proteases, NO and by local infiltration by neutrophils producing free oxygen radicals, e.g. O_2^- and OH^- [18]. This phase is sensitive to the majority of clinically effective anti-inflammatory drugs [17].

The treatment of mice with the two EOs of *T. vulgaris* at different doses showed a highly significant decrease of edema ($p < 0.001$) from four hours compared with the control, whereas the same could already be observed for diclofenac from three hours compared with the control. These results go along with a previous study on commercial thyme EO [10]. A previous study gave evidence that acute inflammation in the mouse paw edema model is –apart from increased oxygen radical formation – mediated by NO, produced by endothelial and from six hours additionally inducible nitric oxide synthase, and by PGE_2 [19], whose precursor is generated by COX-1 [18].

Table 2: Anti-inflammatory of *Thymus vulgaris* essential oils on paw edema induced by carrageenan in mice.

| Treatment | Paw thickness (mm) | | | | | |
|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h |
| Control | 2.86 ± 0.008 | 3.18 ± 0.008 | 3.25 ± 0.01 | 3.31 ± 0.006 | 3.19 ± 0.009 | 3.09 ± 0.01 |
| Standard 10 mg/kg | 2.84 ± 0.005* | 2.95 ± 0.007*** | 2.71 ± 0.005*** | 2.47 ± 0.009*** | 2.23 ± 0.008*** | 2.07 ± 0.007*** |
| EO.TM 100 mg/kg | 2.83 ± 0.006* | 3.15 ± 0.005 | 3.18 ± 0.009*** | 3.16 ± 0.005*** | 2.96 ± 0.007*** | 2.73 ± 0.008*** |
| EO.TM 200 mg/kg | 2.87 ± 0.005 | 3.09 ± 0.006*** | 3.16 ± 0.007*** | 3.12 ± 0.008*** | 2.88 ± 0.016*** | 2.60 ± 0.009*** |
| EO.TM 400 mg/kg | 2.89 ± 0.012 | 3.04 ± 0.008*** | 3.11 ± 0.007*** | 3.04 ± 0.009*** | 2.79 ± 0.014*** | 2.54 ± 0.011*** |
| EO.TT 100 mg/kg | 2.83 ± 0.008** | 3.12 ± 0.01** | 3.16 ± 0.009*** | 3.10 ± 0.007*** | 2.87 ± 0.004*** | 2.69 ± 0.008*** |
| EO.TT 200 mg/kg | 2.83 ± 0.005** | 3.09 ± 0.009*** | 3.14 ± 0.01** | 2.99 ± 0.012*** | 2.76 ± 0.007*** | 2.53 ± 0.008*** |
| EO.TT 400 mg/kg | 2.76 ± 0.01*** | 2.99 ± 0.023*** | 3.05 ± 0.009*** | 2.95 ± 0.007*** | 2.67 ± 0.009*** | 2.36 ± 0.017*** |

Mean ± SEM (n = 6); EO.TM: Essential oil of thyme of Mostaganem; EO.TT: Essential oil of thyme of Tlemcen; Control: vehicle (Tween 80, 1%); Standard: Diclofenac. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significance (comparison with control group)

The anti-inflammatory activity of *T. vulgaris* EOs can be mainly attributed to its main compound, thymol. Indeed, previous studies could demonstrate anti-inflammatory properties for this compound [20, 21]. Thymol seems to interfere with the activity of elastase, a marker of inflammatory disease produced by activated neutrophils [22], and inhibits COX [23]. As already pointed out, the strong antioxidant activity of thymol also contributes to anti-inflammatory activity [24]. Moreover, thyme EO was shown to reduce the secretion of inflammation mediators such as TNF- α , IL-1 and IL-8 [24]. Additionally, minor compounds, like *p*-cymene and linalool, may also contribute to anti-inflammatory activity: *p*-cymene was found to block NF- κ B and MAPK signaling pathways, thus reducing TNF- α and IL-1 β secretion [25]. Linalool inhibits inducible nitric oxide synthase and thus the proinflammatory effects of NO [26]. In conclusion, it could be demonstrated that *T. vulgaris* EOs from western Algeria possess a considerable anti-inflammatory activity at doses far below toxic concentrations.

Experimental

Plant material: The aerial parts of *T. vulgaris* were collected in May 2014 in 2 regions in the northwest of Algeria:

1. Kharrouba, located in the east of Mostaganem (longitude 0°6'161"E, latitude: 35°58'742"N and altitude 80 m).
2. SebbaChioukh, located in the north of Tlemcen (longitude 1°21'21"O, latitude 35°9'22"N and altitude 514 m).

The samples were identified by Ms Hafida Hasnaoui, engineer in the national park of Tlemcen. Voucher specimens (Nr. HTAST-13 and HVSM-27) were deposited at Abdelhamid Ibn Badis University, Faculty of Nature and Life Sciences, Mostaganem. The samples were washed and dried at room temperature in the dark for 15 days.

Essential oil extraction: Dried leaves (100 g) of *T. vulgaris* were subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oils were stored at 4°C until tested.

GC-FID and GC-MS analyses: GC-FID analysis was performed on a Thermo Quest Trace GC equipped with FID using a SE-52 capillary column (50 m × 0.25 mm × 1.0 μ m). Helium 5.0 was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min; the initial oven temperature was programmed at 60°C for 1 min with an increase to 250°C at a rate of 3°C/min. The MS and FID data were simultaneously acquired using a MS-FID splitter consisting of a quartz Y-splitter and a short (ca. 20 cm) 0.1 mm ID fused silica restrictor column as an inlet to the GC-MS interface and a ca. 1 m × 0.25 mm deactivated fused silica column as a transfer line to the FID detector. The injector and detector temperatures were 230°C and 250°C, respectively. EO sample (0.1 μ L) was injected neat at a split ratio of 1:100. GC-MS analysis was performed on a Thermo Quest Automass Solo single quadrupole mass spectrometer with interface heating at 250°C, ion-source at 230°C, EI mode at 70 eV, scan range 40-500 amu, scan rate of 0.5 sec and filament 300 μ A. Components were identified using ThermoXcalibur 1.2 software by correlating spectra with NIST08, Wiley 8th Ed, Adams [27], and

Mass Finder terpenoids libraries. The retention indices were determined according to [28]. Quantification was achieved using normalized peak area calculations of the FID without relative FID response factors.

Pharmacological tests

Animals: Swiss albino mice of both sexes (weighing 25 – 30 g) were purchased from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). They were housed in polypropylene cages with free access to standard pellet diet and water *ad libitum*, and maintained under controlled conditions of temperature (25 ± 2°C) with a 12 h light/dark cycle. The mice were acclimatized to the environment for 2 weeks prior to experimental use. All experimental protocols were prepared and performed based on ethical guidance of the Institutional Animal Ethical Committee.

Preparation of test samples: The essential oils of *T. vulgaris* were suspended in a mixture of distilled water and 1% Tween 80 providing a 100 mg/mL solution to be administered orally to the animals [29]. Additional agents including carrageenan (1%) and diclofenac were dissolved in normal saline (0.9%, w/v) prior to use. All the chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Acute oral toxicity: The acute oral toxicity was tested according to OECD Guideline N°423 [16]. The animals were fasted for 16 h prior to the experiment with *ad lib.* access to water. The EOs were orally administered to groups of mice (n = 3) at doses of 50, 100, 200, 300, 500, 1000 and 2000 mg/kg, respectively. The control group received only the vehicle. Animals were continuously observed during 2 h after treatments to detect changes in autonomic or behavioral responses and monitored for any mortality for the following 48 h and then for 7 days. If no death occurred in any group, the test was repeated at higher doses (3000, 4000, 4500 and 5000 mg/kg) with a fresh batch of animals (n = 3).

Anti-inflammatory activity: The anti-inflammatory activity was assessed on the basis of inhibition of paw edema induced by the injection of carrageenan [30]. The mice were fasted for 16 h prior to the experiment with free access to water. They were divided into 8 groups of 6 animals each. Group I (control) received the vehicle (Tween 80, 10mL/kg), Group II (standard) reference drug (diclofenac, 10 mg/kg). Groups III to V received EO.TM at doses of 100, 200 and 400 mg/kg, respectively. The same doses for EO.TT were administered to Groups VI to VIII, respectively. All the treatments were performed by oral administration. 30 min after drug administration; edema was induced by injecting 50 μ L carrageenan (1%, w/v) into the sub-plantar region of the right hind paw. Paw thickness (mm) was measured using digital vernier calipers before injection and every 60 min for 6 h after induction of the inflammation [31]. Edema inhibition percentage was calculated as follows:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(V_t - V_0)_{\text{control}} - (V_t - V_0)_{\text{tested}}}{(V_t - V_0)_{\text{control}}}$$

where V_t is the paw volume after a specific time interval after carrageenan injection and V_0 the paw volume before carrageenan injection.

Statistical analysis: The results were statistically analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test, using R software. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

References

- [1] Jain P, Pandey R, Shukla SS. (2014) *Inflammation: Natural Resources and Its Applications*. Springer India, New Delhi, India.
- [2] Zarzuelo A, Crespo E. (2002) The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In *Thyme: The Genus Thymus* (S. 263–292). CRC Press, Boca Raton, Florida, 263–292.
- [3] Schmidt E, Wanner J, Höferl M, Jirovetz L, Buchbauer G, Gochev V, Girova T, Stoyanova A, Geissler M. (2012) Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Natural Product Communications*, 7, 1095–1098.
- [4] Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, Wu N. (2010) Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15, 3200–3210.
- [5] Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. (2004) Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18, 990–995.
- [6] Giarratana F, Muscolino D, Beninati C, Giuffrida A, Panebianco A. (2014) Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Experimental Parasitology*, 142, 7–10.
- [7] Choi W-S, Park B-S, Ku S-K, Lee S-E. (2002) Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18, 348–351.
- [8] Chizzola R, Michitsch H, Franz C. (2008) Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6897–6904.
- [9] Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. (2011) Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31, 81–87.
- [10] Juhas Š, Bujňáková D, Reháč P, Čikoš Š, Czikková S, Veselá J, Ilková G, Koppel J. (2008) Anti-inflammatory effects of thyme essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno*, 77, 327–334.
- [11] Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Takagi N. (1986) Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *Journal of Dental Research*, 65, 53–56.
- [12] Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. (2008) Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79, 199–203.
- [13] Thompson JD, Chalchat J-C, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris*. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 859–880.
- [14] Poulou AJ, Croteau R. (1978) Biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187, 307–314.
- [15] Hudaib M, Speroni E, Di Pietra AM, Cavriani V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 691–700.
- [16] OECD. (2002) *Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071001-en>
- [17] Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. (1969) Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 166, 96–103.
- [18] Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142, 331–338.
- [19] Claudino RF, Kassuya CAL, Ferreira J, Calixto JB. (2006) Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E₂-induced mouse paw edema. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318, 611–618.
- [20] Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevo-Silva CF, Carvalho MD de B, Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. (2012) Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, e657026.
- [21] Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM. (2012) Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 656–663.
- [22] Braga PC, Dal Sasso M, Fonti E, Culici M. (2009) Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology*, 83, 110–115.
- [23] Veras HNH, Araruna MKA, Costa JGM, Coutinho HDM, Kerntopf MR, Botelho MA, Menezes IRA. (2013) Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* CHAM: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research*, 27, 179–185.
- [24] Tsai M-L, Lin C-C, Lin W-C, Yang C-H. (2011) Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1977–1983.
- [25] Zhong W, Chi G, Jiang L, Soromou LW, Chen N, Huo M, Guo W, Deng X, Feng H. (2012) *p*-Cymene modulates *in vitro* and *in vivo* cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Inflammation*, 36, 529–537.
- [26] Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (2006) (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, 78, 719–723.
- [27] Adams RP. (2001) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Pub. Corp., Carol Stream, IL.
- [28] van Den Dool H, Dec. Kratz P. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463–471.
- [29] Faria LRD, Lima CS, Perazzo FF, Carvalho JCT. (2011) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7, 1–8.
- [30] Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 111, 544–547.
- [31] Vasudevan M, Gunnam KK, Parle M. (2006) Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Daucus carota* seeds extract. *Journal of Health Science*, 52, 598–606.