



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCCEN



MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

Melle BENHAMIDAT Lyna

Sur le thème

Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques exploitées au niveau de la pépinière d'Ain fettouh

Soutenu publiquement le 26 Juin 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme BENYAROU Meriem	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mr SELLES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Encadreur

*Laboratoire LASNABIO
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives LASNABIO de la faculté des sciences, Université de Tlemcen.

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrant Mr. « DIB Mohammed El Amine », également responsable du Master CPN, pour la disponibilité, l'orientation, la confiance, la patience, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mme « BENYAROU Meriem », de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Ma gratitude va également à Mr « SELLES Chaouki », le chef de département de chimie, pour avoir aimablement accepté d'examiner mon travail et de participer à ce jury.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs et enseignants du département de chimie qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail notamment le doctorant Mouhamed SEMAOUI, les personnels du laboratoire LASNABIO, le parc national et La forêt modèle de Tlemcen, spécialement, Mme KORSO Latéfa, Mr KHELLIL Bensalem et Mr MOUMANI Mohammed.

A mes chers parents pour tout leur amour, leur soutien, leurs sacrifices et leurs encouragements tout au long de mes études, sans eux je n'en serais pas là. A mes chers frères pour leur aide et leur appui. A Mon fiancé pour sa patience, son soutien, sa sympathie chaleureuse et son appui inestimable. A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Un chaleureux Merci à tous mes Ami(e)s que j'aime tant : Radja, Sarah, Wafaa, Sarah, Djazia, Charaf, Aman... Pour leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.

Enfin, J'adresse mes sincères remerciements à tous les enseignants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Merci

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

I.1. <i>Salvia officinalis</i>	3
I.1.1. Description botanique	3
I.1.2. Usage traditionnel.....	3
I.1.3. Travaux antérieurs « Composition chimique ».....	4
I.2. <i>Satureja calamintha nepeta</i>	5
I.2.1. Descriptions botaniques.....	5
I.2.2. Usage traditionnel.....	5
I.2.3. Travaux antérieurs « Composition chimique ».....	6
I.3. <i>Ammoides verticillata</i>	6
I.3.1. Description botanique.....	6
I.3.2. Usage traditionnel.....	7
I.3.3. Travaux antérieurs « Composition chimique ».....	8
I.4. Les huiles essentielles	9
I.4.1. Introduction	9
I.4.2. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles	9
I.5. Analyse des huiles essentielles	10
I.5.1. Chromatographie en phase gazeuse CPG et CPG-SM.....	10
I.5.2. Identifications des constituants des huiles essentielles	10
I.5.3. Les activités antioxydantes des huiles essentielles	11

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	12
II.2. Composition chimique des parties aériennes des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> , <i>Salvia officinalis</i> et <i>Calamintha nepeta</i>	12
II.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d' <i>A. verticillata</i>	12
II.2.2. Fractionnement et isolement du thymol de l'huile essentielle d' <i>A. verticillata</i>	13
II.3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>C. nepeta</i>	14
II.4. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>S. officinalis</i>	16

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

III.1. Evaluation des propriétés antioxydantes des trois huiles essentielles : Matrices individuelles et croisés.	17
III.1.1. Introduction	17
III.2. Évaluation de l'activité antioxydante : Matrice individuelle.....	17
III. 3. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés	19
III. 4. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP :.....	20
III. 5. Discussion	21

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1. Echantillonnage du matériel végétal	23
IV.1.1. Provenance du matériel végétale et identification.....	23
IV.2. Préparation des huiles essentielles.....	23
IV.2.1. Méthodes d'extractions	23
IV.2.2. La technique Hydrodistillation.....	23
IV.2.3. Rendement des huiles essentielles.....	24
IV.3. Caractérisation des huiles essentielles :	24
IV.3.1. Conditions CPG (LASNABIO).....	24
IV.3.2. Conditions CPG/FID de Corse	25
IV.3.3. Conditions (CPG/SM) de Corse.....	26
IV.4. Chromatographie sur colonne.....	26
IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	28
IV.5.1. Piégeage du radicale libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	28
IV.5.2. Reduction du Fer : Frap	30

CONCLUSION.....32

Références bibliographiques.....	34
----------------------------------	----

INTRODUCTION GENERALE

En Algérie, nous avons hérité d'une biodiversité importante par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les steppes, les hauts plateaux, et les oasis sahariens. Quasiment 2840 espèces existant en Algérie, dont 256 plantes endémiques spécifiques ce qui se traduit par un taux de 9.01% d'espèces endémiques.

L'utilisation de ces plantes à évolué avec la civilisation humaine en raison des multiples usages bénéfiques apportés par ces espèces. Une grande variété est caractérisée par la filière des plantes aromatiques et médicinales et est répartie en trois grandes familles : plantes à parfums, plantes aromatiques et enfin les plantes médicinales.

La filière PAM c'est-à-dire plantes aromatiques et médicinales est une richesse peu exploitée en Algérie, un domaine pratiquement vierge et délaissé, des espèces sous-utilisées et négligées, alors que c'est un créneau lucratif, il peut substituer le pétrole et offrir des opportunités et emplois pour la diversification des revenus des populations rurales.

Le secteur des huiles essentielles a disposé d'une croissance rapide durant ces dernières années, cela du a la variabilité des applications de ces extraits naturels dans diverses industries : en médecine, dans la composition des parfums, cosmétiques et l'agroalimentaires. Aujourd'hui ces extraits de plantes sont d'une importance économique considérable dans le marché national et international grâce à la pluralité de leurs activités.

Suite à la demande croissante des huiles essentielles dans le monde, l'Algérie présente un très fort potentiel de productivité pour concurrencer le marché international. A cet effet, il faudrait se doter d'unités modernes de transformation en produits de haute valeur ajoutée qui répondent aux règles strictes de la qualité internationale, de même crée une marque.

Dans ce contexte l'association forêt modèle qui existe depuis 2013 à Tlemcen, en collaboration avec le parc national et la direction générale des forêts élaborent le projet « GIE » c'est-à-dire groupe d'intérêt économique. Dans cette GIE le but principal est de produire et commercialiser les huiles essentielles et leurs dérivées.

De ce fait, notre travail consiste à étudier la composition chimique des huiles essentielles de trois plantes cultivées : (*Calamintha nepeta*, *Ammoides verticillata* et *Salvia officinalis*) dans la pépinière de Ain Fettouh, de la commune d'Ain Ghoraba (Tlemcen) et par conséquent, comparer les compositions chimiques trouvées avec ceux de la littérature et commercialisées dans le monde. Ce travail sera complété par quelques activités biologiques et perspectives économiques.

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail s'organise autour de 3 parties présentant successivement une étude bibliographique, la caractérisation chimique, et l'évaluation de l'activité antioxydante des composés volatils des trois espèces, *Calamintha nepeta*, *Ammoides verticillata* et *Salvia officinalis*.

La partie A est consacrée à la description botanique et ethnobotanique des trois plantes qui font l'objet de notre étude. Par la suite, nous présentons une synthèse des travaux publiés dans la littérature sur les familles chimiques des huiles essentielles contenus dans les trois espèces. Nous explicitons par la suite les méthodes de préparation des huiles essentielles et les moyens d'analyse appropriés pour la caractérisation de leurs constituants.

La partie B présente l'ensemble des résultats relatifs aux constituants moléculaires de nos échantillons. Les résultats de l'étude des compositions chimiques des échantillons d'huiles essentielles de chaque espèce.

La partie C décrit les potentialités antioxydantes des huiles essentielles qui font l'objet de notre étude. Enfin nous terminerons notre travail par la description du volet expérimental développé, à savoir, le matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour réaliser l'extraction et l'évaluation des activités antioxydantes des huiles essentielles.

En **conclusion**, nous énumérons les résultats obtenus à travers les études chimiques et biologiques des trois espèces étudiées et nous envisagerons quelques perspectives de la poursuite du travail.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

I.1. *Salvia officinalis*

I.1.1. Description botanique :

En latin, la sauge vient de 'salvare' signifiant sauvé, guérir. En France appelée « the de Provence » ou encore « the de la Grèce » est souligner comme étant 'herbe sacré des latins'. [1, 2]

Salvia est une plante annuelle et biannuelle de la famille des labiés d'origine méditerranéen. C'est une plante aromatique et médicinale à l'odeur camphrée caractéristique, largement utilisée soit sous forme naturel ou galénique : extrait ou huile essentielle. De plus de son utilisation dans le coté artisanale (culinaire et médecine populaire) elle est exploitée par l'industrie pharmaceutique, les industries de la parfumerie et de la cosmétologie et enfin par l'industrie alimentaire. [3, 4] En Algérie, une trentaine d'espèces ont été déterminées portant plusieurs appellations, selon Ibn el Beytar, les andalous la nomment « essalama », comme synonyme de Saleme, el djazair indique l'expression « souek ennebi ». [5]



Figure 1. *Salvia officinalis* : feuilles et fleurs.

I.1.2. Usage traditionnel :

La sauge a été utilisée depuis l'Antiquité pour diverses affections humaines, c'est une des plantes sacrées des anciens vu ses propriétés miraculeuses. '*Qui a de la sauge dans son jardin, n'a pas besoin d'un médecin*' (dicton provençal).

En usage externe, elle est employée en gargarisme contre les abcès et inflammation de la bouche, de même pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies. [6] En usage interne, elle est appliquée en infusion pour lutter contre plusieurs maladies comme : les troubles sanguines, les troubles digestifs, et les problèmes du système nerveux. [7] De plus, la sauge est considérée comme stimulante pour les gens anémiques, stressés et déprimés, pareillement conseillé pour

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

les étudiants en période d'examen. Egalement cette herbe aromatique est consommée en cuisine pour son gout camphré, légèrement amer et puissant.[8]

I.1.3. Travaux antérieurs « Composition chimique » :

La recherche bibliographique exhaustive sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* a montré que cette espèce a fait l'objet de nombreuses études. La figure 2 ci-dessous regroupe les principaux travaux réalisés autour des 10 pays comme l'Algérie, Maroc, Mexique, Albanie, Roumanie....

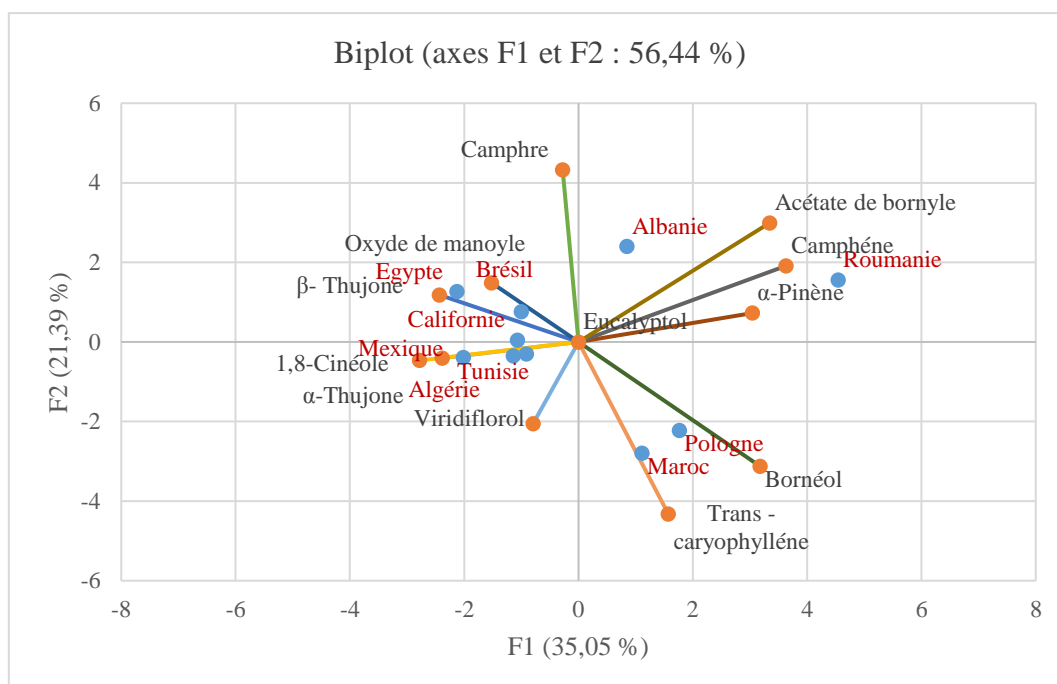


Figure 2. Analyse en composantes principales de l'huile essentielle *Salvia officinalis* des pays traités.

D'après la figure, on remarque que chaque région est spécifiée par un chémotype. L'analyse en composantes principales de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*, montre que le biplot de cette analyse statistique est inférieur à 80% cela signifie que la composition chimique de ces huiles est divergente à travers les 10 pays. En générale, les huiles essentielles de la Pologne [9] et du Maroc [10] sont caractérisées par le bornéol et le trans-caryophyllène, celle d'Albanie [11] et la Roumanie [12] par l'acétate de bornyle, camphène et l'alpha-pinène. Cependant, l'huile essentielle du Brésil [13], l'Egypte [14] et la Californie [15] sont caractérisées par le camphre, oxyde de manoyle et β-thujone, quant à celles du Mexique [15], Tunisie [16] et l'Algérie [17] ont trouvé le 1.8 cinéol, alpha-thujone et le viridiflorol comme composantes majoritaires.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

I.2. *Satureja calamintha nepeta*

I.2.1. Descriptions botaniques :

Le genre *Satureja* appartient à la famille des Lamiaceae. Cette famille comprend environ 200 espèces qui sont cultivées et répandues dans le sud-ouest de l'Asie, l'Amérique et les régions méditerranéennes.[18] Il existe plusieurs espèces caractérisées par leur forte odeur rappellent celle de la menthe.[19] Cette espèce est rencontrée sur les terrains incultes, le bord des routes, dans le tell, et surtout en montagnes jusqu'à 1500 m d'altitude.[20]



Figure 3. *Calamintha nepeta ssp nepeta*

I.2.2. Usage traditionnel :

Satureja Calamintha est une excellente plante aux propriétés médicinales employées par la population locale sous forme de décoction pour traiter : la flatulence, l'indigestion, les troubles digestives, manque de concentration, arthrites, stress, la fatigue psychique et les infections respiratoires bénignes et urinaires.[21] Egalement cette espèce constitue un bon remède contre : la toux et le rhume.

Mélangée à d'autre plante comme le thym, la synergie favorise la sudation et fait baisser la fièvre. Cette plante tonique, expectorante et stomachique possède des propriétés antibactériennes, antispasmodiques, antiseptiques et carminatives.[22] En aromathérapie, l'huile essentielle possède de nombreuses vertus thérapeutiques, en massage ou en friction : elle tonifie en cas de fatigue physique et morale, de plus elle permet de lutter contre le stress et renforce le système immunitaire.[21] En diffusion : stimule les capacités intellectuelles. Avec son parfum frais herbacé et piquant, elle stimule les glandes surrénaux.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

I.2.3. Travaux antérieurs « Composition chimique » :

Beaucoup de travaux ont été effectués sur la composition chimique de l'huile essentielle du genre *Satureja*. La teneur et la nature des constituants changent d'un pays à l'autre en raison de la nature du sol, du climat ou l'origine de la plante.

L'Analyse en composantes principales de l'huile essentielle de cette plante montre que le biplot de cette analyse est supérieur à 80% ce qui signifie que la sarriette présente une variabilité chimique. Le premier chémotype est celui de l'huile essentielle du Portugal [23] qui se caractérise par l'isomenthone, 1.8-cinéol et le trans-isopulégone, l'huile essentielle d'Algérie [24] est chémotypée néo-menthol, alors que les huiles essentielles d'Italie [23] et de la France [25] sont chémotypées par le pulégone et pipériténone. Cependant, celle de la Turquie [26] est marquée par le menthone, gamma-terpinène, limonène et carvacrole (Figure 4).

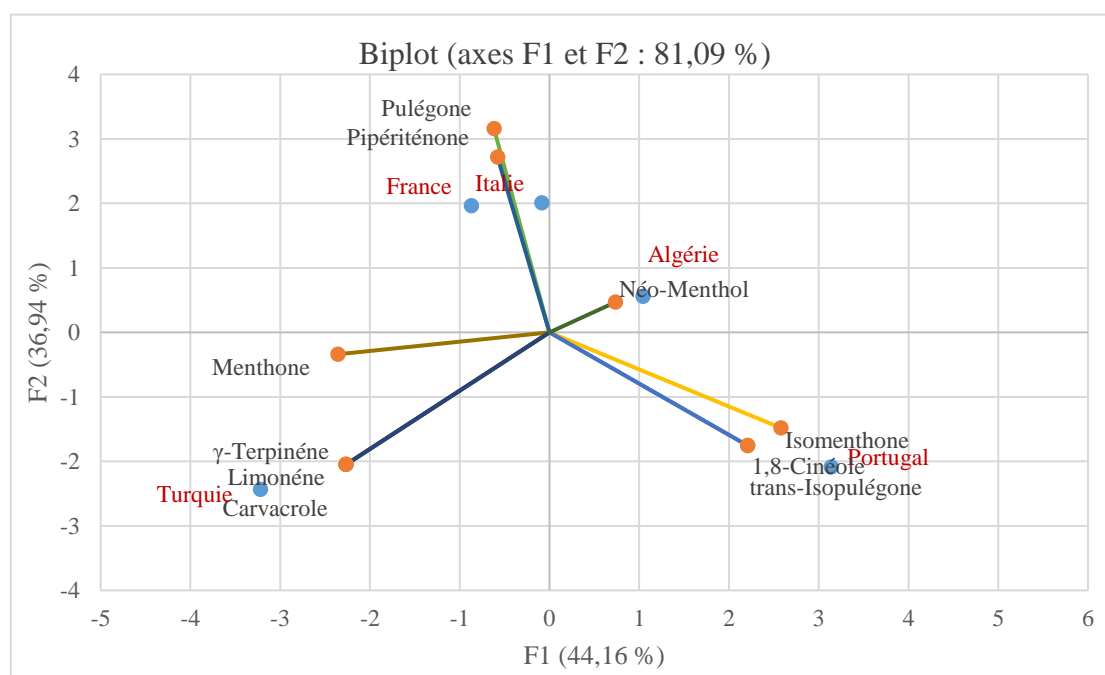


Figure 4. Analyse en composantes principales de l'huile essentielle *Satureja Calamintha* des pays traités.

I.3. *Ammoides verticillata*

I.3.1. Description botanique :

Actuellement, l'espèce endémique *Ammoides verticillata* est en voie de dégradation intensive, la cueillette et le prélèvement de manière anarchique par les herboristes et la population autochtone sans le respect des normes écologiques, engendre une régression de l'espèce voire même sa disparition dans certaines zones, c'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à l'étude de cette espèce afin de la protéger et de la préserver.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

Ammoides verticillata dénommée populairement Nounkha dérive du nom perse « nankhah » (Nan et khah signifiant respectivement pain et gout), issue de son utilisation comme aromate dans le pain en Iran.[27] Originnaire du nord d’Afrique, d’Asie et du bassin méditerranéen, cette plante annuelle et spontanée est cultivée en Egypte, Iran et l’Inde.

En Algérie, c’est une plante assez répandue, on la trouve dans les champs, les forêts ainsi que les montagnes.[28] Le genre *Ammoides* appartient à la famille des apiécées et comprend deux espèces :

- Plante annuelle : *Ammoides verticillata*
- Plante bisannuelle : *Ammoides atlantica*

Nûnkha est une plante fortement aromatique et piquante, balsamique et persistante, l’odorat est très agréable, intense et diffusible.[29]



Figure 5. *Ammoides verticillata*.

I.3.2. Usage traditionnel :

Les vertus d’*Ammoides verticillata* sont connues depuis les plus anciennes civilisations dans la phytothérapie et médecine traditionnelle local. De ce fait une enquête thérapeutique a été réalisée auprès des herboristes et la population autochtone de la région de Tlemcen. Les informations récoltées ont montré que cette espèce renferme des usages culinaires et beaucoup plus thérapeutiques. Ces informations sont résumées dans le tableau suivant [29] :

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

Tableau 1 : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur l'espèce *Ammoides verticillata* [29]

Parties utilisées	Indication
Feuilles et fleurs	Condiment culinaire
Feuilles	- Irritation thermique - Abscès, furoncle
Racines	- Diarrhée - Diurétique
Plante entière	- Fièvre- Rhume- Grippe - Maladies broncho-pulmonaires - Affections rénales - Asthme- sinusite - Douleur gastrique - Céphalée- migraine

I.3.3. Travaux antérieurs « Composition chimique » :

La recherche bibliographique relative à l'huile essentielle de cette plante a affiché que l'huile de la région de Tlemcen est caractérisée par le thymol, P-cymène et l'alcool de cumin[30-32], l'huile essentielle de Ain Temouchent par le thymol [33], alors que celle de la région d'Oran par le carvacrole [34].

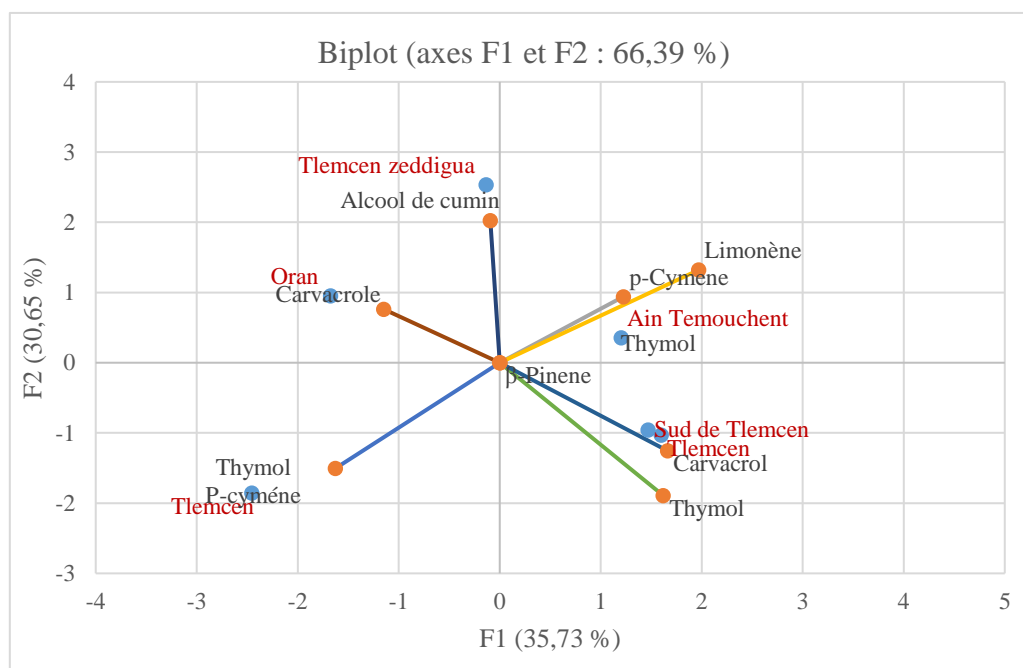


Figure 6. Analyse en composantes principales de l'huile essentielle *Ammoides verticillata* des pays traités.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

I.4. Les huiles essentielles

I.4.1. Introduction

Près de 80% de la population se guérit par les plantes médicinales.[35] Ces plantes constituent un réservoir immense des composés médicinaux potentiels issus des sources naturels. En effet, ces molécules qui font partie des constituants du métabolisme primaire et secondaire présentent une grande diversité de structure, de rôle et activités biologiques que l'on appelle principes actifs.[36] Ces principes présentent des propriétés thérapeutiques médicamenteuses par conséquent elle ont un important intérêt économique suite aux multiples usages : industrie pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaires, condimentaires et hygiéniques.[37, 38]

En effet, ces plantes produisent des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon : l'origine, le pays, la nature du sol et le climat, avec un rendement variable. De plus ces huiles peuvent contenir des centaines de molécules biochimiques différentes, d'un principe actif spécifique, ce qui explique la polyvalence de leurs actions [39] comme exemples :

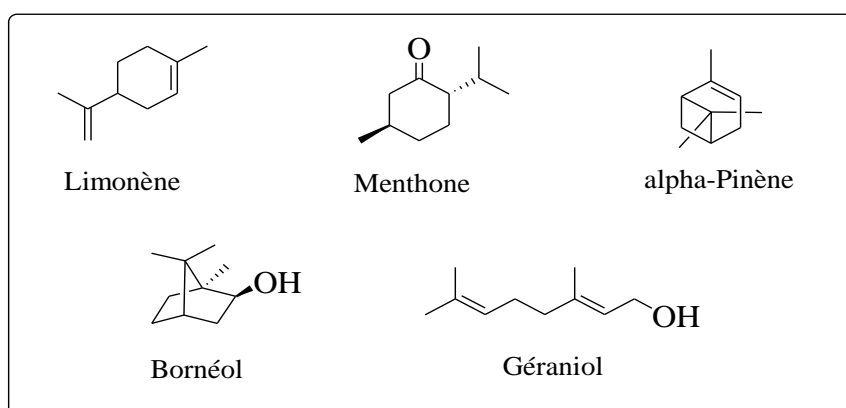


Figure 7. Quelques exemples des composantes des huiles essentielles.

I.4.2. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier en fonction du stade de croissance, du climat et du patrimoine génétique de l'espèce.[40] Ainsi, des variations qualitatives et quantitatives importantes dans la composition chimique des huiles essentielles de certaines espèces ont été révélées. Le patrimoine génétique du végétal joue un rôle déterminant dans la composition chimique de l'huile essentielle d'une espèce et les phénomènes de mutations, aberrations chromosomiques ou encore de brassage génétique à la suite d'un croisement entre deux espèces différentes sont autant des facteurs de variation.

CHAPITRE I : Description botanique et chimique des trois plantes

Le rayonnement solaire influence la composition chimique des huiles essentielles préparées à partir des végétaux sous-exposés. Ainsi, l'huile essentielle de menthe poivrée est majoritairement constituée de menthofurane lorsque la période de l'ensoleillement est brève alors qu'elle est dominée par le menthol dès que la période du rayonnement s'allonge. Enfin, l'altitude du lieu de récolte intervient en modifiant la production d'esters dans l'huile essentielle de lavande vraie.[41]

I.5. Analyse des huiles essentielles

I.5.1. Chromatographie en phase gazeuse CPG et CPG-SM

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode analytique chromatographique efficace, qui fournit d'excellentes séparations des mélanges quelque peu complexes dans un laps de temps raisonnable. Son principal inconvénient c'est qu'elle ne convient pas à tous les mélanges, car l'analyse dépend toujours de la volatilité et de la stabilité thermique des molécules étudiées.

Cependant, la CPG est l'outil de choix pour l'étude et le contrôle de la qualité des constituants volatils d'un mélange complexe. D'autre part, la CPG permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. C'est une technique d'analyse quantitative qui fournit d'une part, le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé et qualitative sur la base des temps de rétention d'autre part.[42]

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge des différents constituants d'un mélange complexe.[43]

I.5.2. Identifications des constituants des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est réalisée d'une manière générale par deux types d'analyse. La CPG et la CPG/SM qui permet d'obtenir, respectivement les indices de rétention et les spectres de masse des divers constituants et qui à l'aide d'un logiciel sont comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, dont une élaborée au laboratoire CPN de Corse et les autres commerciales.[44, 45]

I.5.3. Les activités antioxydantes des huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites à partir des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité par la diversité et la multiplicité de leurs activités via la structure des substances bioactifs contenues dans ces espèces et qui leur confèrent les propriétés pharmacologiques suivantes : antioxydantes, antifongiques, antibactériennes.[46] Les antioxydants sont des substances capables d'inhiber le processus d'oxydation, par conséquent protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif et ainsi réguler l'équilibre redox cellulaire.[47] Parmi les huiles essentielles possédant une forte activité antiradicalaire on peut citer : *Ammoides verticillata*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*...etc., de même, les antioxydants les plus connus sont : la vitamine C, la vitamine E et le B-carotène. L'activité antioxydante peut être primaire (directe) ou préventive (indirecte). Les antioxydants à action directe se font soit par transfert d'atome d'hydrogène ou soit par transfert d'électron afin d'inhiber la génération des radicaux et empêcher la destruction des structures biologiques.[48] Par contre les antioxydants à action indirecte sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirectes comme exemple : la réduction d'oxygène.[49]

Les huiles essentielles ont été attribuées à de bonnes propriétés antioxydantes, qui peuvent être exploitées pour protéger d'autres matériaux, tels que les aliments de la rancidité.[50] Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont dues à la capacité inhérente de certains de leurs composants, en particulier les phénols, à arrêter ou retarder l'oxydation aérobie de la matière organique, bien que la procédure par laquelle l'huile soit obtenue à partir de la matière première (distillation) limite la teneur en composés phénoliques dans la matrice finale car beaucoup de ces composés sont non volatils. Cependant, il existe des huiles essentielles non phénoliques qui expriment un comportement antioxydant, dû à la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et d'autres constituants volatils (par exemple, des composants contenant du soufre comme l'ail). La recherche d'antioxydants naturels avec la vertu d'être non toxique a donné lieu à un grand nombre d'études sur le potentiel antioxydant des huiles essentielles. Ceci est particulièrement pertinent parce que la plupart des antioxydants synthétiques courants (comme l'hydroxy anisole butyle (BHA) ou le butylhydroxytoluène (BHT)) sont soupçonnés d'être potentiellement dangereux pour la santé humaine.[51, 52]

Au cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche d'antioxydants naturels. Les propriétés antioxydantes de nombreuses herbes et épices ont été signalées pour être efficace à cet égard, notamment les espèces appartenant à la famille des Lamiaceae qui possèdent une activité antioxydante appréciable.[53]

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles des espèces étudiées sont très aromatiques. Leurs caractères organoleptiques sont déterminés par des tests olfactifs et reportés dans le tableau 2 :

Tableau 2. Caractéristiques organoleptiques des différentes plantes étudiées.

Huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur
<i>A. verticillata</i>	Jaune	Liquide huileux	Forte et épicée
<i>S. officinalis</i>	Incolore	Liquide limpide	Camphré et Epicée
<i>C. nepeta</i>	Jaune pale	Liquide limpide	Aromatique et fraîche

II.2. Composition chimique des parties aériennes des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta*

La composition chimique des constituants volatils des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta* a été étudiée.

Le matériel végétal des trois plantes a été récolté en début de floraison dans la région de Tlemcen où elle pousse en abondance. Les informations concernant les habitats des échantillons (lieux de récolte, coordonnées GPS, altitudes) ainsi que les rendements en huile essentielle sont représentées dans la Figure 8.

Echantillons	Rendement %	Localités	Coordonnées GPS	Altitude (m)
<i>A. verticillata</i>	2.69	Ain fettouh (Ain-Ghoraba)	34° 42' 50" N 1° 23' 21" O	1362
<i>C. nepeta</i>	0.53		34° 51' 59" N	
<i>S. officinalis</i>	0.82	Parc national	1° 19' 10" O	1023




Figure 8. Lieux de récoltes, répartition géographique et rendements en huiles essentielles d'*A. verticillata*, *C. nepeta* et *S. officinalis*

II.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d'*A. verticillata*

Dans cette partie, nous présentons les résultats de la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. verticillata*, préparée à partir du végétal récolté au mois de décembre 2017, au niveau de la région de Ain Ghoraba de la wilaya de Tlemcen.

CHAPITRE II : Résultats et discussions

Le matériel végétal a été hydrodistillé durant 5 heures dans un appareillage du type Clevenger. L'huile extraite de couleur jaune, représente un taux de 2.7% par rapport à la masse du végétal frais.

L'huile essentielle des parties aériennes a été analysée par CPG et CPG/SM. L'analyse a permis l'identification de 9 composés ; 8 monoterpènes et 1 sesquiterpènes (Tableau 3), représentant 91.2% de la composition chimique totale. L'identification des constituants a été établie sur la base des bibliothèques « Arômes » propres au laboratoire de l'université de Corse (Tableau 3).

L'huile essentielle des parties aériennes a été principalement constituée de composés monoterpéniques représentant plus de 90 % de la composition chimique. Les composés sesquiterpéniques ont été représentés par de très faible pourcentages. Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la première classe de l'huile des parties aériennes, représentés par le p-cymène (18.5%), le limonène (12.6%) et le γ -terpinène (13.5%). La deuxième classe de cette huile est les monoterpènes oxygénés, constituée principalement par la composante du thymol (43.7%). (Tableau 3).

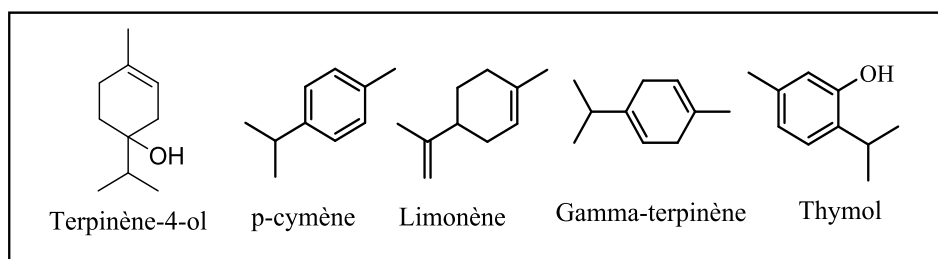


Figure 9. Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *A. verticillata*.

Par rapport aux études rapportées précédemment dans la littérature, la composition chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata* de la région de Ain fettouh a été identique à celle de l'ouest algérien. Les principaux composants de l'huile essentielle étaient le thymol (51,6%), le limonène (18,2%), le γ -terpinène (11,7%) et le p-cymène (10,4%).[54]

II.2.2. Fractionnement et isolement du thymol de l'huile essentielle d'*A. verticillata*

L'huile essentielle d'*A. verticillata* est reconnue pour ses deux chémotypes : « carvacrole » et « thymol ». Afin de confirmer le chémotype de l'huile essentielle de la pépinière d'Ain fettouh de la région de Tlemcen, si c'est une huile à carvacrole ou à thymol ? Nous avons soumis 1g de l'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte à gel de silice fine avec du pentane et du pentane/éther d'éthylque comme éluant. Le schéma du fractionnement est donné sur la figure 10.

CHAPITRE II : Résultats et discussions

Le fractionnement a produit 9 fractions, une fraction hydrocarbonée avec un pourcentage de 45.5% et 8 fractions oxygénés, parmi lesquelles, nous avons plus particulièrement retenu la fraction F1.2 qui contenait notre composé à plus de 5% (figure 10). L'analyse de la fraction selon la séquence habituelle CPG a permis d'identifier par comparaison aux temps de rétention de l'étalon pur, le thymol avec un temps de rétention de 14.4 mn. De là, on constate que l'huile essentielle d'*A. verticillata* étudiée est une huile a « Thymol ».

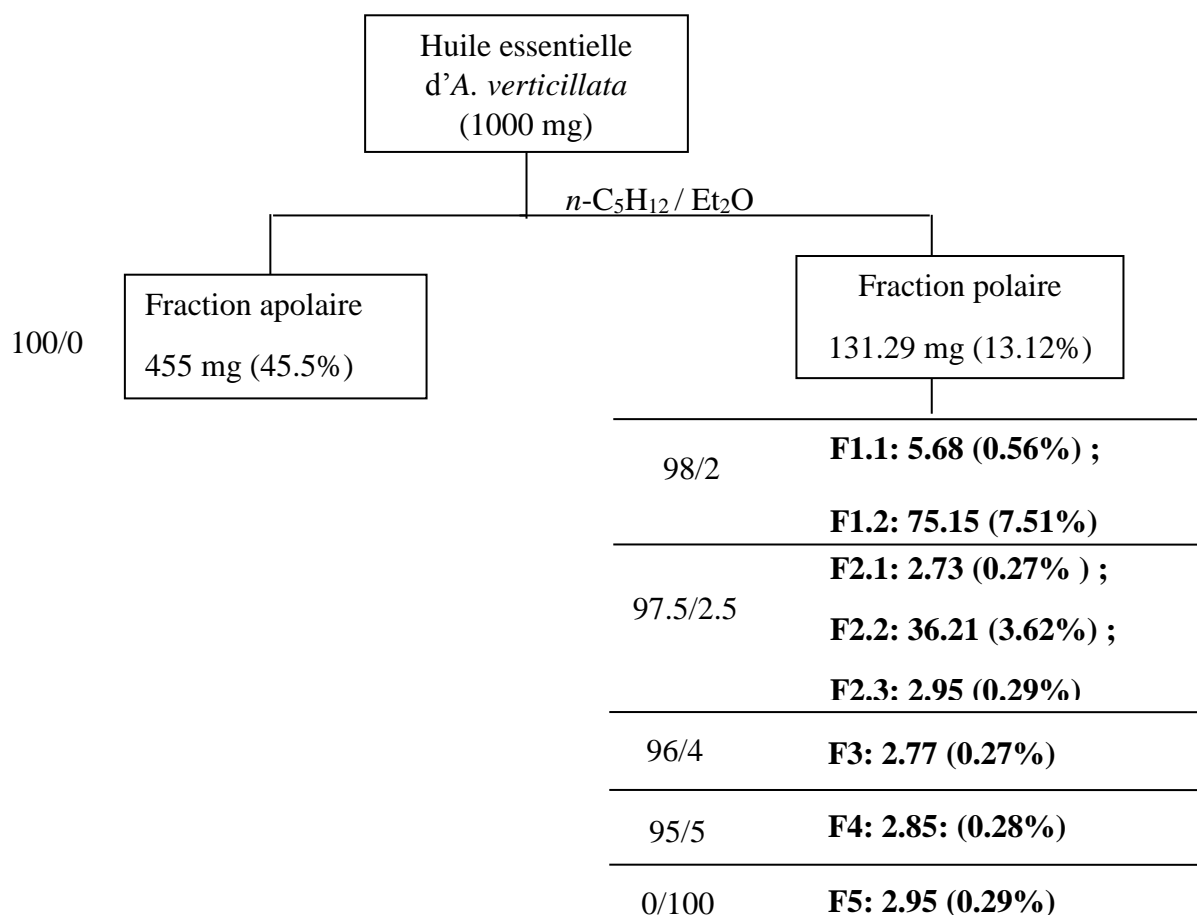


Figure 10. Schéma du fractionnement de l'huile d'*Ammoides verticillata*.

II.3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. nepeta*

Les parties aériennes de *C. nepeta* ont été récoltées au mois de décembre 2017 au niveau de la région de Ain Ghoraba de la wilaya de Tlemcen. Elles ont été hydrodistillées durant 5 heures dans un appareillage du type Clevenger produisant une huile de couleur jaune pâle avec un rendement de 0.53 % par rapport à la masse du végétal frais. L'huile essentielle de la partie aérienne de *C. nepeta* est constituée principalement par 18 composés, représentant 92,6% de la composition totale. L'identification des composants a été effectuée en comparant leurs indices de rétention et les spectres de masse avec ceux de la bibliothèque "Arômes" de Corse (Tableau 3). Cette huile essentielle est constituée majoritairement de monoterpènes oxygénés (85.6%),

CHAPITRE II : Résultats et discussions

accompagnés relativement de plus petites quantités de monoterpènes hydrocarbonés (3.8%) et des sesquiterpènes hydrocarbonés (3.2%). Cependant, les sesquiterpènes oxygénés sont complètement absents.

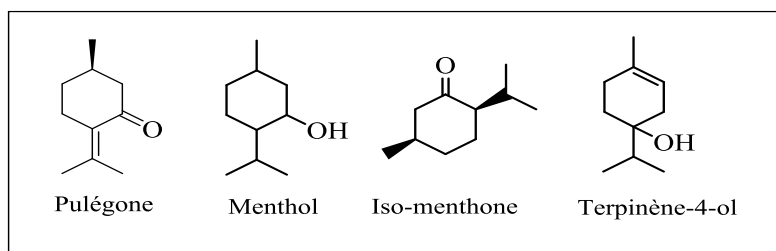


Figure 11. Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *C. nepeta*.

Tableau 3 : composition chimique de la partie aérienne des huiles essentielles de *A. verticillata* et *C. nepeta* de l'ouest Algérien.

No. ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Essential oils		Identification ^e
					<i>A. verticillata</i>	<i>C. nepeta</i>	
1	α-Pinène	931	932	1023	0,8	0,8	RI, MS
2	Camphène	943	944	1066	-	0,9	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	0,2	0,3	RI, MS
4	β-Pinène	970	972	1108	-	0,6	RI, MS
5	Myrcène	976	982	1159	0,7	-	RI, MS
6	p-Cymène	1010	1012	1259	18,5	-	RI, MS
7	Limonène	1020	1021	1195	12,6	-	RI, MS
8	(Z)-β-Ocimène	1024	1025	1225	-	1,1	RI, MS
9	(E)-β-Ocimène	1034	1036	1241	-	0,1	RI, MS
10	γ-Terpinène	1047	1049	1237	13,5	-	RI, MS
11	Linalol	1078	1075	1280	-	-	RI, MS
12	Iso-Menthone	1143	1142	1490	-	4,5	RI, MS
13	Néo-Menthol	1156	1157	1637	-	0,6	RI, MS
14	Terpinène-4-ol	1161	1162	1583	1,1	2,3	RI, MS
15	Menthol	1164	1163	1629	-	5,2	RI, MS
16	Iso-Menthol	1174	1173	1660	-	0,1	RI, MS
17	Linalyl acétate	1179	1172	1689	-	-	RI, MS
18	Pulégone	1213	1216	1640	-	70,4	RI, MS
19	Thymol	2165	1266	2167	43,7	-	RI, MS
20	Piperiténone oxyde	1333	1335	1945	-	2,5	RI, MS
21	E-β-Caryophyllène	1424	1418	1583	-	1,5	RI, MS
22	α-Humulène	1456	1456	1665	0,1	0,1	RI, MS
23	γ-Muuroène	1471	1469	1679	tr	0,8	RI, MS
24	Germacrène D	1480	1474	1692	-	0,5	RI, MS
25	α-Muuroène	1496	1492	1709	-	0,3	RI, MS
26	γ-Cadinène	1507	1506	1750	-	-	RI, MS
27	Spathulénol	1564	1568	2103	-	-	RI, MS
28	Oxyde de caryophyllène	1578	1580	1980	-	-	RI, MS
Identification %					91,2	92,6	
Monoterpènes hydrocarbonés					46,3	3,8	
Sesquiterpène hydrocarbonés					0,1	3,2	
Monoterpènes oxygénés					44,8	85,6	
Sesquiterpènes oxygénés					-	-	

CHAPITRE II : Résultats et discussions

La principale composante de cette plante est la pulégone (70.4%), suivie par des quantités appréciables de menthol (5.2%), iso-menthone (4.5%), Piperitenone oxide (2.5%) et le terpinène-4-ol (2.3%) (Tableau 3). Les travaux antérieurs réalisés sur la composition chimique des huiles essentielles des espèces *Calamintha* ont identifiés la pulégone et le menthone comme composants majeurs. De plus, l'huile essentielle de *Saturaga spinosa* (Tabanca) a identifié le linalol comme composant majeur. *Satureja calamintha ssp nepeta* du Portugal a montré que l'isomenthone, le 1, 8-cinéole et la trans-iso-pulégone constituaient les composants dominants. La composition chimique des échantillons d'huile essentielle de *Calamintha nepeta*, de Corse poussant à l'état sauvage, a permis de déterminer l'existence de trois chémotypes. La moitié des échantillons ont été caractérisés par un chémotype menthone/pulégone et les autres échantillons ont présentés la pulégone, pipéritone et pipéritone oxyde en tant que composants principaux.[23, 55, 56]

II.4. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *S. officinalis*

Les parties aériennes de *S. officinalis* ont été recueillies dans le parc national de Tlemcen, 500 g de matière végétale ont été soumises à une hydrodistillation durant 5h en utilisant un appareil de type Clevenger, donnant ainsi une huile incolore avec un rendement de 0.53 %. Trois principaux composés représentant plus de 50% de la totalité de l'huile essentielle ont été identifiés. Les 03 composants ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des composés purs (étalons). Les principaux constituants identifiés étaient le camphre (20,4%), l' α -thujone (19,6%) et le 1,8-cinéole (12,3%). La composition chimique des huiles essentielles de *S. officinalis* varie considérablement. Les premiers constituants dominants dans de nombreuses huiles essentielles de sauge étudiées sont la cis-thujone (<65,5%), le 1,8-cinéole (<59,0%), le camphre (<45,7%), la trans-thujone (<40,1%), l' α -humulène (33,7%) et le linalol (<35,0%). Certaines huiles de sauge étaient riches en α -pinène (<24,6%), en limonène (<20,3%) et en bornéol (<15,0%).[57, 58]

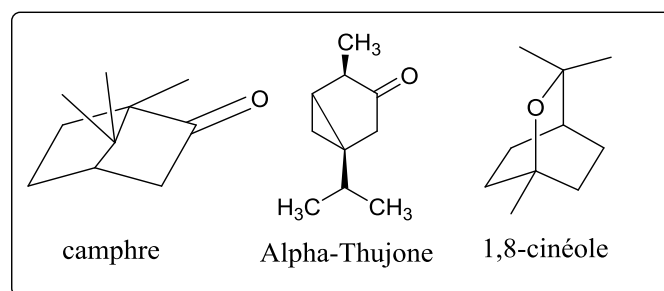


Figure 12. Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *S. officinalis*.

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

III.1. Evaluation des propriétés antioxydantes des trois huiles essentielles : Matrices individuelles et croisées.

III.1.1. Introduction

Les huiles essentielles représentent une alternative « verte » dans les domaines nutritionnel, pharmaceutique et agricole en raison de leurs propriétés antimicrobienne et antioxydantes.[59, 60] Ces dernières années, les huiles essentielles ont gagné en popularité car les consommateurs ont développé une prise de conscience croissante de l'utilisation d'ingrédients naturels, en particulier dans les produits alimentaires, ménagers et cosmétiques.[61] Les huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées en monothérapie mais sont utilisées en association depuis de nombreuses années.[62] Ils sont utilisés pour agir en synergie afin d'améliorer encore leurs effets. L'effet synergique possible produit par la combinaison d'huiles essentielles de plantes a été considéré comme une stratégie efficace pour inhiber ou réduire le processus naturel d'oxydation des aliments.

Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta* possèdent des propriétés biologiques importantes telles que les activités antibactériennes et antioxydantes.[24, 63, 64] À notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'évaluation des propriétés antioxydantes et des mélanges d'huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta*.

III.2. Évaluation de l'activité antioxydante : Matrice individuelle

L'activité antiradicalaire des huiles essentielles étudiées a été mesurer spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette a la couleur jaune mesurable a 517nm. Le tableau ci-dessous exprime les résultats de ce test traduit par le taux d'inhibitions en fonctions des différentes concentrations. Les résultats de l'évolution de cette activité indique qu'elle est dose-dépendante ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le taux d'inhibitions et la concentration des échantillons dans le milieu réactionnel.

Les résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles testés révèlent que l'huile essentielle d'*A. verticillata* est la plus active avec un taux d'inhibition supérieur à (90%) à la concentration de 1mg/mL (Tableau 4).

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

En revanche les huiles essentielles de *S. officinalis* et *C. nepeta* expriment une activité moins importante avec des pourcentages d'inhibitions de (60%) à des concentrations de 70 mg/mL et 90 mg/mL respectivement. Dans ce système, l'huile d'*A. verticillata* a exprimé une activité plus forte que l'antioxydant synthétique BHT (36.7 % à 1mg/mL), néanmoins elle est moins active par rapport à l'acide ascorbique qui a la capacité de réduire le radical a (70%) lorsqu'il est utilisé à des très faibles concentrations 0.2 mg/mL (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des témoins par le test DPPH

Echantillons		Activité antioxydante						
	Concentration (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.2	0.5	1.0	/
<i>A. verticillata</i>	Effet du balayage sur le DPPH (%)	0	2.5	13.6	38.0	75.6	97.3	/
	Concentration (mg/mL)	0	20	33.7	42.2	50.6	59	77
<i>S. officinalis</i>	Effet du balayage sur le DPPH (%)	0	14.1	25.8	29.9	38.5	43.3	60.5
	Concentration (mg/mL)	0	30	40	50	60	70	90
<i>C. nepeta</i>	Effet du balayage sur le DPPH (%)	0	15.5	27.1	33.6	32.3	44.9	60.2
	Concentration (mg/mL)	0.0025	0.005	0.02	0.05	0.1	0.2	/
A. ascorbique	Effet du balayage sur le DPPH (%)	4.5	4.87	15.0	19.8	39.4	74.9	/
	Concentration (mg/mL)	0.2	0.4	0.5	0.8	1.0	2.0	3.0
BHT	Effet du balayage sur le DPPH (%)	24.9	30.3	30.6	33.9	36.7	47.6	56.5

A partir des équations logarithmiques des courbes tracées (voir partie expérimentale), nous avons pu déterminer graphiquement les valeurs des CI_{50} des huiles essentielles ainsi que celles des références. La valeur de la CI_{50} exprime la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre DPPH' dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de la CI_{50} est faible plus l'activité antiradicalaire est remarquable. La figure 13 ci-dessous affiche les résultats des CI_{50} obtenues pour les trois huiles essentielles.

Parmi les trois huiles essentielles, *A. Verticillata* arrive en tête des résultats avec une CI_{50} égale à 0.41mg/mL, suivie de *S. officinalis* avec une valeur de 65.7 mg/mL et finalement *C. nepeta* qui semble être la moins performante avec une CI_{50} de 76.0 mg/mL (Figure 13).

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

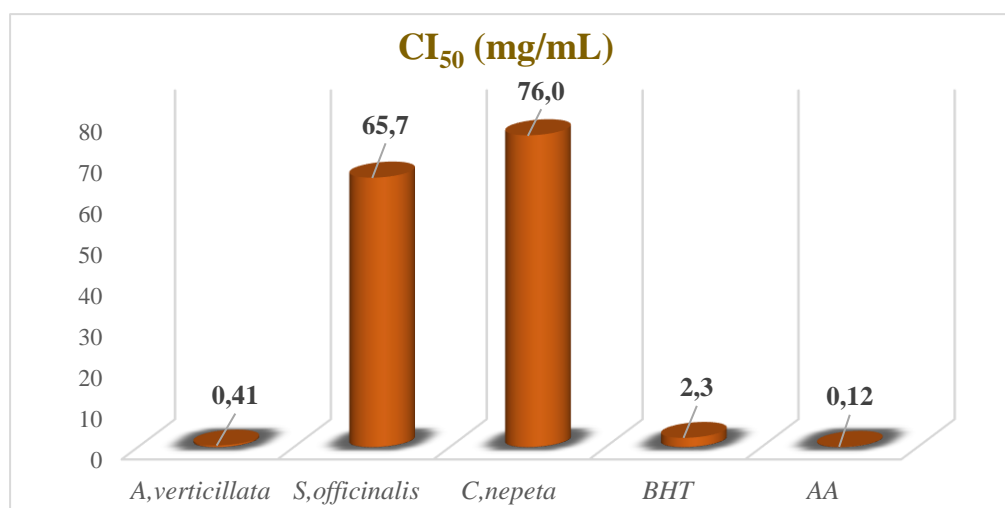


Figure 13. CI₅₀ des huiles essentielles déterminées par la méthode DPPH.

D'après cet histogramme, on remarque que l'huile d'*A. verticillata* est dotée d'un grand pouvoir antioxydant, la concentration de la CI₅₀ est égale à 0.41mg/mL presque 5 fois inférieur à celle du BHT (2.3 mg/mL) mais elle reste plus élevée par rapport à l'acide ascorbique (0.12 mg/mL).

III. 3. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés

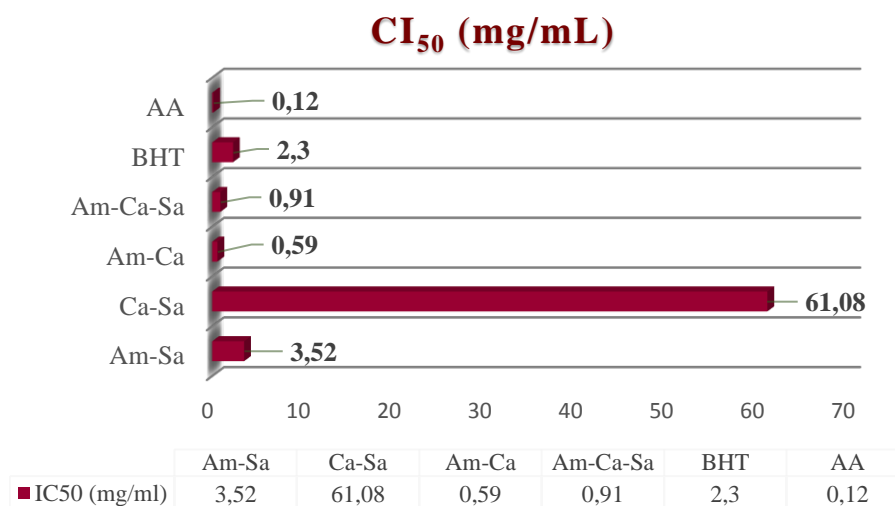
Depuis la découverte des divers effets synergiques et antagonistes et leur importance dans le domaine thérapeutique, les interactions entre les agents biologiquement actifs sont devenues un sujet important pour la recherche scientifique. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant des mélanges des huiles essentielles étudiées par la méthode de piégeage du radical libre DPPH^{*}, afin d'évaluer leur effet synergétique ou antagoniste.

Des activités antioxydantes synergiques ont été observées auprès des mélanges des huiles essentielles. L'huile de *A. verticillata* associée à l'huile de *C. nepeta* présente une activité (CI₅₀ = 0.59 mg/mL) plus importante que son association avec l'huile de *S. officinalis* (CI₅₀ = 3.52 mg/mL). La combinaison des trois huiles essentielles de *A. verticillata*, *S. officinalis* et *C. nepeta* présente aussi une très forte inhibition (CI₅₀ = 0.91 mg/mL) du radical DPPH (Figure 14). Ce résultat signifie que la combinaison des huiles présente un effet synergique entre les différents constituants biologiques mineurs et les constituants majeurs, puisque les huiles essentielles de *S. officinalis* et de *C. nepeta* présentent individuellement de très faibles activités antioxydantes. Les résultats du mélange effectué affichent que l'association *Ammoides-Calamintha* est dotée d'une activité importante, suivie par le mélange des trois huiles, ensuite

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

vient l'association *Ammoides-Salvia* et enfin la plus faible activité est représentée par le mélange *Calamintha-Salvia* via une CI_{50} de 61.1 mg/mL. La comparaison de l'activité de balayage du DPPH[•] des huiles essentielles de *Ammoides-Calamintha* ou *Ammoides-Calamintha-Salvia* avec ceux exprimés par le BHT a montré que les deux mélanges ont des effets antioxydants environ 4 et 2 fois supérieur à celui du BHT, respectivement.

L'acide ascorbique reste en tête de la liste avec une valeur de CI_{50} de 0.12 mg/mL, mais peut être remplacé par l'association *Ammoides-Calamintha* ou *Ammoides-Calamintha-Salvia* qui présentent des valeurs presque semblables : 0.59 mg/mL et 0.91 mg/mL, respectivement.



Am : *A. verticillata*, **Ca** : *C. nepeta*, **Sa** : *S. officinalis*.

Figure 14. CI_{50} des mélanges croisés des huiles essentielles déterminées par la méthode DPPH.

III. 4. Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP :

Dans le test de l'essai du pouvoir réducteur, la présence d'antioxydant dans l'échantillon aurait pour résultat la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} en donnant un électron, la quantité du complexe Fe^{2+} peut ensuite être contrôlée par la mesure de la formation du bleu de Perl à 700 nm, l'augmentation de l'absorbance (DO) indique une augmentation de la capacité réductrice.

L'évaluation de l'activité antioxydante des échantillons est déterminée par rapport à l'acide ascorbique et BHT. Les résultats de l'activité réductrice des huiles essentielles ainsi que les références sont regroupées dans la figure 15, ci-dessous. Le pouvoir réducteur des huiles essentielles est dose dépendante.

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante

De ce fait, à la concentration de 50 mg/mL, le pouvoir réducteur des huiles essentielles de *A. verticillata* et *C. nepeta* affiche une densité optique égal à 3 mais qui reste inférieur à l'antioxydant synthétique BHT (6 mg/mL, DO = 3).

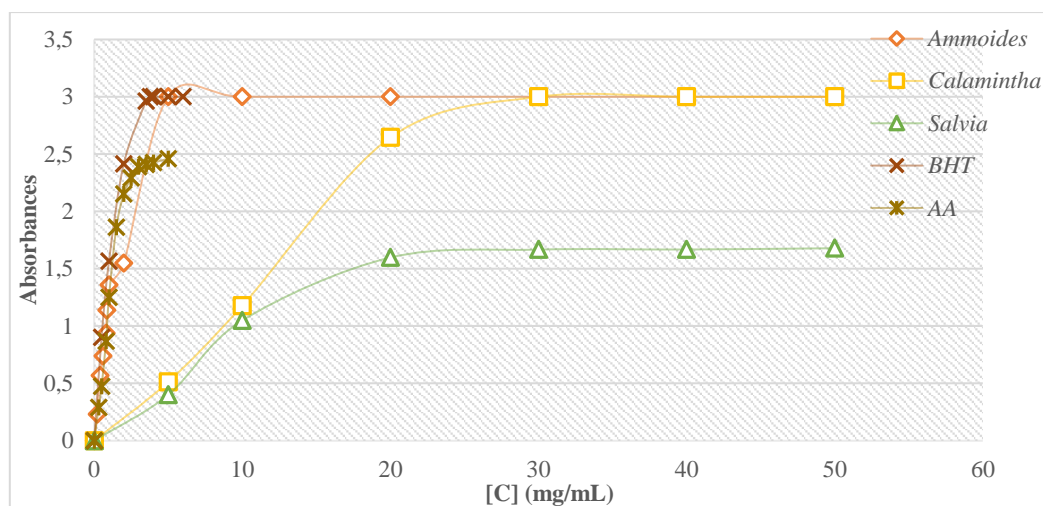


Figure 15. Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP.

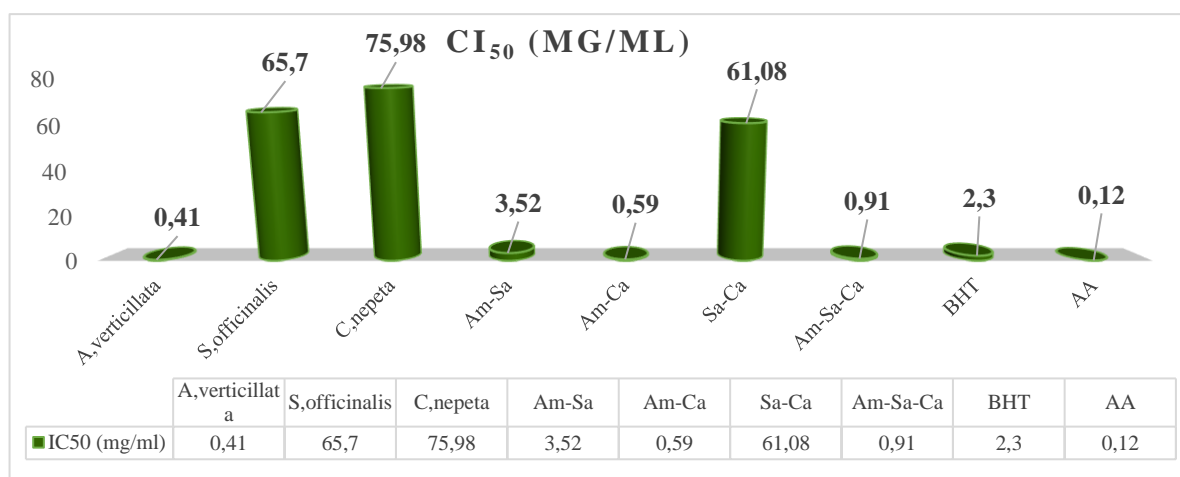
D'autre part, les résultats obtenus montrent que l'huile de *A. verticillata* est nettement supérieure à celle de *S. officinalis* et *C. nepeta*, mais qui reste inférieur aux références (BHT et acide ascorbique). Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport au BHT, nous obtiendrons l'ordre suivant : Acide ascorbique > BHT > *A. verticillata* > *C. nepeta* > *S. officinalis* (Figure 15).

III. 5. Discussion

Comme le montre la figure 14, un effet synergique a été observé pour tous les mélanges d'huiles essentielles. Les mélanges d'huiles essentielles ont été très efficace par rapport aux huiles essentielles individuelles. Les combinaisons d'huiles essentielles de *A. verticillata*/*S. officinalis*, *A. verticillata*/*C. nepeta*, *S. officinalis*/*C. nepeta* et *A. verticillata*, *S. officinalis*, *C. nepeta* ont montré une augmentation significative de l'activité antioxydante par la méthode DPPH (Figure 16).

Ces résultats ont révélé que les combinaisons d'huiles essentielles appliquaient des effets antioxydants synergiques prometteurs en diminuant la concentration inhibitrice demi-maximale. Ces propriétés antioxydantes sont probablement liées à leur profil chimique, en particulier le pourcentage relativement élevé de composés tels que le thymol, le camphre et la pulégone.

CHAPITRE III : Evaluation de l'activité antioxydante



Am : *A. verticillata*, **Sa** : *S. officinalis*, **Ca** : *C. nepeta*.

Figure 16. CI₅₀ de l'ensemble des trois huiles individuelles + mélanges croisés + références déterminées par la méthode DPPH

En effet, le thymol est un monoterpène oxygéné avec une structure phénolique et des propriétés antioxydantes prouvées.[59] Il est considéré que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur potentiel d'oxydo-réduction élevé, ce qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, et des désactivateurs d'oxygène singlet.[65]

La pulégone est une cétone monoterpénique naturelle obtenue à partir des huiles essentielles de diverses plantes telles que *Nepeta cataria* (Catnip) et *Mentha*, qui ont des propriétés antioxydantes.[60, 61] En revanche, l'association du thymol (43,7%) et la pulégone (70,4%) augmente considérablement le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *C. nepeta*. La forte activité antioxydante de *A. verticillata*, et *S. officinalis* pourrait aussi s'expliquer par l'association du thymol (43,7%) et le camphre (20,4%).

Signalons que le mélange des huiles essentielles *S. officinalis* et *C. nepeta* a montré une activité modérée, ce résultat peut s'expliquer par la pulégone dont l'association au camphre, l' α -thujone et le 1,8-cinéole semble peu efficace. Dans la présente étude, l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta*, ainsi que la synergie de leurs combinaisons ont été étudiées. Le développement d'agents de protection naturels en tant qu'alternative au traitement à la réduction de la résistance aux médicaments et aux additifs naturels pour l'alimentation est actuellement à l'honneur. Une interaction synergique intéressante entre ces huiles essentielles a été observée.

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1. Echantillonnage du matériel végétal

IV.1.1. Provenance du matériel végétale et identification

Salvia officinalis, *Calamintha nepeta* et *Ammoides verticillata*, ont été collectées au mois de décembre 2017 au niveau du parc national et la pépinière d'Ain Fettouh de la commune d'Ain Ghoraba, localisée à 28 km de Tlemcen, respectivement. L'identification botanique de ces espèces a été faite par le docteur **kazi-tani choukri** du département d'agronomie Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

IV.2. Préparation des huiles essentielles

IV.2.1. Méthodes d'extractions

L'extraction des huiles essentielles peut être obtenue par différentes méthodes, les principales sont basées sur la volatilité, solubilité, l'expression et l'entraînement à la vapeur. Le choix de la méthode dépend du procédé d'extraction utilisé et de l'objectif souhaité entre autre, la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de même le rendement, applications et usages de l'extrait.[66]

De notre part, nous avons utilisé l'une des principales techniques de productions d'huiles essentielles nommée : hydrodistillation de type Clevenger.

IV.2.2. La technique Hydrodistillation

Hydrodistillation du latin signifie « eau » et « distillare » qui signifie « tomber goutte à goutte ». La distillation des huiles essentielles a été réalisée par la méthode hydrodistillation via un appareil de type Clevenger (figure 17). La matière végétale (200g-500g) est introduite dans un ballon de six (6) litres après avoir été broyée et séchée, avec la quantité d'eau nécessaire à l'immerger. L'ensemble est porté à ébullition durant 4h à 6h. les molécules volatiles et aromatiques captées sont alors condensées et liquéfiées dans un réfrigérant et récupérées sous forme d'huiles essentielles. Cependant à cause de l'eau et de la température du milieu, il peut se produire des réactions chimiques comme les réactions d'hydrolyses, de racémisations, d'isomérisations ou encore d'oxydations, ceux qui peuvent conduire à une dénaturation et discrimination de l'huile essentielle.[67] La conservation des huiles essentielles se fait dans des piluliers en verre stériles teintés et bien fermé, à l'abri de la lumière, l'air, chaleur, et humidité de préférence à l'intérieurs d'un réfrigérateur a une température de 4°C, afin d'éviter toute réaction de dégradation.



Figure 17. Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

IV.2.3. Rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale fraîche ou sèche.[68] Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{MHE}}{\text{MMV}} \times 100$$

Rdt HE : Rendement en huile essentielle (%)

MHE : Masse d'huile essentielle (g)

MMV : Masse de la matière végétale (g)

RDT : rendement, HE : huile essentielle, MHE : masse de l'huile essentielle, MMF : masse de la matière végétale.

IV.3. Caractérisation des huiles essentielles :

IV.3.1. Conditions CPG (LASNABIO)

Les analyses par chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatogramme de marque 6500 Autosystem GC équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composants, d'un injecteur diviseur, et d'une colonne capillaire en silice fondu apolaire de type TRB-5 qui dispose des caractéristiques suivantes (longueur : 30 m, diamètre interne : 0.32mm, épaisseur du film : 0.1 μ m). Les gaz vecteurs sont : l'hydrogène l'azote et l'aire, le débit est de 1 ml/mn avec une pression de colonne de 7psi. La température de l'injecteur est de 300°C et celle du détecteur de 280°C.

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

La température du four est programmée de 60°C à 280°C à raison d'une montée de 10.0 C/min et ensuite maintenue à 250°C pendant 64 mn. Les échantillons ont été injectés via le mode split (1/20), le volume d'injection est de 0.2µl. Pour chacun des composants, les indices de rétention apolaires et polaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalons d'alcane.



Figure 18. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

IV.3.2. Conditions CPG/FID de Corse

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, Etats Unis), équipé d'un injecteur split/splitless, de deux colonnes capillaires Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) et Rtx-WAX (polyéthylène glycol, 60 m x 0,22 mm d.i., épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 µm) et de deux détecteurs à ionisation de flamme.

Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène, la pression en tête de colonne est de 25 psi avec un débit de 1 ml/mn, la température de l'injecteur et des détecteurs est de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 35 mn à 230°C. L'injection se fait en mode split 1/50. Le volume injecté des échantillons est de 0,2 µl. Pour chacun des composés, les indices de rétention polaire et apolaire sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.3.3. Conditions (CPG/SM) de Corse

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL (Walton, MA, Etats Unis), doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film de phase stationnaire : 0,25 μm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplées à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70eV. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité injectée est de 0,2 μL . Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150°C. Les conditions chromatographiques (programmation de température, gaz vecteur, etc.) sont identiques à celles décrites précédemment.

IV.4. Chromatographie sur colonne

Principe :

Le principe de cette méthode est la séparation des constituants d'un mélange, de plus la purification d'un produit donné. Ce système est basé sur les interactions qui existent entre les deux phases : stationnaire (gel de silice) et mobile (éluant) causées par la différence d'affinité des constituants.

Mode opératoire :

Tout d'abord, la colonne est fixée et maintenue de façon verticale par une pince à l'aide d'un statif. Cette colonne frittée est ensuite remplie par le mélange silice-pentane qui constitue la phase stationnaire. Après remplissage, on couvre la colonne et on vaporise de l'acétone afin de dégazer le milieu pour ne pas bloquer la séparation. Cette dernière continue jusqu'à obtention d'un écoulement goutte à goutte à la sortie de la colonne. Lorsqu'on obtient une phase homogène et sans fissures, la colonne est considérée comme prête à l'emploi.

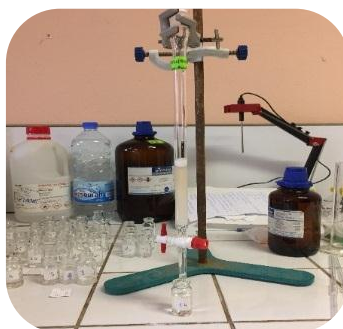


Figure 19. La colonne frittée.

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

Le volume de notre échantillon (*Ammoides verticillata*) introduit est de 1000 μ l. L'élution est effectuée par gradients de polarité dans le but de séparer les hydrocarbonés des oxygénés.

En premier lieu on a utilisé le pentane (moins polaire) pour récupérer la fraction hydrocarbonée, parallèlement on a préparé une CCM (chromatographie sur couche mince) pour la vérification des taches. En seconde lieu, le mélange pentane-éther par gradients de polarité afin de récupérer les fractions oxygénées.

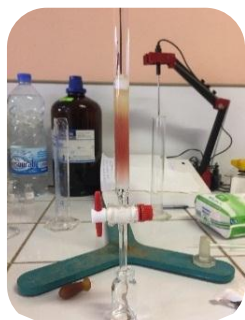


Figure 20. Avant élution des oxygénés



Figure 21. Après élution des oxygénés.

A la fin, toutes les fractions récupérées sont révélées par UV-visible après d'être séparées par CCM (50/50), en vue de rassembler les constituants (taches) qui ont le même rapport frontal afin de les analyser par CPG dans le but de les identifier et déterminer le chémotype de l'huile employée.



Figure 22. Plaques CCM



Figure 23. Fractions récupérées

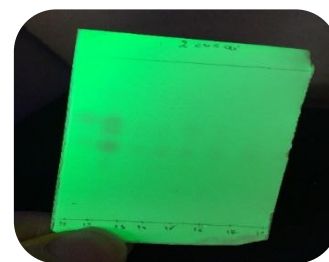


Figure 24. Révélation.

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Satureja calamintha nepeta* a été effectuée par deux techniques chimiques qui sont : le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP.

IV.5.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'évaluation de l'activité antiradicalaire a été effectuée par le test DPPH qui fut l'un des premiers radicaux libres exploités pour étudier la relation structure-activité antioxydante.[69]

Principe : Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre qui présente une absorbance dans le visible à une longueur d'onde comprise entre 515 et 520nm. Le DPPH possède sur l'un des atomes d'azote un électron non apparié, la délocalisation de cette structure empêche sa polymérisation, par conséquent le composé reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante.[70]

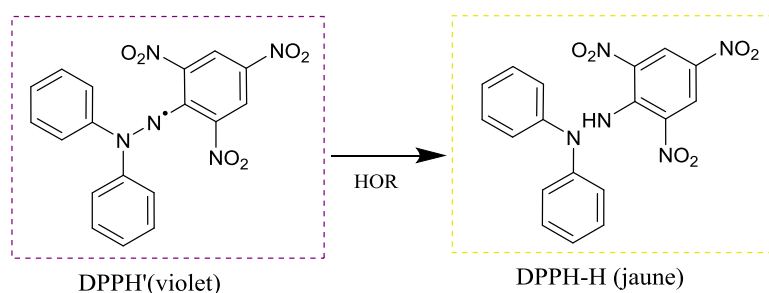


Figure 25. Réaction du radical DPPH• avec un donneur d'hydrogène.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants présents dans le milieu à piéger le radical DPPH• qui est réduit sous la forme diphényl picrylhydrazine DPPH-H (non radicalaire) en acceptant un électron ou un atome d'hydrogène.[71] La réduction du radical est contrôlée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 517nm, mais après sa réduction par un antioxydant l'absorbance diminue.[72] Le DPPH est un radical libre de couleur violet qui vire vers le jaune pâle après sa réduction par une substance donneuse de proton. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents à donner des protons.[73]

Procédure :

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 0.0030g de DPPH dans 100mL de l'éthanol. Cette solution est ensuite emballée dans du papier aluminium et conservée dans le frigo à l'abri de la lumière et l'air afin d'éviter toute dégradation. Les concentrations initiales

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

des échantillons employées sont de 5mg/mL pour *A. verticillata*, 135.08mg/mL pour *S. officinalis* et 100mg/mL pour *C. nepeta*. Différentes concentrations des huiles essentielles comprises entre (0.025-80 mg/mL) ont été étudiée à travers des dilutions ajustées à un volume de 1mL. On prend 1mL de chaque dilution qui est ensuite transférée dans des tubes à hémolyses, on ajoute 1mL de la solution éthanolique de DPPH, le tout est incubée durant 30mn en obscurité à une température ambiante. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 517nm par un spectrophotomètre ultraviolet contre le blanc contenant de l'éthanol pure et le contrôle négatif contenant (1mL d'éthanol + 1mL de DPPH).



Figures 26. Reduction du radical DPPH du violet au jaune.

Procédure des mélanges croisés :

Nous avons utilisé la méthode du Piégeage du radicale libre DPPH pour l'étude des mélanges croisés des trois huiles étudiées. On a utilisé les proportions 1-1 pour une même concentration de chaque mélange. En effet, les concentrations employées sont de 100mg/mL pour l'association *S. officinalis/C. nepeta* et de 5mg/mL pour *A. verticillata/S. officinalis*, *A. verticillata/C. nepeta* idem pour l'association des trois huiles. Le protocole employer est similaire à la matrice individuelle.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{AAR \%} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillons} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

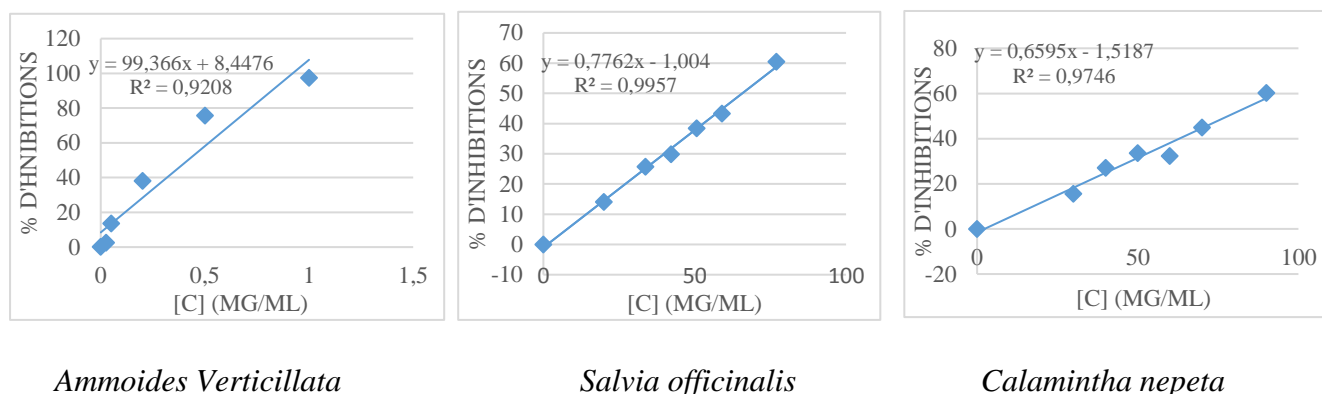
N.B : Dans les deux méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH-FRAP), l'acide ascorbique et le BHT sont employés autant que des références et aux mêmes conditions expérimentales.

Calcul des CI₅₀ :

La concentration inhibitrice de 50% (appeler également EC₅₀- Efficient concentration 50) est défini comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radicale DPPH (DPPH•). Les CI₅₀ sont calculées graphiquement par les regréassions

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

linéaires des graphes des taux d'inhibition : pourcentages d'inhibitions en fonction des différentes concentrations des échantillons testés (figures ci-dessous).



Figures 27. Capacité antioxydante des trois huiles étudiées.

IV.5.2. Réduction du Fer : Frap

Principe :

L'activité réductrice du fer des huiles essentielles est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) de couleur jaune en ion ferreux (Fe^{2+}) de couleur bleu vert présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$.

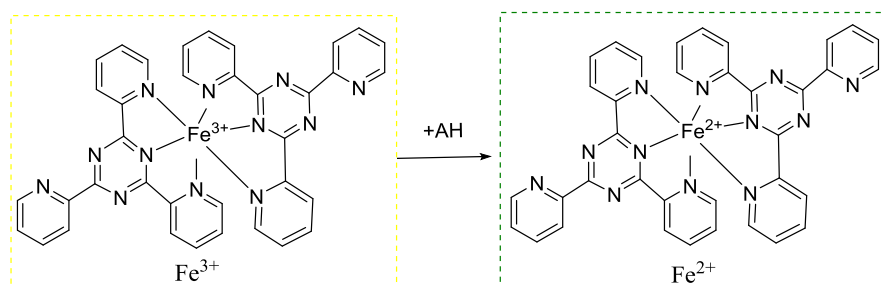


Figure 28. Mécanisme réactionnel du test FRAP

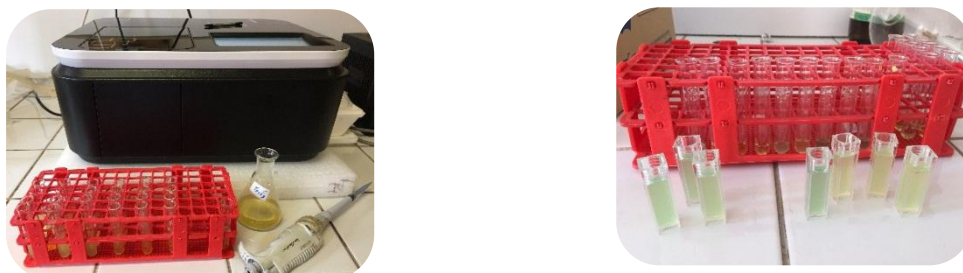
L'intensité de cette coloration qui est mesurée par spectrophotométrie a une longueur d'onde de 700nm est proportionnelle au potentiel réducteur.

Protocole :

Le protocole expérimental est déterminé via la méthode Oyaizu, 1986.[74] Les concentrations initiales employées pour les échantillons sont de 1mg/mL pour *A. verticillata* et 70mg/mL pour *S. officinalis* de même *C. nepeta*. Un millilitre de l'extrait a différentes

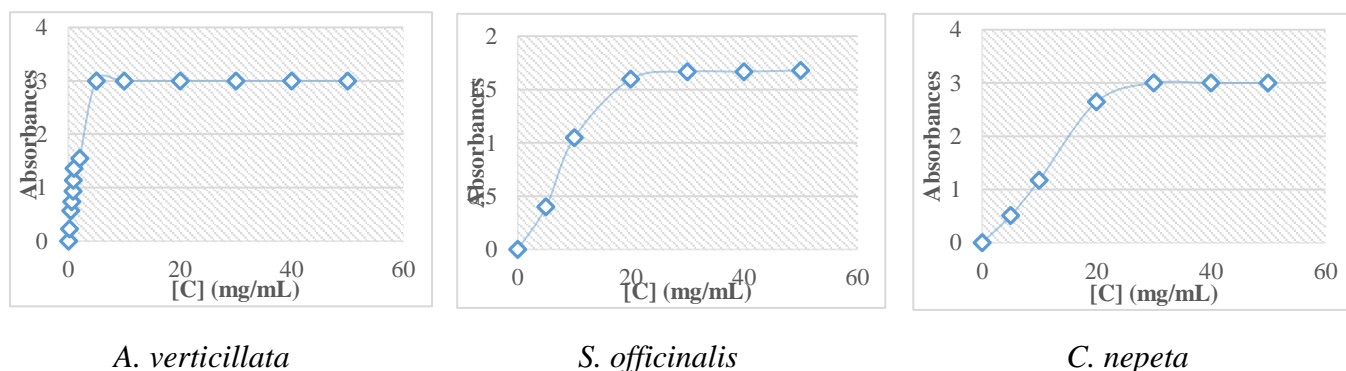
CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

concentrations comprises entre (0.2-50 mg/mL) est mélangé avec 0.5mL d'une solution tampon phosphate 0.2M (pH=6.6) + 0.5mL d'une solution de ferricyanure de potassium (1%). L'ensemble est incubé dans l'étuve a 50C durant 20mn. Ensuite 0.5mL d'acide trichloracétique a 10% est additionner pour stopper la réaction. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10mn. Enfin, 1mL du surnageant de chaque extrait est mélangé à 1mL d'eau distiller et 0.2mL d'une solution de chlorure ferrique (0.1%) fraîchement préparée.



Figures 29. Méthode Frap

La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 700nm contre un blanc semblablement préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distiller afin de calibrer l'appareil (UV-visible) spectrophotomètre. L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés autant que contrôle positif afin de faire une étude comparative. Toutes augmentations des absorbances dans le milieu réactionnel indiquent l'augmentation du pouvoir réducteur.[75]



Figures 30. Absorbances en fonction des différentes concentrations des échantillons de *C. nepeta*, *S. officinalis* et *A. verticillata*

Conclusion Générale

La richesse de la flore Algérienne n'est plus à démontrer. A l'instar des autres zones, l'Ouest algérien et en particulier la région de Tlemcen est caractérisée par une flore particulièrement riche en plantes médicinales.

Dans ce contexte trois plantes ont été proposées par l'association forêt modèle de Tlemcen qui est en collaboration avec le parc national et la direction des forêts afin d'étudier et exploiter ces plantes dans le but de bénéficier de leurs dérivées comme huiles essentielles qui est un domaine pratiquement vierge et peu exploité en Algérie. Notre travail consistait principalement à produire des connaissances scientifiques relatives aux trois (03) plantes avec un objectif de rechercher des voies de valorisation de ces dernières.

Ainsi nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique et biologique des huiles essentielles des trois plantes de la région de Ain Fetouh : *Ammoides verticillata*, *Salvia officinalis* et *Calamintha nepeta*. Le volet chimique de notre travail a démontré que les huiles essentielles des plantes étudiées présentent des molécules très intéressantes et qui sont très convoitées par des secteurs stratégiques : comme la pharmacie et parfumerie.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* est riche en alcools monoterpéniques, le thymol. De même, une chromatographie sur colonne a été réalisée pour la détermination du chémotype de cette huile. Quant à l'huile essentielle de *Calamintha nepeta*, elle s'est avérée particulièrement intéressante d'un point de vue analytique par la présence d'un composé cétonique la pulégone (> 70 %) comme constituant majoritaire. Alors que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* été caractérisée par le camphre, l' α -thujone et le 1,8-cinéole.

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été déterminée par deux méthodes : DPPH et FRAP. Le test DPPH a révélé que : l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* possède un très grand pouvoir antioxydant, en effet elle a été 5 fois supérieur au BHT mais qui reste inférieure à l'acide ascorbique, contrairement aux autres huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *calamintha nepeta* qui présentent des activités antioxydantes moins importantes.

De plus, au cours de ce travail, nous avons réalisé l'activité antioxydante des mélanges croisés par la méthode DPPH. Les résultats obtenus montrent que les combinaisons d'huiles essentielles appliquaient des effets antioxydants synergiques prometteurs tout en diminuant la concentration inhibitrice. En effet l'association *Ammoides-Calamintha* et *Ammoides-Calamintha-Salvia* avec ceux exprimés par rapport au BHT a montré que les deux mélanges ont des effets antioxydants environ 4 et 2 fois supérieur à celui du BHT, respectivement.

CONCLUSION GENERALE

De même, l'association *Calamintha-Salvia* et *Ammoides-Salvia* a montré un effet synergétique. Sachant que ces résultats sont prometteurs et que ces plantes se caractérisent par des molécules particulièrement intéressantes et qui demandent d'être exploitées, nous proposons comme perspectives de :

- La distillation des huiles essentielles de ces espèces, pour les certifier et ou labeliser, dans un but de commercialisation national voire même l'international.
- Développer les agents antioxydants qui peuvent constituer une alternative à certains additifs synthétiques en vue de les employées dans des applications thérapeutiques ou cosmétiques
- Production et commercialisation des produits cosmétiques et pharmaceutiques naturels à base de huiles essentielles.

Références

1. Mattioli, P., et al., Les Commentaires de MP André Matthiolus, medecin senois, sur les six livres de Pedacius Dioscoride Anazarbeen, de la matiere medecinale: traduits de latin en françois, par M. Antoine Du Pinet: et illustrez de nouveau, d'un bon nombre de figures; et augmentez en plus de mille lieux à la dernière édition de l'auteur, tant de plusieurs remedes et diverses sortes de maladies; comme aussi de distillations et de la cognoissance des simples; avec plusieurs tables fort amples, les unes medecinales, les autres des mots & matieres traitées esdits Commentaires. Le tout au profit & commodité des amateurs de la Medecine. 1972.
2. Bailly, A., Dictionnaire grec-français. 1895: Hachette. 643.
3. Markova, M., Genus *Salvia* L. In. *Flora Bulgaricae*, 1989. **9**: p. 442.
4. Fellah, S., M. Romdhane, and M. Abderraba, Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. I cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Societe Algerienne De Chimie*, 2006. **16**(2): p. 193.
5. Maksimović, M., et al., *Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric Salvia species: S. brachyodon Vandas and S. officinalis L.* *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007. **35**(8): p. 473-478.
6. Djerroumi, A. and M. Nacef, *100 plantes médicinales d'Algérie*. 2004: Ed. Palais du livre
7. Radulescu, V., S. Chiliment, and E. Oprea, *Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1027**(1-2): p. 121-126.
8. Durling, N.E., et al., *Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (Salvia officinalis) using ethanol–water mixtures*. *Food Chemistry*, 2007. **101**(4): p. 1417-1424.
9. Zawiślak, G., *Yield and chemical composition of essential oil from Salvia officinalis L. in third year of cultivation*. *Herba Polonica*, 2014. **60**(3): p. 13-22.
10. EL IDRISSE, M. and A. AMECHROUQ, *Chemical composition and biological activity of essential oils of Organum majorana L.(Lamiaceae) and savia officinalis (L).(Lamiaceae) against bruchus lentis (Coleoptera chrysomelidae)*. *Global journal of Pur and Applied Chemistry Research*, Vol. 2 (2), pp. 15-25, 2014, 2014.
11. Tosun, A., et al., *Essential oil composition and anti-inflammatory activity of salvia officinalis l (lamiaceae) in murin macrophages*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014. **13**(6): p. 937-942.
12. Rus, C., et al., *Antifungal activity and chemical composition of Salvia officinalis L. essential oil*. *Research Journal of Agricultural Science*, 2015. **47**(2).
13. Porte, A., R. Godoy, and L. Maia-Porte, *Chemical composition of sage (Salvia officinalis L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil)*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 2013. **15**(3): p. 438-441.
14. Said-Al Ahl, H., et al., *Quality of sage (Salvia officinalis L.) essential oil grown in Egypt*. *International Journal of Plant Science and Ecology*, 2015. **1**(4): p. 119-123.
15. Craft, J.D., P. Satyal, and W.N. Setzer, *The Chemotaxonomy of Common Sage (Salvia officinalis) Based on the Volatile Constituents*. *Medicines*, 2017. **4**(3): p. 47.
16. Khedher, M.R.B., et al., *Chemical composition and biological activities of Salvia officinalis essential oil from Tunisia*. *EXCLI journal*, 2017. **16**: p. 160.
17. Lakhel, H., et al., *Chemical composition and biological activities of the essential oil of Salvia officinalis from Batna (Algeria)*. *Der Pharmacia Lettre*, 2013. **5**(3): p. 310-314.

18. Bougandoura, N. and N. Bendimerad, *Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* Nature & Technology, 2013(9): p. 14.
19. Vârban, D.I., et al., *Research concerning the organic technology for Satureja Hortensis L. Culture.* Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 2010. **66**(2).
20. Quézel, P. and S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, 1963. **2**: p. 788-789.
21. Buronzo, A., *Grand guide des huiles essentielles.* 2008: Hachette Pratique.
22. Lamendin, H., *Soignez votre bouche par les plantes: Remèdes d'hier et d'aujourd'hui.* Vol. 5. 2007: Editions L'Harmattan.
23. Marongiu, B., et al., *Chemical composition and biological assays of essential oils of Calamintha nepeta (L.) Savi subsp. nepeta (Lamiaceae).* Natural product research, 2010. **24**(18): p. 1734-1742.
24. Kerbouche, L., M. Hazzit, and A. Baaliouamer, *Essential oil of Satureja calamintha subsp. nepeta (L.) Briq. from Algeria: Analysis, antimicrobial and antioxidant activities.* Journal of Biologically Active Products from Nature, 2013. **3**(4): p. 266-272.
25. Ristorcelli, D., F. Tomi, and J. Casanova, *Essential oils of Calamintha nepeta subsp. nepeta and subsp. glandulosa from Corsica (France).* Journal of Essential Oil Research, 1996. **8**(4): p. 363-366.
26. Alan, S., M. Kürkçüoğlu, and K.H.C. Baser, *Composition of essential oils of Calamintha nepeta (L.) Savi subsp. nepeta and Calamintha nepeta (L.) Savi subsp. glandulosa (Req.) PW Ball.* Asian Journal of Chemistry, 2011. **23**(6): p. 2357.
27. AISSANI, F., *Analyse sensorielle de la viande bovine additionnée aux huiles essentielles Thymus ciliatus (Zaitra) et Ammoides verticillata (Nunkha).* 2015.
28. Abdelouahid, D.A., Bekhechi, C, *Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'Ammoides Verticillata (Nounkha).* . Biologie et santé 2004. **4**(2): p. 1-10.
29. BEKHECHI, N.B.C., *analyse de Huile essentielle d'amoïide verticillata (nunkha) de la region de tlemcen et etude de son pouvoir microbienne.* 2002, Université Abou Bakr Belkaid
30. Benbelaid, F., et al., *Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant Enterococcus faecalis in both planktonic and biofilm state.* Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2014. **4**(6): p. 463-472.
31. Abdelmounaïm, K., et al., *Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants.* 2013, july. **3**(7): p. 18-24.
32. Tefiani, C., et al., *Ammoides pusilla (Apiaceae) and Thymus munbyanus (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities.* Journal of Essential Oil Research, 2015. **27**(2): p. 131-139.
33. Attou, A., et al., *Chemical composition and biological activities of Ammoides verticillata essential oil from west Algeria.* Phytothérapie, 2017: p. 1-7.
34. Kambouche, N. and D. El-Abed, *Composition of the volatile oil from the aerial parts of Trachyspermum ammi (L.) Sprague from Oran (Algeria).* Journal of Essential Oil Research, 2003. **15**(1): p. 39-40.
35. Karou, D., et al., *Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso.* African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(8): p. 823-828.
36. A., M., *caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques.* 2010, université de Mentouri Constantine.

37. Pharmaciens, O., *Pharmacopée Française, Codex Medicamentarius Gallicus, Codex Français: Monographie, Préparations Homéopathiques*. MDLSPEDL Population, ed., Paris, 1965.
38. Padrini, F. and M. Lucheron, *Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité bien être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétique avec plus de 100 photographies*. 1996: DeVecchi.
39. P, W.J., *Les Huiles Essentielles: Médecine d'Avenir*. 2006, Editions du Dauphin
40. HADDOUCHE, K., *Étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de Thymus ciliatus ssp coloratus*. Université Abou Bakr Belkaid
41. H. Duchaufour, T.R.-A., J. Rakotoarisoa, B. Ramamonjisoa, et Rakotondravao, *Recherche interdisciplinaire pour le développement durable Application à différentes thématiques de territoire et la biodiversité des espaces ruraux malgaches*. 2016.
42. Brattoli, M., et al., *Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds*. Sensors, 2013. **13**(12): p. 16759-16800.
43. *Essential oils - Analysis by gas chromatography on capillary columns- General method* 2015.
44. Adams, R.P. and R. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2005.
45. Joulain, D. and W. König, *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. EB-Verlag, Hamburg. Table I. Chemical constituents of the essential oil of the fresh rhizomes of Zingiber pellitum, 1998.
46. Baratta, M.T., et al., *Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils*. Flavour and fragrance journal, 1998. **13**(4): p. 235-244.
47. Aruoma, O., et al., *An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs*. Food and Chemical Toxicology, 1996. **34**(5): p. 449-456.
48. Kohen, R. and A. Nyska, *Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicologic pathology, 2002. **30**(6): p. 620-650.
49. Madhavi, D.L., S. Deshpande, and D.K. Salunkhe, *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. 1995: CRC Press.
50. Bilia, A.R., et al., *Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014. **2014**.
51. Tiryaki, O. and C. Temur, *The fate of pesticide in the environment*. J. Biol. Environ. Sci, 2010. **4**(10): p. 29-38.
52. Damalas, C.A. and I.G. Eleftherohorinos, *Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators*. International journal of environmental research and public health, 2011. **8**(5): p. 1402-1419.
53. Aruoma, O.I., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease*. Journal of the American oil chemists' society, 1998. **75**(2): p. 199-212.
54. Bekhechi, C., et al., *Isothymol in Ajowan essential oil*. Natural product communications, 2010. **5**(7): p. 1107-1110.
55. Labiod, R., S. Aouadi, and N. Bouhaddouda, *Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Satureja Calamintha nepeta against phytopathogens fungi*. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, 2015. **7**: p. 208-211.
56. Baldovini, N., et al., *Intraspecific variability of the essential oil of Calamintha nepeta from Corsica (France)*. Flavour and fragrance journal, 2000. **15**(1): p. 50-54.

57. Mockutė, D., et al., *The cis-thujone chemotype of Salvia officinalis L. essential oils*. Chemija, 2003. **14**(4): p. 216-220.
58. Dobrynin, V., et al., *ANTI-MICROBIC SUBSTANCES OF SALVIA-OFFICINALIS*. 1976, AKADEMIYA NAUK UZBEKSKOI SSR UL KUIBYSHEVA 15, TASHKENT, UZBEKISTAN. p. 686-687.
59. Ruberto, G. and M.T. Baratta, *Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems*. Food chemistry, 2000. **69**(2): p. 167-174.
60. Jalilzadeh-Amin, G., et al., *Effects of Mentha longifolia essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep*. Journal of Essential Oil Research, 2012. **24**(1): p. 61-69.
61. Turner, G.W. and R. Croteau, *Organization of monoterpene biosynthesis in Mentha. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase*. Plant Physiology, 2004. **136**(4): p. 4215-4227.
62. Miladinović, D.L., et al., *In vitro interactions of Peucedanum officinale essential oil with antibiotics*. Natural product research, 2015. **29**(10): p. 972-975.
63. Al Yousef, S.A., *Antifungal activity of volatiles from lemongrass (Cymbopogon citratus) and peppermint (Mentha piperita) oils against some respiratory pathogenic species of Aspergillus*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2013. **2**(6): p. 261-272.
64. Baldovini, N., et al., *Intraspecific variability of the essential oil of Calamintha nepeta from Corsica (France)*. Flavour and fragrance journal, 2000. **15**(1): p. 15, 50-54.
65. Miguel, M.G., *Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review*. Flavour and Fragrance Journal, 2010. **25**(5): p. 291-312.
66. D, S.A., *Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation*. 2001, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
67. M.L., B., *The isolation of aromatic materials from plant products*. 1995, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA).
68. Carré, P., *Précis de technologie et de chimie industrielle*. 1953: Baillière & Fils. 432.
69. Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
70. OUIBRAHIM, A., et al., *Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de Laurus nobilis L. provenant de la région d'El Kala (Nord-Est Algérien)*. ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 2015. **3**(3): p. 209-216.
71. Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. **76**(2): p. 270-276.
72. Takao, T., et al., *A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994. **58**(10): p. 1780-1783.
73. Sanchez-Moreno, C., *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. Food science and technology international, 2002. **8**(3): p. 121-137.
74. Oyaizu, M., *Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine*. Jpn. J. Nutr., 1986. **44**: p. 307-315.
75. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Analytical biochemistry, 1996. **239**(1): p. 70-76.

