

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives

# MEMOIRE

Présenté par

M<sup>lle</sup> **BEREKSI REGUIG Yasmina Lemya**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER EN CHIMIE**

*Option : Molécules Bioactives : Synthèses et Applications*

---

**Interactions entre l'huile essentielle de *Thymus capitatus*, *Mentha piperita* et**

***Carthamus caeruleus*, et de leur composants majoritaires:**

**Effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante.**

---

Devant le membre de jury

<b>Président :</b>	Nassim DJABOU	MCA	Université de Tlemcen
<b>Examineurs :</b>	Zoheir ARRAR	MCA	Université de Tlemcen
	Chaouki SELLES	MCA	Université de Tlemcen
<b>Directeur de mémoire</b>	Mohammed El Amine Dib	Professeur	Université de Tlemcen

**Le 05 Juin 2016**

# *Dédicaces*

*A mes chers parents*

*A mon frère Yacine*

*A mes chères sœurs*

*A mes nièces Assile et Bahía*

# *REMERCIEMENTS*

*Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*La première personne que nous tenons à remercier est Mr **DIB Mohammed el Amine** d'avoir accepté de nous encadrer et qui a su nous laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de notre recherche, tout en y gardant un *Sil* critique et avisé. Merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux et aussi d'avoir eu la patience de corriger notre mémoire et de nous avoir responsabilisées du début jusqu'à la fin de notre travail.*

*Le présent travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour cela je tiens à remercier son directeur **Pr. Saïd GHALEM** ainsi que le chef de l'équipe des huiles essentielles le **Pr. Boufeldja TABTI** pour toute l'aide et les conseils qu'ils ont apportés.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le **Pr. Belkacem BENGUELLA**. Doyen de la faculté des sciences pour son appui logistique, son aide et précieux conseils dans les moments difficiles de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie le **Pr. Noury BENABADJI** de l'Université de Tlemcen pour sa contribution à l'identification des espèces.*

*Je remercie aussi Monsieur le Pr. **KAJIMA MULENGI**, Directeur du laboratoire Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) de l'Université de Tlemcen pour son aide dans la réalisation des analyses GC et GC/SM. Sans cette aide, une grande partie de ce mémoire n'aurait jamais pu être réalisé.*

*Mes vifs remerciements vont également aux : **Pr. Boufeldja TABTI, Dr. Chouki SELLES, Dr. Zoheir ARRAR, Dr. Meriem MERAD, Dr. Nouria MERAD, Pr. Mourad BENDAHOU et Dr. Nassim DJABOU** pour avoir acceptés de faire partie de mon jury de soutenance.*

*Un grand merci à tous les collègues de la promotion du Master MBSA.*

*Qui me soit permis d'exprimer ma gratitude à mes chers parents qui m'ont soutenue et qui étaient présent avec moi à tout moment, je vous remercie pour votre patience votre bienveillance et vos prières qui m'ont aidée à réaliser ce travail*



## *LISTE DES ABREVIATIONS*

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**FID** : Détecteur à Ionisation de Flamme.

**SM** : Spectrométrie de Masse.

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.

**CPG/SM** : Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse.

***T.capitatus***: *Thymus capitatus*.

***C. caeruleus***: *Carthamus caeruleus*.

***M.piperita***: *Mentha piperita*.

**Réf: Reference.**

**ORAC**: Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène.

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power.

**DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**H.Es** : Huiles Essentielles

**H.E** : Huile Essentielle.

**Ir** : Indice de rétention.

**NI** : Non-identifié

**M** : Région méditerranéenne tout entière.

**MeOH**: Méthanol.

**BHT**: Hydroxytoluène butylé.

**BHA** : hydroxyanisole butylé.

**IC<sub>50</sub>** : Concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH

**DO** : Densité Optique.

**Abs** : Absorbance.

**N** : Nord

**O**: Ouest

# LISTES DES FIGURES

**Figure I.1** : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

**Figure I.2** : Montages d'Hydrodiffusion et Entraînement à la vapeur d'eau.

**Figure I.3** : Représentation schématique et photo de *T. capitatus*.

**Figure I.4** : Représentation schématique et photo de *C. caeruleus*.

**Figure I.5** : Représentation schématique et photo de *Mentha.piperita*.

**Figure II.1** : Région de Ghazaouet.

**Figure II.2** : Région de Beni Snous .

**Figure II.3** : Montage d'hydrodistillation type Clevenger.

**Figure II.4** : Fractionnement des huiles essentielles par colonne chromatographique.

**Figure II.5** : Capacité antioxydante de l'H.E de *Carthamus*.

**Figure III.1** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *T. capitatus* sur colonne a gel de silice.

**Figure III.2** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *C. caeruleus* sur colonne ouverte a gel de silice.

**Figure III.3** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *M. piperita* sur colonn ouverte a gel de silice.

**Figure III.4** : Pouvoir réducteur de l'H.E de *T. capitatus*, *M. piperita*, *C. caeruleus* et de l'acide ascorbique.

**Figure III.8** : Résultats du test de la méthode de FRAP des 3 huiles essentielles.

**Figure III.9** : Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés des H.Es de *T. capitatus*, *C. caeruleus* et *M. piperita* comparés avec celle des H.Es individuelles.

**Figure III.10** : Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés des composés purs comparés avec celle des composés individuels.

**Figure III.11** : Pouvoir réducteur des mélanges croisés de l'H.E de *C. caeruleus*, *T. capitatus* et *M. piperita*.



**Figure III.12** : Résultats du test de la méthode de FRAP des mélanges croisés des H.Es.

**Figure III.13** : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP des mélanges croisés des composés purs.

# *LISTE DES TABLEAUX*

**Tableau I.1**: Position taxonomique de *T. capitatus*.

**Tableau I.2**: Composition chimique de l'huile essentielle de *T. capitatus* dans le monde.

**Tableau I.3**: Position taxonomique de *C. caeruleus*.

**Tableau I.4**: Position taxonomique de *M. piperita*.

**Tableau I.5**: Composition chimique de l'huile essentielle de *M. piperita* dans le monde.

**Tableau III.1**: % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'H.E de

*T. capitatus*, le carvacrol et du BHT à différentes concentrations.

**Tableau III.2**: % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'H.E de

*C. caeruleus*, le carlina oxide et du BHT à différentes concentrations.

**Tableau III.3**: % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'huile de *Mentha*

*piperita*, linalool et le BHT à différentes concentrations.

# SOMMAIRE

<b>Introduction général</b>	1
<b>Chapitre I : Exploitation de la biodiversité</b>	3
I.1 Les huiles essentielles	3
I.1.1 Introduction	3
I.1.2 Définition	3
I.1.3 Caractéristiques conventionnelles	3
I.1.4 Activités biologiques des huiles essentielles	4
I.1.5 Synergisme, additivité et antagonisme biologique : <i>étude bibliographique</i>	4
I.1.6 Les procédés d'extraction des huiles essentielles	6
I.1.6.1 L'hydrodistillation	6
I.1.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau	7
I.1.6.3 l'hydrodiffusion	7
I.1.7 Les méthodes d'identification des constituants d'une huile essentielle	8
I.1.7.1 La Chromatographie Phase Gazeuse CPG	8
I.1.7.2 Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	9
I.2. Description botanique des plantes étudiées	9
I.2.1 <i>Thymus capitatus</i>	9
I.2.1.1 Généralité	9
I.2.1.2 Description et classification systématique	10
I.2.1.3 Usages traditionnels	11
I.2.1.4 L'huile essentielle de <i>T. Capitatus</i>	11
I.2.1.5 Activités biologiques de <i>T. Capitatus</i>	12
I.2.2 <i>Carthamus caeruleus</i>	12
I.2.2.1 Généralité	12
I.2.2.2 Description botanique et classification systématique	13
I.2.2.3 Usages traditionnels	14
I.2.2.4 l'huile essentielle de <i>C. Caeruleus</i>	14
I.2.2.5 Activités biologiques de <i>C. Caeruleus</i>	14
I.2.3 <i>Mentha piperita</i>	14
I.2.3.1 Généralité	14
I.2.3.2: Description et classification systématique	14
I.2.3.3 Usages traditionnels	16
I.2.3.4 L'huile essentielle de <i>M. Piperita</i>	16
I.2.3.4 Activités biologiques de <i>M. Piperita</i>	17
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b>	18
II.1. Provenance du matériel végétal et identification	18
II.2. Procède d'extraction des huiles essentielles	18
II.2.1 Calcul de rendement	19

II.3 Caractérisation des huiles essentielles	19
II.3.1 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	19
II.3.2 Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse	20
II.4 Fractionnement des huiles essentielles par chromatographie sur colonne de silice	20
II.5 Evaluation de l'activité antioxydante	
II.5.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	20
II.5.2 Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	21
<b>Chapitre III : Résultats et discussion</b>	<b>23</b>
III.1 Extraction, fractionnements, purifications et analyses des trois huiles essentielles étudiées	23
III.1.1 <i>Thymus capitatus</i>	23
III.1.1.1 Préparation de l'huile essentielle	23
III.1.1.2 Analyse de l'huile essentielle	23
III.1.1.3 Fractionnement et isolement du carvacrol de l'huile essentielle	24
III.1.2 <i>Carthamus caeruleus</i>	25
III.1.2.1 Préparation de l'huile essentielle	25
III.1.2.2 Analyse de l'huile essentielle	25
III.1.2.3 Fractionnement et isolement de carlina oxide de l'huile essentielle	25
III.1.3 <i>Mentha piperita</i>	28
III.1.3.1 Préparation de l'huile essentielle:	28
III.1.3.3 Fractionnement et isolement de Linalool de l'huile essentielle	29
III.2 Evaluation des propriétés antioxydantes des H.Es et les composants majoritaires des trois plantes médicinales : matrices natives individuelles	29
III.2.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire	30
III.2.1.1 L'huile essentielle de <i>T.capitatus</i> et sa composante majoritaire le carvacrol	31
III.2.1.2 L'huile essentielle de <i>C.caeruleus</i> et sa composante majoritaire le carlina oxide	31
III.2.1.3 L'huile essentielle de <i>M. piperita</i> et sa composante majoritaire le linalool (standard)	33
III.2.2 Méthode de réduction des ions ferreux FRAP	33
III.2.2.1 Matrice individuelle des trois huiles essentielles	33
III.3 Interactions entre les huiles essentielles et leurs composants majoritaires : effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante	35
III.3.1 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH	35
III.3.1.1 Mélanges croisés des huiles essentielles	36
III.3.1.2 Mélanges croisés des composés purs	36
III.3.2 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP	36
III.3.2.1 Mélange croisé des huiles essentielles	37
III.3.2.2 Mélange croisé des composés majoritaires des huiles essentielles	38
<b>Conclusion générale</b>	<b>39</b>



L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations locales pour se soigner, certaines plantes se sont imposées dans le monde médicinaal [1].

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle » [1].

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques. Ces plantes commencent à jouer un rôle majeur dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [2].

Les plantes médicinales et aromatiques sont prometteuses et constituent une grande source d'antioxydants pour l'industrie agroalimentaire. En effet, l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires induit non seulement une diminution de la valeur nutritive de l'aliment, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur et qui peuvent être associés à des risques de cancer chez l'homme.

La présence d'antioxydants dans l'alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels [3].

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (H.E) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. La composition chimique des HE est assez complexe, les composés terpéniques et aromatiques représentant les principaux constituants. On trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature de la fonction chimique du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques. Elles sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif. Mais la découverte des antioxydants synthétiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire [3]. Cette situation a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes

médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

Ce mémoire se fixe comme objectif d'étudier les effets synergiques chimiques et biologiques des huiles essentielles et de leurs composants majoritaires de trois espèces : *Thymus capitatus*, *Mentha piperita* et *Carthamus caeruleus*.

Dans cette optique, nos principaux objectifs se résument comme suit :

- Extraction des huiles essentielles des trois plantes choisies.
- Analyser par CPG et CPG/SM les huiles essentielles.
- Fractionnement, isolation et purification des composés majoritaire.
- Mettre en œuvre les huiles essentielles et les composés majoritaires obtenus par chromatographie sur colonne intervenant ensemble pour jouer un rôle en synergie ou non, par des approches de structure-activité. Plus particulièrement étudier les propriétés antioxydantes des trois huiles essentielles et leurs composés majoritaires.

Ce mémoire comprend trois chapitres :

Le **premier chapitre** porte sur une mise au point bibliographique sur les huiles essentielles et sur les trois espèces retenues pour l'étude.

Le **deuxième chapitre** aborde les méthodes et les conditions opératoires des procédés d'extraction et les techniques d'analyse des huiles essentielles et de leurs fractionnements.

Enfin Le **troisième chapitre** où, nous évoquerons les résultats des analyses chimiques et de fractionnement des trois huiles essentielles. Nous présenterons aussi les résultats préliminaires des tests de l'activité antioxydante réalisés dans cette étude pour une approche des effets en synergie.

## I.1 LES HUILES ESSENTIELLES

### I.1.1 Introduction :

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes dans plusieurs domaines, tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. C'est après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites de plantes commencent à livrer leurs secrets et leurs composants principaux ont été identifiés. Actuellement, plus de 100 000 substances sont connues [4].

### I.1.2 Définition :

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques. Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs [5]. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie [6]. Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

### I.1.3 Caractéristiques conventionnelles :

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions ; mais, la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse [7]. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par les ancêtres. Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ou à des fins industrielles.

Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation de nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle [2].



#### **I.1.4 Activités biologiques des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses [8]. L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires [9].

#### **I.1.5 Synergisme, additivité et antagonisme biologique : étude bibliographique**

Le terme synergie signifie "travailler ensemble" en ce sens que l'effet total du mélange dépasse la somme des effets des composés individuels. L'additivité signifie "travailler l'un plus que l'autre" en ce sens que l'effet total du mélange n'est que la somme des effets des composés individuels. L'antagonisme signifie "travailler l'un contre l'autre". Les plantes, les fruits et les légumes peuvent différer entre eux notamment par la nature des composés bioactifs qu'ils contiennent et par les propriétés antioxydantes de ces composés. Souvent, lorsque ce type d'aliments sont consommés en même temps, la capacité antioxydante totale du mélange peut être modifiée par des interactions synergiques, additives ou antagonistes entre leurs composantes, ce qui peut en modifier l'action physiologique. Sun wang et *al.* (2011) ont montré que lors de la combinaison d'extraits de mûres et de haricots adzuki, des interactions synergiques ont été mises en évidence par différentes techniques d'analyses à savoir : FRAP, DPPH, et ORAC [10]. Cependant, aucun changement de composition n'a semblé se produire dans le mélange.

Les résultats de ces travaux laissent supposer qu'il est important d'exercer un choix stratégique en sélectionnant des aliments ou en privilégiant une alimentation favorisant les synergies et en défavorisant les antagonismes au point de vue de l'activité antioxydante. 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. Les huiles essentielles des plantes médicinales sont des mélanges complexes par leur nature. Etant un mélange cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes. Les plantes produisent des composés phénoliques pour agir comme des molécules de signalisation cellulaire, des antioxydants ou des toxines nuisibles à l'invasion. En étudiant les composants des fruits, l'accent est mis sur les

composés phénoliques en raison de leur capacité antioxydante élevée [ 11,12, 13]. Il y a un écart entre la capacité antioxydante d'un composé phénolique individuel à la concentration dans les fruits et la capacité antioxydante du fruit entier [14, 15] ; car, on a constaté que la capacité antioxydante du fruit entier est supérieur. Les explications possibles à une telle différence peuvent être liées aux composés non identifiés dans le fruit ou à la somme totale de nombreux composés présents dans le fruit à faibles concentrations, ou encore aux interactions synergiques entre les composés phénoliques. Lila et Raskin ont étudié l'additivité ou la potentialisation synergique en termes d'endo-interactions ou interactions au sein de la plante, les quelles peuvent modifier les effets pharmacologiques et en termes d'exo-interactions, interactions entre les composants et/ou les principes actifs non liés au sein de la plante [16]. Le synergisme des antioxydants grâce à des exo-interactions a connu une certaine attention. Yang et Liu ont rapporté que la combinaison d'un extrait de pomme et de quercétine 3- $\beta$ -D-glucoside présente une activité antiproliférative synergique vis-à-vis des cellules cancéreuses du sein [17]. La combinaison d'extraits de soja, de luzerne phytoestrogène et d'extraits d'acérola de cerise, fonctionne en synergie pour inhiber l'oxydation des LDL in vitro [18]. Liao et Yin ont démontré que les combinaisons d'acide alpha-tocophérol et/ou ascorbique avec l'acide caféique, la catéchine, l'épicatéchine, la myricétine, l'acide gallique, la quercétine et la rutine ont une activité antioxydante plus élevée que chacun de ces composés pris isolement pour l'oxydation des lipides [19]. Parker et *al.* ont montré des interactions synergiques entre certains mélanges de rutine, d'acide pcoumarique, d'acide abscissique, d'acide ascorbique et un mélange de sucre en utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la technique ORAC [20]. Le synergisme des antioxydants semble se produire entre une grande variété de composés ou d'extraits ; d'où la nécessité d'une recherche supplémentaire pour explorer les endo-interactions au sein d'un aliment spécifique.

Aujourd'hui, il y a un intérêt à l'élaboration ou à la découverte des agents de conservation naturels et efficaces [21]. Les approches incluent l'utilisation des extraits [22,23], des composés phénoliques [24], ou des mélanges de composés [25] comme des agents antimicrobiens. Comprendre les mécanismes derrière la fonctionnalité des mélanges d'antioxydants potentiels est important pour leur potentiel de développement en tant que conservateurs. De ce qui précède, on constate que les études de la littérature déjà réalisées ont fait l'approche à partir d'un antioxydant individuel, ce qui n'est pas de nature à accéder aux effets bénéfiques des mélanges d'aliments, puisque les constituants bioactifs dans les plantes, légumes ou fruits comestibles sont toujours ingérés sous forme de mélanges naturels [26].

### **I.1.6 Les procédés d'extraction des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont composées par des molécules aromatiques d'origines végétales présentant une très grande diversité de structure. Cependant ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses.

Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante [27].

#### **I.1.6.1 L'hydrodistillation :**

C'est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une H.E, et pour le contrôle de qualités [28]. Le principe correspond à une distillation hétérogène [29]. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau ; l'ensemble est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les cellules végétales s'éclatent et libèrent des molécules odorantes les qu'elles sont entraînées par la vapeur d'eau créées. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs hétérogène sont condensés dans un réfrigèrent et l'H.E se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité.

L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au dessus de l'hydrolat. La distillation peut s'effectuer avec au son recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. A l'échelle du laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la pharmacopée européenne est le « Clevenger » [30]. **(Figure I.1)**



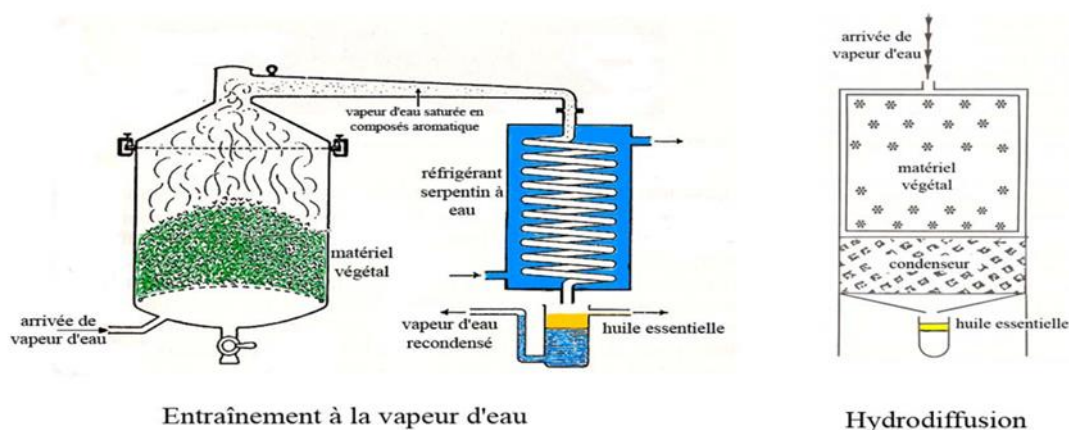
**Figure I.1 :** Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.

### **I.1.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau :**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des H.Es. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'H.E qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'H.E. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [31].

### **I.1.6.3 L'hydrodiffusion :**

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau. Dans le cas de l'hydrodiffusion le flux de la vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. L'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact la matière végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économisations d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de la vapeur [31].



**Figure I.2 :** Montages d' Hydrodiffusion et Entraînement à la vapeur d'eau.

### I.1.7 Les méthodes d'identification des constituants d'une huile essentielle :

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [32]. La technique incontournable pour individualiser les constituants d'un mélange reste la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Son couplage à un détecteur à ionisation de flamme (FID) permet la quantification des constituants et le calcul de leurs indices de retentions.

La CPG est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale, généralement la Spectrométrie de Masse (SM) ou la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier. Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13 permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable.

#### I.1.7.1 La Chromatographie Phase Gazeuse CPG :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [33]. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des H.Es, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du

microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des H.Es.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes [34,35].

Bien que la CPG reste l'une des techniques d'analyses les plus utilisées, l'identification des constituants d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet, le temps de rétention, propre à chaque composé qui dépend des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

### **I.1.7.2 Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :**

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. [36].

Dans le secteur particulier des H.Es, le couplage CPG/SM est aujourd'hui, la technique de référence [37]. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales [38].

## I.2. DESCRIPTION BOTANIQUE DES PLANTES ETUDIEES.

### I.2.1 *Thymus capitatus*

#### I.2.1.1 Généralité :

Les thymus (*Thymus*) sont des plantes basse sous-ligneuse érigées ou prostrées, et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiacées* ou *Labiacées*, qui regroupe un grand nombre d'espèces, sous-espèce et variétés de plantes sauvages [39]. En Algérie, le genre *Thymus* regroupe 12 espèces qui sont : *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus*, *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus lanceolatus*, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus* (L.) [40].

#### I.2.1.2 Description et classification systématique :

C'est un arbrisseau nain à odeur fortement aromatique de 20-50cm de haut, à rameaux dressés à érigés, ligneux, clairs, jeunes blanc feutré, souvent seules les touffes des aisselles feuillues. Feuilles des longues pousses caduques si sécheresse, sessiles, presque triangulaires, linéaires, pointues, 6-12 cm de long, 1-1,8 mm de large, bord  $\pm$  plat,  $\pm$  nu, ciliées à la base, les 2 faces vert-gris ponctués de glandes. Pseudo verticilles en inflorescences denses, Calice 1 mm de long, lèvre supérieure à 3 dents, plus courte qu'inférieure à 2 dents, toutes les dents ciliées, Tube calice, au contraire de toutes les autres espèces de *Thymus*. À 20-22 nervures, aplaties au dos. Corolle rose-pourpre, jusqu'à 1 cm de long, bilabée. Lèvre supérieures à 2 fentes, 4 étamines (Figure I.3) [41].

**Habita:** garrigues, versant secs, sur calcaire.

**Distribution:** M, Portugal, pas en France.



**Figure I.3 :** Représentation schématique et photo de *T. capitatus*.

D'après **Quezel et Santa**, la systématique de *T. capitatus* est la suivante (Tableau I.1) [40] :



**Tableau I.1:** Position taxonomique de *T. capitatus*.

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Angéosperme
Sous embranchement	Eudicots
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsita
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales (Labiales)
Familles	Lamiaceae (Labiacées)
Genres	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>T. capitatus</i>

### I.2.1.3 Usages traditionnels :

*T. capitatus* est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques.

### I.2.1.4 L'huile essentielle de *T. capitatus* :

Etant considérée comme une plante qui se caractérise par sa teneur importante en H.E ( $\geq 1\%$ ), notre recherche bibliographique nous a permis de recenser 14 travaux décrivant la composition chimique de l'huile essentielle de *T. capitatus*. Les travaux réalisés sur la composition chimique de cette H.E ont montrés que le carvacrol était caractérisé comme la substance active principale avec un pourcentage majoritaire qui dépasse les 55% en Algérie, Italie, Maroc et la Tunisie (Tableau I.2). Mais ce composé est aussi présent à une teneur plus faible en Maroc ( $< 20\%$ ). La composition chimique de l'échantillon provenant de la Tunisie est vraiment remarquable par l'absence totale de Carvacrol ; le Thymol (89,06%) étant le constituants majoritaire (Tableau I.2).

**Tableau I.2 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *T. capitatus* dans le monde.

N°	Pays	Années	Réf	% Composés majoritaires
----	------	--------	-----	-------------------------



1	Algérie	2009	[42]	Carvacrol (55,66%), $\gamma$ -terpinène (11,72%), $\beta$ -cymène (7,8%)
2		2013	[43]	Carvacrol (69,9%), P-cymène (12,4%), $\alpha$ -pinène (0,9%)
3	Italie	1991	[44]	Carvacrol(83,6%), $\beta$ -caryophyllene (2,8%), $\alpha$ -elemol (1,4%)
4		2005	[45]	Carvacrol (74-6.64%) et le Thymol (71.53-0.94%)
5		2013	[46]	Carvacrol(81,52%-78,40%), $p$ -cimène (4,98%), $\gamma$ -terpinène (3,13%)
6		2015	[47]	Carvacrol(81.2–14.2%), $\gamma$ -terpinène(34.4–2.6%), $p$ -cymène(22.85.0%)
7	Maroc	2008	[48]	Carvacrol (70,92%), $p$ -cymène (6,34%), $\gamma$ -terpinène (4,92%)
8		2011	[49]	$p$ -cymène (18%), Carvacrol (13,4%), Géranyl acetat (12,2%)
9	Tunisie	2001	[50]	Carvacrol, $p$ -Cymene
10		2004	[51]	Carvacrol (53,71%), $\gamma$ -terpinène (11,66%), P-cymène (10%)
11		2007	[52]	Carvacrol (62-83%), P-cymène (5-17%), $\gamma$ -terpinène (2-14%)
12		2010	[53]	Thymol (89,06%), P-cymène (5,04%), $\gamma$ -terpinène (3,19%)
13		2011	[54]	Carvacrol (69,7%), $\beta$ -caryophyllene (8,5%), $\gamma$ -terpinène (4 ,3%)
14		2013	[55]	Carvacrol (58,66-81,49%), P-cymène (3,83-13,17%), $\gamma$ -terpinène (7,81-3,16%).

### I.2.1.5 Activités biologiques de *T. capitatus*

Les huiles essentielles de thym sont largement utilisées comme agents antiseptiques dans plusieurs domaines pharmaceutiques et comme aromatisants pour de nombreux types de produits alimentaires (Papageorgio, 1980). Les huiles essentielles de plusieurs espèces de thym ont déjà prouvé leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydant [56,57].

Trois travaux ont fait l'objet d'études de l'activité biologique sur l'H.E de *T. capitatus*, ces études ont décelés une activité antioxydante avec une IC<sub>50</sub> supérieure à celle de l'acide ascorbique [42, 49, 52].

## I.2.2 *Carthamus caeruleus*

### I.2.2.1 Généralité :

Le genre botanique *Carthamus* regroupe des plantes presque toutes méditerranéennes de la famille des *Astéracées*, assez proches des chardons. Ce sont des plantes vivaces, le plus souvent très épineuses. Originaire de Moyen-Orient, le mot « carthame » découle du mot arabe « Kurthum » qui signifie « teinte ». Il regroupe 25 espèces [58].

### I.2.2.2 Description botanique et classification systématique :

La carduncelle bleue est une herbe annuelle ou bisannuelle, vivace de 20-60 cm de haut, à poils laineux arachnéens jusqu'à nue, tige érigée, généralement simple, à au moins 10 feuilles ; feuilles alternes, à nombreuse forme, coriaces, brillantes, à courts piquants sur le bord, les inférieures à pétiole, pennipartites, lyrées ou lancéolées, les supérieures à demi engainantes, ovoïdes-lancéolées, grossièrement dentées, fleurs tubulaires, à 5 lobes, bleues. Elle fleurit de mai à Juillet [41].

**Habita:** lieux secs, aime le calcaire.

**Distribution:** M, Europe mérid, sauf Yougoslavie.



**Figure I.4 :** Représentation schématique et photo de *C. caeruleus*.

D'après **Quezel et Santa**, la systématique de *C. caeruleus* est la suivante (**Tableau I.3**) [40] :

**Tableau I.3 :** Position taxonomique de *C. caeruleus*.

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Cynarées
Sous-embranchement	Centaureines
Famille	Astéracées
Sous-famille	Carduoidées
Genre	<i>Carthamus</i>
Espèce	<i>C. Caeruleus</i>

### I.2.2.3 Usages traditionnels :

Les racines de *C. caeruleus* sont utilisées en Algérie, comme cicatrisant contribue à guérir les brûlures, soit sous forme de poudre ou une crème préparée dans le lait et elles sont aussi utilisée contre les inflammations articulaire.

### **I.2.2.4 L'huile essentielle de *C. caeruleus* :**

Les travaux de recherche réalisés sur cette plante en 2012 par Melle Belabbes durant son master ont montré que l'huile essentielle de *C. caeruleus* s'est avérée particulièrement intéressante d'un point de vue analytique par la présence d'un composé phénolique le Benzyl 2-furylacetylene (> 80 %) comme constituant majoritaire de l'H.E des racines [59].

### **I.2.2.5 Activités biologiques de *C. caeruleus* :**

L'étude bibliographique minutieuse menée sur les espèces de *Carthamus*, révèle que l'huile essentielle de *C. caeruleus* a fait l'objet d'une seule étude (mémoire de Belabbes). L'activité antioxydante de H.E a été déterminée par quatre méthodes, CCM, DPPH, FRAP et blanchissement du  $\beta$ -carotène dont les résultats montrent que l'H.E des racines de *Carthamus sp* possède une activité antioxydante dix fois supérieure au témoin (BHT), probablement attribuable au composé majoritaire (**Benzyl 2-furylacetylene**) [59].

## **I.2.3 *Mentha piperita***

### **I.2.3.1 Généralité :**

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, ce sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiacée* ou *Labiacées* qui forment, avec près de 3500 espèces et 8 sous-familles [60]. Ce sont des plantes faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique mais elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie. Les Menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales, à leurs tiges quadrangulaire et des feuilles simple et opposées [61].

### **I.2.3.2: Description et classification systématique :**

La Menthe poivrée (*M. piperita*) est une plante herbacée issue d'une hybridation entre la Menthe aquatique (*M. aquatica*) et la Menthe verte (*M. spicata*) [62]. Cette menthe vivace de 30-90 cm de hauteur ; tiges dressées carré ou ascendante ; feuilles opposées et décussées, simples,

pétiolées, 4 à 10 cm de long, dentelées, pointu ; vert foncé sur la face supérieure, se teignant de nuances, rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, fleurs violacées, cylindrique d'une couleur rose-violet. Elle fleurit de Juillet à septembre [63].



**Figure I.5:** Représentation schématique et photo de *Mentha piperita*.

D'après Quezel et Santa, la systématique de *M. piperita* est la suivante (Tableau I.4) :

**Tableau I.4 :** Position taxonomique de *M. piperita*.

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous classe	Dialypétales
Ordre	<i>Lamiales (Labiales)</i>
Famille	<i>Lamiaceae (Labiacées)</i>
Tribu	<i>Mentheae</i>
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha piperita</i>

### I.2.3.3. Usages traditionnels :

Comme à toutes les menthes, la tradition lui attribue des propriétés aromatiques (toniques, fortifiantes) et des propriétés digestives (combattre les lourdeurs, les ballonnements, les gaz).

#### I.2.3.4 L'huile essentielle de *M. piperita* :

Les travaux réalisés sur la composition chimique de l'H.E de *M. piperita* ont montrés que le menthol était caractérisé comme la substance principale avec un pourcentage majoritaire qui dépasse les 35 % (Tableau I.5).

D'autre chercheurs au Maroc ont trouvé que l'HE de *M. piperita* été caractérisée par un composant majoritaire le linalool avec un pourcentage de (60.72%).

**Tableau I.5** : Composition chimique de l'huile essentielle de *M. piperita* dans le monde.

N°	Pays	Années	Réf	% Composés majoritaires
1	Algérie	2015	[64]	Carvone (5,04%), Limonène (36,37%), $\beta$ -pynène (1,66%)
2	Brésil	2011	[65]	Menthole (42,5%), Menthone (27,4%), 1,8-Cinéole (4,6%)
3	Inde	2012	[66]	Menthole (26,53%), Menthone (25,83%), Méthyleacétate (7,35%)
4		2014	[67]	Menthole (34,82%).
5	Iran	2004	[68]	Menthol(19.76%),Menthan-3-one(19.31%), Menthofuran+Isomenthone (9.12%)
6		2006	[69]	Menthanol (36,24%), Menthone (32,42%)
7		2012	[70]	Menthole (53,28%), Méthylacétate (15,10%), Néomenthole (6,73%)
8		2013	[71]	Menthole (38,33%), Menthone (21,45%), Méthylacétate (12,49%)
9		2014	[72]	Camphane (14,01%), Menthone (13,89%), Menthole (12,37%)
10		2015	[73]	Menthole (36,9%), Menthone (28,8%), Méthylacétate (4,5%)
11		2015	[74]	Néoisomenthole (27,7-30,37%), Isomenthone (23,2-26,4%), 1,8-Cinéole (7,3-7,5%)
12		2015	[75]	Menthole (47,36%), Menthone (12,96%), Menthofurane (7,26%)
13	Maroc	2007	[76]	Linalool (60,72%), Linalylacétate (20,79%), Géraniolle (3,26%)
14		2010	[77]	Menthone (29,01%), Menthole (5,58%), Méthylacétate (3,34%)
15	Turquie	2010	[78]	Menthole (38,06%), Menthone (35,64%), Neomenthole (6,73%)
16		2012	[79]	Menthone (20,15%), Menthole (21,45%), Carvone (10,61%)

#### I.2.3.4 Activités biologiques de *M. piperita* :

La menthe est une plante médicinale aromatique très recherchée par les industries pharmaceutiques, l'aromathérapie, et plusieurs domaines. L'évaluation des propriétés antioxydantes est une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydants. Plusieurs études ont montré que l'huile essentielle de certaines Menthe possède une bonne activité antioxydante comparant à la vitamine C. Il a été prouvé que l'activité antioxydante de *M. pulegium* ( $IC_{50} = 0.57\mu\text{g/ml}$ ) est plus intéressante que d'autres espèces de menthe : *M. piperita* ( $IC_{50} = 13.32\mu\text{g/ml}$ ), *M. spicata* ( $IC_{50} = 87.89 \mu\text{g/ml}$ ), *M. longifolia* ( $IC_{50} = 24.07 \mu\text{g/ml}$ ) et *M. rotundifolia* ( $IC_{50} = 21.71 \mu\text{g/ml}$ ) [80]. Cette différence dans les résultats est probablement due à la diversité de la composition chimique et selon des facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir la région de cultivar et la méthode utilisée dans l'extraction des huiles essentielles.

### II.1. PROVENANCE DU MATERIEL VEGETAL ET IDENTIFICATION :

La récolte des différentes espèces a été effectuée dans la région de Tlemcen, les parties souterraines de *Carthamus caeruleus* et les parties aériennes de *Thymus capitatus* ont été collectées durant le mois d'Avril 2016 dans la région de Beni Snous [1165m, 34°38'N 1°33'O], tandis que les parties aériennes de *Mentha.piperita* ont été collectées durant le mois de Mars 2016 dans la région de Ghazaouet [33m, 35°04'N 1°51'O].



**Figure II.1** : Région de Ghazaouet



**Figure II.2** : Région de Beni Snous

L'identification des espèces végétales a été réalisée au niveau du département de biologie par le laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

### II.2. PROCEDE D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES :

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clevenger (**Figure II.3**), on place 400 g de la matière végétale sèche dans 4 litre d'eau puis on chauffe l'ensemble pendant une durée de 5h. Les H.Es sont conservées dans des flacons de verre ambrés à une température de 4°C. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.





**Figure II.3** : Montage d'hydrodistillation type Clevenger.

- **II.2.1. Calcul de rendement :**

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétale à traiter.

$$\text{Rd}\% = (m1/m0) * 100$$

**Rd** : rendement en huile essentielle

**m1** : masse en gramme d'huile essentielle

**m0** : masse en gramme de la matière végétale

### **II.3. CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES :**

Une fois l'huile obtenue, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse des H.Es est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM).

- **II.3.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composants, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 mx 0,22 mm d.i; épaisseur du film : 0,25 µm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthylsiloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 45 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de



1/50. La quantité d'H.E injectée est de 0,2  $\mu$ L. Pour chacun des composants, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

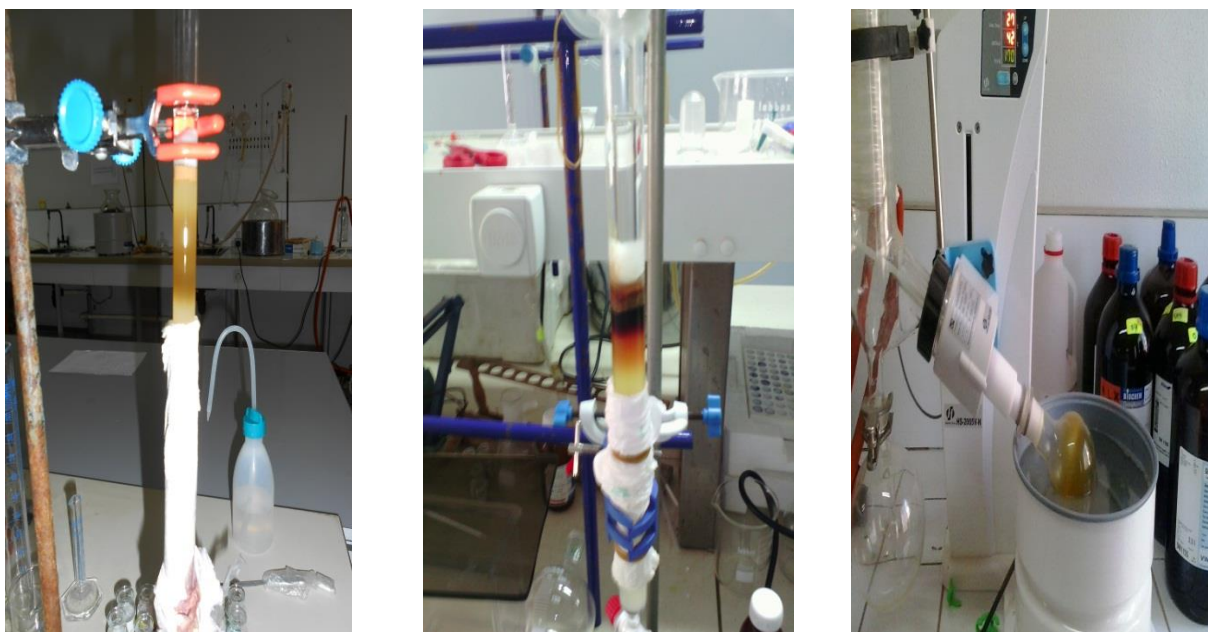
• **II.3.2. Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse :**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 mx 0,22 mm d.i, épaisseur du film : 0,25  $\mu$ m) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température se fait en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 35 mm à 230°C.

L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80.

**II.4. FRACTIONNEMENT DES HUILES ESSENTIELLES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE :**

Le fractionnement des HEs a été réalisé sur une colonne en verre (70 cm de longueur et 2.5 cm de diamètre interne). Le remplissage de la colonne se fait avec de la silice (60 mesh).



**Figure II.4 :** Fractionnement des huiles essentielles par colonne chromatographique

## II.5. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

### II.5.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

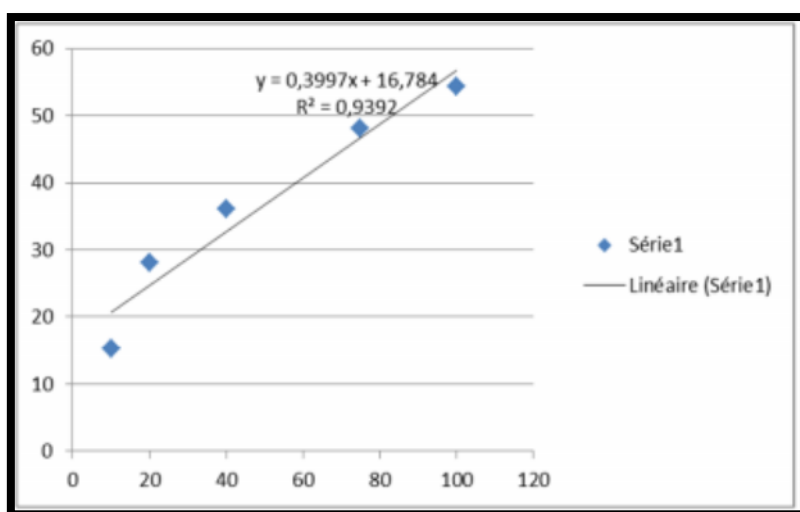
Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picrylhydrazine) de couleur jaune n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance [81]. Selon le protocole décrit par (Ammar et al., 2009) [82], la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100 ml de MeOH. Des solutions à différentes concentrations des H.Es, les composés isolés et les mélanges d'H.Es et des composés isolés ou standard (BHT) sont ajoutés à un volume complémentaire de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

#### Calcul des IC<sub>50</sub>:

Les IC<sub>50</sub> (la concentration des extraits provoquant 50 % d'inhibition), sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées.



**Figure II.5 :** Capacité antioxydante de l'H.E de *Carthamus*.

### **II.5.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :**

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Le protocole expérimental utilisé est celui de Wang et coll (1986), avec une légère modification où : 2,5ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 0,5 ml d'une solution tampon phosphate (pH= 6.6) et 0,5 ml d'une solution de potassium ferrocyanide à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1 ml du surnageant sont ajoutés à 0,5 ml d'eau distillée et 0,3ml d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 0.1%.

Après incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [83].

### III.1. EXTRACTION, FRACTIONNEMENTS, PURIFICATIONS ET ANALYSES DES TROIS HUILES ESSENTIELLES ETUDIEES.

#### III.1.1. *Thymus Capitatus*

##### III.1.1.1. Préparation de l'huile essentielle :

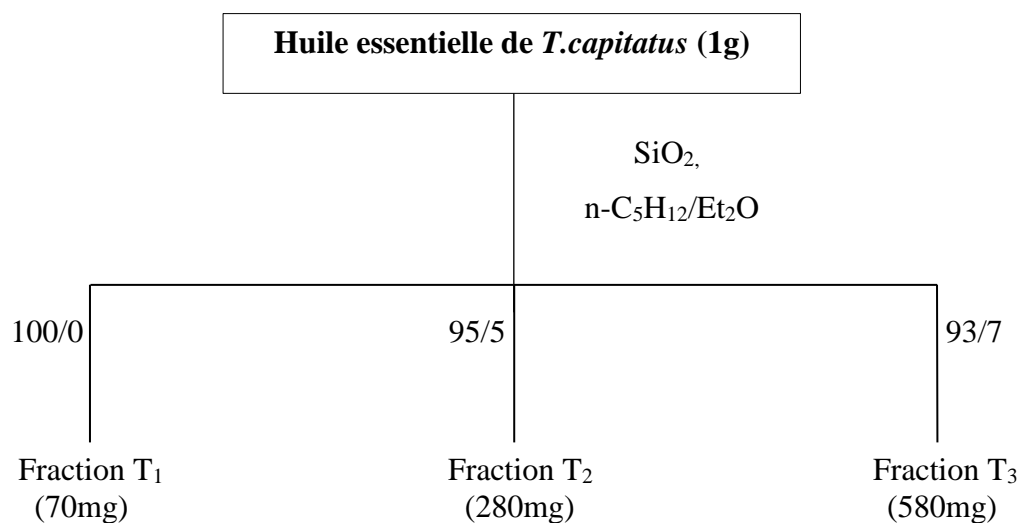
Le matériel végétal a été récolté durant le mois d'Avril 2016, dans la localité de Beni snous (Tlemcen) où elle pousse en abondance, l'H.E a été préparée par hydrodistillation pendant 5 h, à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le rendement moyen calculé en fonction de la masse de végétal frais est de 0.21 %. Nous avons ainsi préparé 5 g d'H.E.

##### III.1.1.2. Analyse de l'huile essentielle :

L'H.E des parties aériennes est analysée par CPG-Ir et CPG/SM-IE. L'analyse nous a permis d'identifier le carvacrol comme composé majoritaire qui représente **76,6** % de la composition chimique de l'H.E. Les identifications ont été réalisées à partir des bibliothèques d'indices de rétention (IR) et de spectres de masse SM.IE.

##### III.1.1.3. Fractionnement et isolement du carvacrol de l'huile essentielle :

Afin d'isoler le composé majoritaire (carvacrol), nous avons soumis 1g d'H.E à un fractionnement sur colonne ouverte a gel de silice fine avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle comme éluant, ce qui nous a conduit à 3 fractions. Le schéma du fractionnement est donné à la **Figure III.1**. L'analyse de la 3<sup>ème</sup> fraction selon la séquence habituelle CPG et CPG/SM a permis d'identifier le carvacrol avec un temps de rétention de 59.63 mn et un pourcentage de 99.6 %.



**Figure III.1** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *T. capitatus* sur colonne à gel de silice.

### III.1.2. *Carthamus caeruleus*

#### III.1.2.1. Préparation de l'huile essentielle:

A notre connaissance, il n'y a que très peu de données disponibles sur l'H.E de *C. caeruleus*. Le matériel végétal a été récolté durant le mois de Mars 2016, dans la localité de Beni snous (Tlemcen) où elle pousse en abondance. L'H.E a été hydrodistillée durant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger. Le rendement obtenu est de 0.21 % par rapport à la masse de végétal frais. Nous avons ainsi préparé 2 g d'H.E.

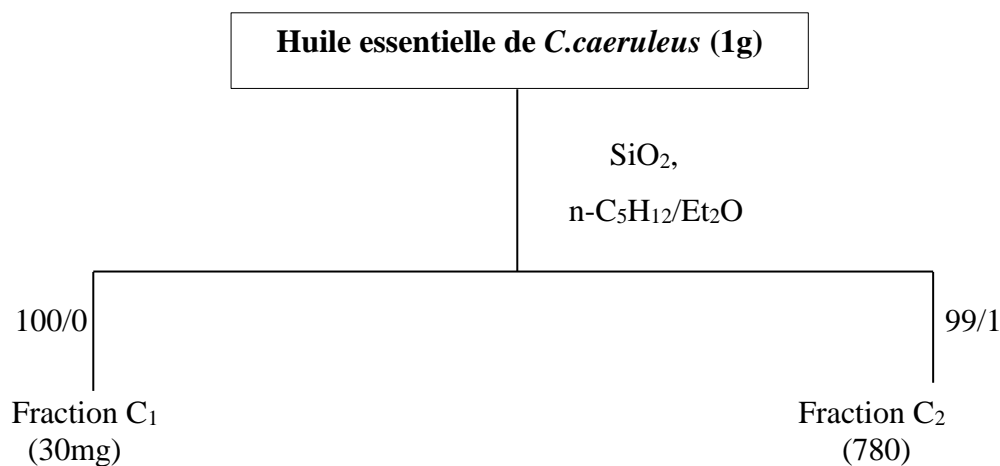
#### III.1.2.2. Analyse de l'huile essentielle :

L'H.E des parties souterraines est analysée par CPG-Ir et CPG/SM-IE. Ces analyses ont permis d'identifier Carlina oxide comme composé majoritaire qui représente **85.2%** de la composition chimique de l'H.E. Les identifications ont été réalisées à partir des bibliothèques d'indices de rétention (IR) et de spectres de masse SM.IE.

#### III.1.2.3. Fractionnement et isolement de carlina oxide de l'huile essentielle :

Afin d'isoler le composé majoritaire (carlina oxide), nous avons soumis 1g d'H.E à un fractionnement sur colonne ouverte à gel de silice fine avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle comme éluant, ce qui nous a conduit à deux fractions : une fraction hydrocarbonée

(n-C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> : 100%) et une fraction oxygénée (n- C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>/Et<sub>2</sub>O : 99/1). Le schéma du fractionnement est donné à la **Figure III.3**. L'analyse de la 2<sup>ème</sup> fraction selon la séquence habituelle CPG-Ir et CPG/SM-IE a permis d'identifier Carlina oxide avec un temps de rétention de 55.63 mn et un pourcentage de 98.2 %.



**Figure III.2** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *C. caeruleus* sur colonne ouverte a gel de silice.

### III.1.3. *Mentha piperita*

#### III.1.3.1. Préparation de l'huile essentielle:

Le matériel végétal a été récolté durant le mois de Mars 2016, dans la localité de Ghazaouet (Tlemcen) où elle pousse en abondance, l'H.E a été préparée par hydrodistillation, durant 5 h, à l'aide d'un appareil de type Clevenger et le rendement moyen calculé en fonction de la masse de végétal frais est de 0.8%. Nous avons ainsi préparé 3g d'huile essentielle.

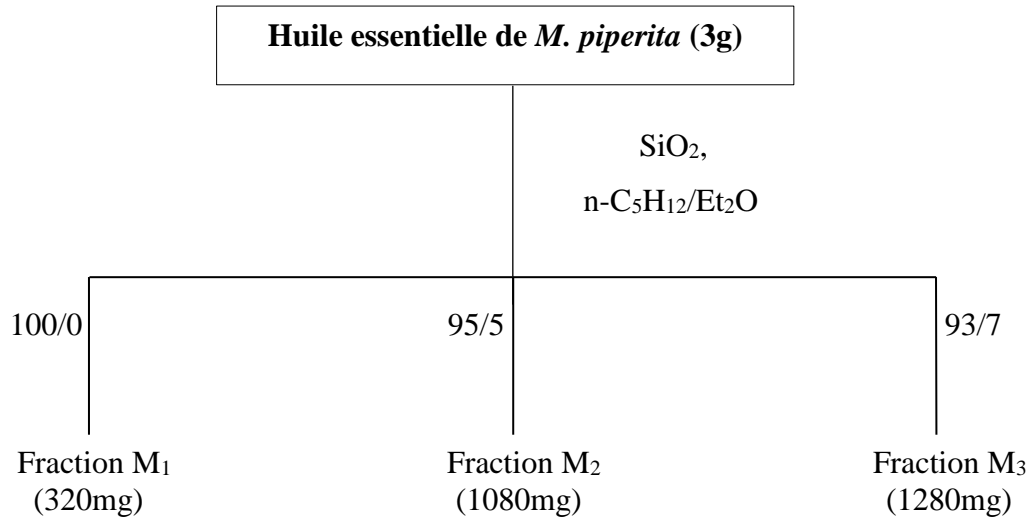
#### III.1.3.2. Analyse de l'huile essentielle :

L'H.E des parties aériennes est analysée par CPG-Ir et CPG/SM-IE. Les résultats nous ont permis d'identifier le **Linalool** comme composé majoritaire qui représente 56.3% de la composition chimique de l'H.E. Les identifications ont été réalisées à partir des bibliothèques d'indices de rétention (IR) et de spectres de masse SM.IE.

#### III.1.3.3. Fractionnement et isolement de Linalool de l'huile essentielle :

Comme pour Carlina oxide et le carvacrol, nous avons procédé de la même manière au fractionnement de l'H.E sur colonne ouverte a gel de silice fine avec un mélange pentane/oxyde

de diéthyle comme éluant, ce qui nous a conduit à trois fractions : une fraction hydrocarbonée (n-C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> : 100%), une fraction oxygénée (n- C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>/Et<sub>2</sub>O : 95/5) et une 3<sup>ème</sup> fraction (n- C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>/Et<sub>2</sub>O : 93/7) contenant le linalool plus mélange de composés oxygénés. Le schéma du fractionnement est donné à la **Figure III.5**. L'analyse de la 3<sup>ème</sup> fraction selon la séquence habituelle CPG-Ir et CPG/SM-IE a permis d'identifier le linalool mais avec un pourcentage ne dépassant pas les 50 %



**Figure III.3** : Schéma de fractionnement de l'H.E de *M. peperita* sur colonne ouverte a gel de silice.

### III.2. EVALUATION DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES HUILES ESSENTIELLES ET LES COMPOSANTS MAJORITAIRES DES TROIS PLANTES MEDICINALES : MATRICES NATIVES INDIVIDUELLES :

Les H.Es et leurs composants commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation. Sans aucun doute, les conservateurs alimentaires chimiques ou synthétiques font partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, d'allonger la durée de vie des produits alimentaires et de limiter leurs altérations par l'oxydation. Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'est avérée nécessaire car, ces substances synthétiques ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation ; elles sont avérées responsables d'effets indésirables. En effet, le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) sont suspectés avoir des

effets cancérigènes. Les nombreuses propriétés naturelles des H.Es en font des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire. Le recours aux H.Es s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques.

L'objectif de la présente étude est de déterminer le pouvoir antioxydant des huiles essentielles ainsi que leurs composantes majoritaires en utilisant les méthodes suivantes, méthode de FRAP et la méthode de DPPH.

### III.2.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire :

L'activité anti-radicalaire des échantillons est évaluée par la Méthode de DPPH• en le comparant à L'hydroxytoluènebutylé (BHT). Dans l'essai du pouvoir anti-radicalaire une solution de DPPH fraîchement préparée affiche une couleur pourpre ( $\lambda_{max} = 517 \text{ nm}$ ) qui disparaît progressivement en présence d'un bon donneur d'hydrogène, c'est à dire, un puissant antioxydant.

L'activité DPPH est généralement présentée par la valeur IC<sub>50</sub> (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) ; calculée pour chaque échantillon, elle permet de les classer entre eux. Plus la IC<sub>50</sub> est petite, plus l'échantillon a un bon pouvoir antioxydant.

#### III.2.1.1. L'huile essentielle de *T.capitatus* et sa composante majoritaire le carvacrol :

Le **Tableau III.1** montre l'activité de balayage du DPPH•, exprimée en pourcentage, causée par différentes concentrations de l'H.Es et du carvacrol.

**Tableau III.1** : % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'H.E de *T.capitatus*, le carvacrol et du BHT à différentes concentrations.

Echantillons		Activité antioxydante				
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		5	12.5	25	40	50
Huile essentielle de <i>T.capitatus</i>	Effet du balayage sur le DPPH (%)	32.8	57.63	73.51	64.18	81.50
	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					<b>10.9</b>
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		5	12.5	25	40
Carvacrol	Effet du balayage sur le DPPH (%)	17.88	22.30	22.50	45.36	56.36
	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					<b>44.52</b>
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		2	5	10	20
BHT	Effet du balayage sur le DPPH (%)	<b>18.55</b>	<b>30.40</b>	<b>35.95</b>	<b>55.85</b>	<b>64.69</b>
	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					<b>17.36</b>



La comparaison de l'activité de balayage du DPPH• de l'H.E de *T.capitatus* et du carvacrol avec celle exprimé par le BHT a montré que l'H.E de *T.capitatus* et le carvacrol présente de très bonne activité antioxydante. La plus faible activité de piégeage des radicaux libres (**56.36 %**) est obtenue par le carvacrol à une concentration de **50** µg/mL, alors que l'activité la plus forte est obtenue par l'H.E (**81.5 %**) suivie par le BHT (**64.69 %**) à la même concentration (**50** µg/mL).

L'H.E de *T.capitatus*, le carvacrol et le BHT ont pu réduire le radical DPPH• avec des valeurs de IC<sub>50</sub>=**10,9** µg/mL, IC<sub>50</sub>=**44,52** µg/mL et IC<sub>50</sub>=**17,36** µg/ml respectivement. On terme de comparaison l'H.E de *T.capitatus* a la capacité d'inhibée 50% des radicaux libres a une concentration de **10,9** µg/mL, ce qui est plus élevé que le BHT (**17.36** µg/mL) et le carvacrol (**34.52** µg/mL).

Il est à noter que l'H.E de *T. capitatus* et (**03**) fois plus active que sa composante majoritaire le carvacrol.

### III.2.1.2. L'huile essentielle de *C.caeruleus* et sa composante majoritaire le carlina oxide :

**Tableau III.2** : % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'H.E de *C.caeruleus*, le carlina oxide et du BHT à différentes concentrations.

Echantillons	Concentration (µg/mL)	Activité antioxydante					
		0.5	2.5	5	10	25	
Huile essentielle de <i>C.caeruleus</i>	Effet du balayage sur le DPPH (%)	22,4	25,46	30	36	50,26	
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						<b>24.04</b>
	Concentration (µg/mL)	<b>0.5</b>	<b>2.5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	
Carlina oxide	Effet du balayage sur le DPPH (%)	27.73	46.13	53.6	67.86	89.6	
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						<b>4.8</b>
	Concentration (µg/mL)	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	
BHT	Effet du balayage sur le DPPH (%)	<b>18.55</b>	<b>30.40</b>	<b>35.95</b>	<b>55.85</b>	<b>64.69</b>	
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						<b>17.36</b>
	Concentration (µg/mL)	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	

Le **Tableau III.2** montre que la composante majoritaire carlina oxide isolée de l'huile de *C.caeruleus* présente un pouvoir anti-radicalaire puissant avec un pourcentage d'inhibition de **89.6%** à la concentration de **25** µg/mL et avec une IC<sub>50</sub> de **4.8** µg/mL, plus importante que le BHT qui présente une IC<sub>50</sub> de **17.36** µg/ml. L'effet du balayage le plus faible est celui de l'H.E de *C.caeruleus* (**50.26 %**) avec une IC<sub>50</sub> de **24.04** µg/mL.

Contrairement à l'H.E de *T. capitatus* et le carvacrol, la composante majoritaire de *C. caeruleus*, carlina oxide présente une activité anti-radicalaire (05) fois plus importante que l'H.E de *C.caeruleus*.

### III.2.1.3. L'huile essentielle de *M. piperita* et sa composante majoritaire le linalool (standard) :

La comparaison de l'activité de balayage du DPPH• de l'H.E de *M. piperita* et du linalool avec ceux exprimés par le BHT ont montré que tous les deux échantillons examinés ont des effets antioxydants très faible avec respectivement des IC<sub>50</sub> de **103.2** et **489.5** µg/mL pour l'H.E et le composé standard le linalool.

**Tableau III.3:** % d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'huile de *Mentha piperita*, linalool et le BHT à différentes concentrations.

Echantillons		Activité antioxydante					
		25	50	100	200	300	500
Huile essentielle de <i>M.piperita</i>	Concentration (µg/mL)	25	50	100	200	300	500
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	15.32	38.42	49.85	53.52	56.9	61.4
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						
Standard Linalool	Concentration (µg/mL)	25	50	100	200	300	500
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	-	-	13.95	26.52	32.74	50.7
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						
BHT	Concentration (µg/mL)	2	5	10	20	25	
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	<b>18.55</b>	<b>30.40</b>	<b>35.95</b>	<b>55.85</b>	<b>64.69</b>	
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)						

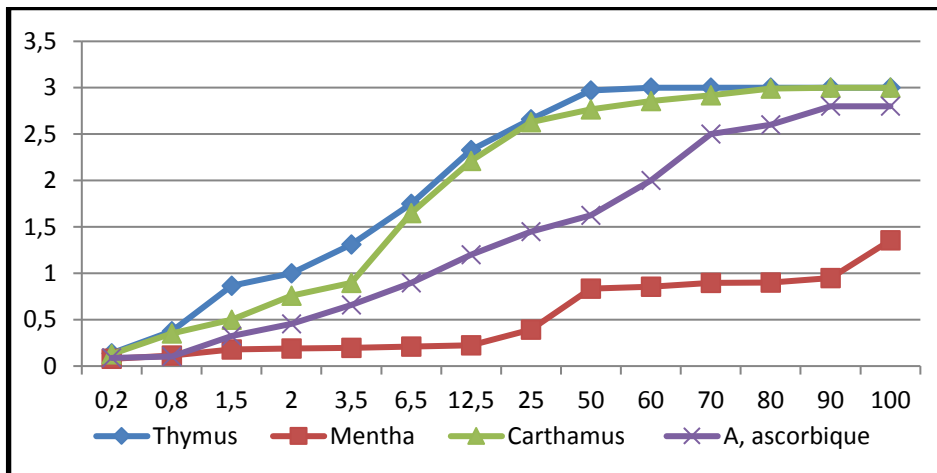
### III.2.2. Méthode de réduction des ions ferreux FRAP :

Dans l'essai du pouvoir réducteur la présence d'antioxydant dans l'échantillon aurait pour résultats la réduction de Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> en donnant un électron. La quantité du complexe Fe<sup>2+</sup> 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.

#### III.2.2.1. Matrice individuelle des trois huiles essentielles :

Dans cette partie, nous avons testé le pouvoir réducteur de la matrice individuel de l'H.E de *T. capitatus*, *M. piperita* et *C. caeruleus*, on remarque que le pouvoir réducteur des H.Es et de l'acide ascorbique (témoin) a augmenté avec une concentration croissante.

Les résultats obtenus montrent que l'H.E de *T.capitatus* et *C.caeruleus* sont nettement supérieurs à celle de la référence (acide ascorbique). Ils montrent aussi que la capacité des deux H.Es à réduire le fer est largement supérieure à celle de l'acide ascorbique. Cette réduction est beaucoup plus importante dans H.E de *T. capitatus* suivie de celle de *C. caeruleus* et *M. piperita*. Nous pouvons déduire que toutes les H.Es des 03 plantes ont la capacité de réduire le fer. Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, nous obtiendrons l'ordre suivant : *T. capitatus* > *C. caeruleus* > Acide ascorbique > *M. piperita* (**Figure III.7**).



**Figure III .4** : Pouvoir réducteur de l'H.E de *T. capitatus*, *M. piperita*, *C. caeruleus* et de l'acide ascorbique



*T.capitatus*

*M.piperita*

*C.caeruleus*

**Figure III.5** : Résultats du test de la méthode de FRAP des 3 huiles essentielles.

### III.3. INTERACTIONS ENTRE LES HUILES ESSENTIELLES ET LEURS COMPOSANTS MAJORITAIRES : EFFET DU SYNERGISME OU D'ANTAGONISME SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

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. Les huiles essentielles des plantes médicinales sont des mélanges complexes par leur nature. Etant un mélange cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes.

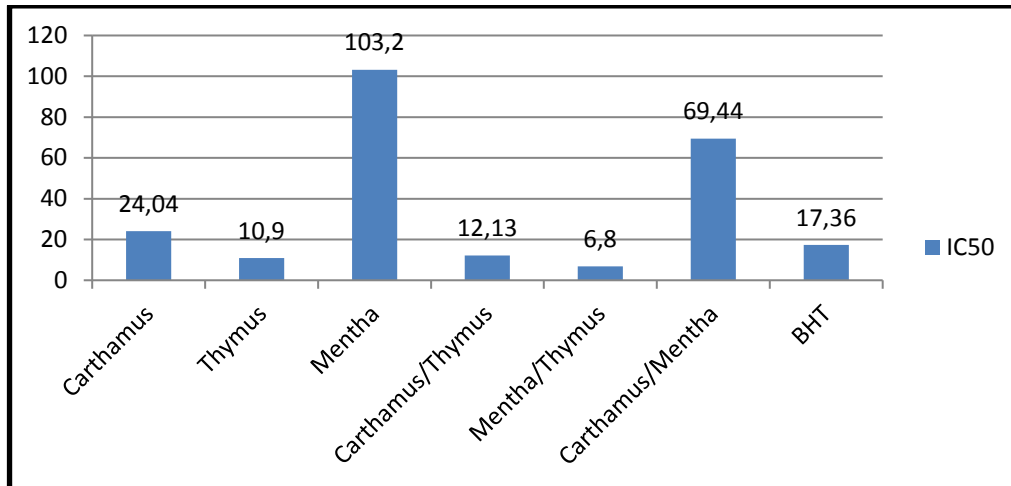
L'objectif de la présente étude est de déterminer le pouvoir antioxydant des effets synergiques ou antagonismes entre les H.Es et leurs composants majoritaires en utilisant les méthodes suivantes, FRAP et DPPH.

#### III.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH :

##### III.3.1.1 Mélanges croisés des huiles essentielles :

Des activités antioxydantes antagonistes et synergétiques ont été observées après le mélange des H.Es. L'H.E de *C. caeruleus* associé à celle de *T. capitatus* présente une activité ( $IC_{50} = 12.13 \mu\text{g/L}$ ) plus importante que son association avec l'H.E de *M. piperita* ( $IC_{50} = 69.44 \mu\text{g/L}$ ).

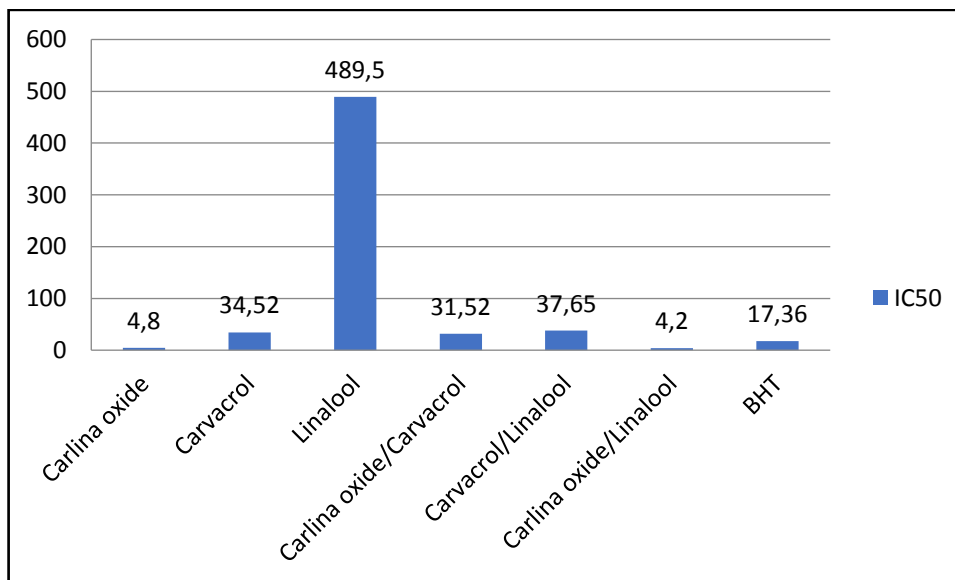
La combinaison de l'H.E de *M. piperita* et celle de *T. capitatus* présente la plus forte inhibition ( $IC_{50} = 6.8 \mu\text{g/L}$ ) du radical DPPH. Ce résultat signifie que la combinaison des deux huiles présente un effet synergique entre les différents constituants biologiques mineurs de *M. piperita* et les différents constituants de *T. capitatus* puisque l'H.E de *M. piperita* présente individuellement une très faible activité antioxydante (**Figure III.6**).



**Figure III.6:** Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. capitatus*, *C. caeruleus* et *M. piperita* comparés avec celle des huiles individuelles.

### III.3.1.2 Mélanges croisés des composés purs :

Un important synergisme est observé pour le mélange carlina oxide-linalool. Cependant, on constate d'après l'activité antioxydante mesurée que les autres mélanges possèdent un effet antagoniste plus ou moins marqué que les matrices individuelles. Il est important de noter qu'aucun effet de synergisme n'est observé pour le mélange carlina oxide-carvacrol et carvacrol-linalool (**Figure III.7**).



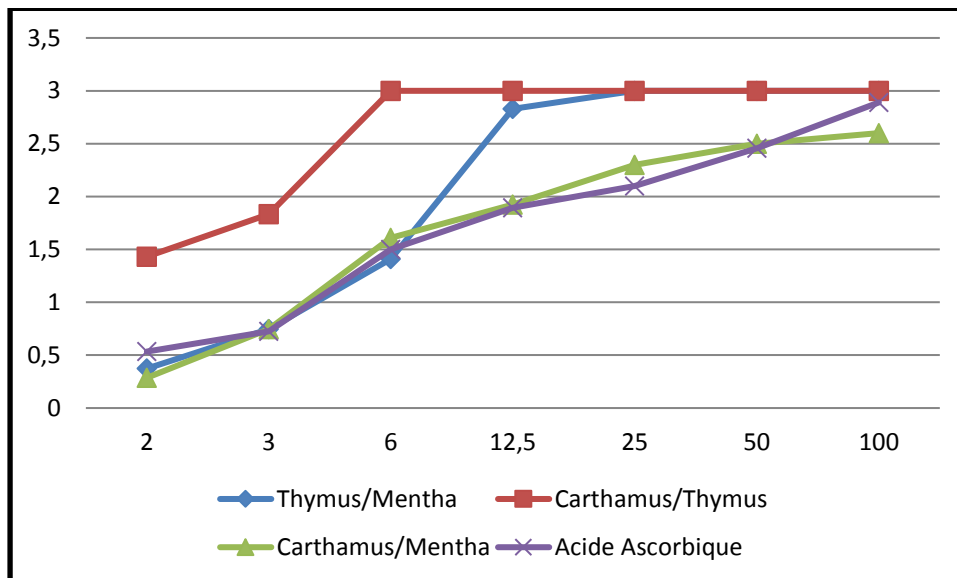
**Figure III.7 :** Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges croisés des composés purs comparés avec celle des composés individuels

Dans cette partie de notre travail, nous avons mis en évidence par le test DPPH l'antagonisme et le synergisme antioxydant des huiles essentielles et leurs composants majoritaires de trois plantes. L'ajout des antioxydants ne crée pas toujours des effets positifs mais aussi peut produire des effets négatifs sur l'activité antioxydante. Il semble que ces effets négatifs sont fortement liés à l'environnement physico-chimique des molécules antioxydantes présentes dans les huiles, en particulier, celui des composés majoritaires.

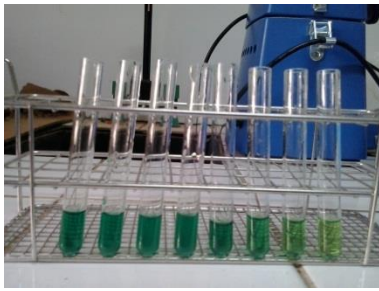
### III.3.2 Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP :

#### III.3.2.1 Mélange croisé des huiles essentielles :

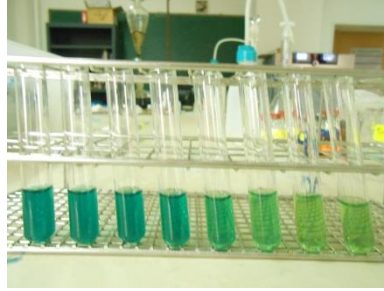
A la concentration de 12.5 µg/mL, le pouvoir réducteur des mélanges des H.Es de *C.caeruleus*/*T.capitatus*, *T.capitatus*/*M.piperita* et *C.caeruleus*/*M.piperita* sont nettement supérieurs à celui de l'acide ascorbique (**Figure III.8**). Ces résultats nous ont permis de conclure que les mélanges croisés des trois H.Es présentent une activité antioxydante très intéressante par rapport à l'acide ascorbique ainsi qu'un effet synergétique très important (**Figure III.8**).



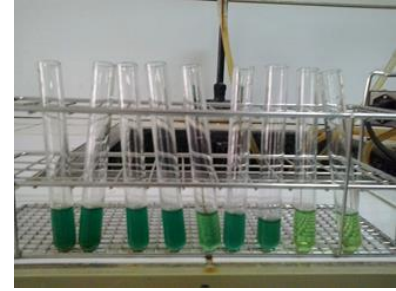
**Figure III.8 :** Pouvoir réducteur des mélanges croisés de l'huile essentielle de *C. caeruleus*, *T. capitatus* et *M. piperita* .



*Carthamus+ Thymus*



*Mentha+Thymus*

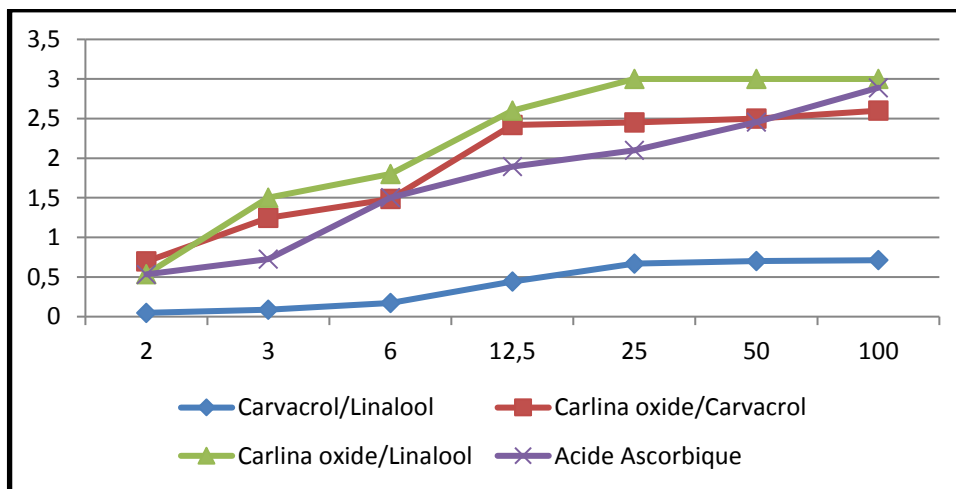


*Carthamus +Mentha*

**Figure III.9 :** Résultats du test de la méthode de FRAP des mélanges croisés des huiles essentielles.

**III.3.2.2 Mélange croisé des composés majoritaires des huiles essentielles :**

Un important synergisme est observé pour le mélange carlina oxide-linalool et carlina oxide-carvacrol par la méthode de FRAP. On constate d’après l’activité antioxydante mesurée que le mélange carvacrol-linalool possède un effet antagoniste plus ou moins marqué que les matrices individuelles. Il est important de noter qu’aucun effet de synergisme n’est observé pour le mélange carvacrol-linalool (**FigureIII.10**).



**Figure III.10 :** Evaluation de l’activité antioxydante par la méthode FRAP des mélanges croisés des composés purs.





Les travaux de recherche entrepris dans le cadre de ce projet de mémoire ont permis, dans un premier temps, de compléter les connaissances sur le potentiel phytochimique des huiles essentielles de 3 plantes très utilisées en médecine traditionnelle.

Dans un deuxième temps, une mise en œuvre des techniques chromatographiques a conduit à l'identification des constituants des huiles essentielles de *T. capitatus*, *M. piperita* et *C. caeruleus*. La principale constituante de l'huile essentielle de *T. capitatus* est le carvacrol (76,6%). La composante majeure de l'huile essentielles de *M. piperita* est le linalool (56.3 %) et celle de *C. caeruleus*; la composante majoritaire est Carlina oxide (**85.2 %**).

Une autre partie importante de ce projet a été le fractionnement et l'isolation des composantes majoritaires des huiles essentielles.

L'évaluation du potentiel antioxydant des huiles essentielles et des composants majoritaires individuellement montre que l'huile essentielle et la composante majoritaire de *C. caeruleus* et du *T. capitatus* présentent des effets antioxydants très remarquables. Alors que l'huile essentielle de *M. piperita* et de sa composante majoritaire le linalool présentent une activité antioxydante très faible.

En ce qui concerne les études de synergie, ces résultats préliminaires ont été acquis par des tests de l'activité antioxydante réalisés à partir des mélanges croisés entre les huiles essentielles et les composantes majoritaires. Des effets synergiques et antagonistes ont été observés pour les différents mélanges.

Un important synergisme est observé pour le mélange de l'huile essentielle de *C. caeruleus* et *M. piperita* ainsi que pour carlina oxide-linalool. Cependant, on constate d'après l'activité antioxydante mesurée que les autres mélanges possèdent un effet antagoniste plus ou moins marqué que les matrices individuelles. Il est important de noter qu'aucun effet de synergisme n'est observé pour le mélange carlina oxide-carvacrol et carvacrol-linalool.

En perspective, il serait souhaitable de confronter ces résultats de cette approche d'études d'effets chimiques et biologiques « dans la masse » par rapport à une approche moléculaire qui

ciblerait tous les constituants majeurs et mineurs fractionnés afin d'étudier leur activité biologique individuellement.

- [1] Fatima KHOLKHAL, Thèse Sur : Etude Phytochimique et Activité Antioxydante Des Extraits Des Composés Phénoliques De *Thymus.ciliatus* ssp coloratus et ssp euciliatus. Université de Tlemcen, 2014.
- [2] Adolphe Christian NGAKEGNI-LIMBILI, Thèse Sur : Etude de Synergie Des Effets Chimiques Et Biologiques Des Lipides De Réserves Et Des Huiles Essentielles Des Fruits Et Graines Saisonniers De La Sous-Région Afrique Centrale. Université de Toulouse, juin 2012.
- [3] Chaker EL KALAMOUNI, Thèse Sur : Caractérisations Chimiques et Biologiques D'extraits De Plantes Aromatiques Oubliées De Midi-Pyrénées, Université de Toulouse, Décembre 2010.
- [4] Anton R., Lobskin A., Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments Et Huiles Essentielles ; Tec Et Doc, Paris 522p 2005.
- [5] Roulier G. Les huiles essentielles pour votre santé : Traité Pratique D'aromathérapie. Propriétés Et Indications Thérapeutiques Des Essences De Plantes ; Dangles, 1990.
- [6] Association Française de Normalisation, "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. NF T 75-006. 1986.
- [7] Christian BOURREL., Thèse sur : Analyse Chimique, Activités Biostatistiques Et Antioxydantes D'extraits De Plantes Aromatiques Sélectionnées. Université de Toulouse 1993.
- [8] Lahlou M., *Methods To Study Phytochemistry And Bioactivity Of Essential Oils*. Phytotherapy Research, 2004. 18, 435-448.
- [9] Valnet M., *Antibacterial Activity Of 11 Essential Oils Against Bacillus cereus In Tyndallized carrot Broth International*. Journal of Food Microbiology, 2005. 85, 73-81.
- [10] Sunan W., Kelly A.M., Massimo F.M., Yukio K., Rong T., *Synergistic, Additive, And Antagonistic Effects of Food Mixtures On Total Antioxidant Capacities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. 59, 960-968.
- [11] Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., *Phenolic Compounds And Their Role In Oxidative Processes in Fruits*. Food Chemistry, 1999. 66, 401-36.
- [12] Franke A., Custer L., Arakaki C., Murphy S., *Vitamin C and Flavonoid Levels Of Fruits And Vegetables Vonsumed In Hawaii*. Journal of Food Composition and Analysis, 2004. 17 1-35.

- [13] Harnly J.M., Doherty R.F., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Bhagwat S., Gebhardt S., *Flavonoid Content Of U.S. Fruits, Vegetables And Nuts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. 54, 9966-77.
- [14] Miller N.J., Rice-Evans C.A., *The Relative Contributions Of Ascorbic Acid And Phenolic Antioxidants To The Total Antioxidant Activity Of Orange And Apple Fruit Juices And Blackcurrant Drink*. Food Chemistry, 1997. 60, 331-7.
- [15] Zheng W., Wang S.Y., *Oxygen Radical Absorbing Capacity Of Phenolics In Blueberries, Cranberries, Chokeberries, And Lingonberries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51, 502-9.
- [16] Lila M.A., Raskin I., *Health-Related Interactions Of Phytochemicals*. Journal of Food Science, 2005. 70(1), R20-27.
- [17] Yang J., Liu R.H., *Synergistic Effect Of Apple Extracts And Quercetin 3-B-D-Glucoside Combination On Antiproliferative Activity In MCF-7 Human Breast Cancer Cells In Vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. 57, 8581-6.
- [18] Hwang J., Hodis H.N., Sevanian A., *Soy And Alfalfa Phytoestrogen Extracts Become Potent Low-Density Lipoprotein Antioxidants In The Presence Of Acerola Cherry Extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. 49, 308-14.
- [19] Liao K., Yin M., *Individual And Combined Antioxidant Effects Of Seven Phenolic Agents In Human Erythrocyte Membrane Ghosts And Phosphatidylcholine Liposome Systems:Importance Of The Partition Coefficient*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. 48, 2266-70.
- [20] Parker T.L., Miller S.A., Myers L.E., Miguez F.E., Engeseth N.J., *Evaluation Of Synergistic Antioxidant Potential Of Complex Mixtures Using Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) And Electron Paramagnetic Resonance (EPR)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58, 209-17.
- [21] Galal A.M., *Natural Product-Based Phenolic And Nonphenolic Antimicrobial Food Preservatives And 1,2,3,4-Tetrahydroxybenzene As A Highly Effective Representative: A Review Of Patent Literature 2000-2005*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov , 2006. 1, 1231-9.
- [22] Serra A.T., Matias A.A., Nunes A.V.M., Leitão M.C., Brito D., Bronze R., Silva S., Pires A., Crespo M.T., San Romão M.V., Duarte C.M., *In Vitro Evaluation Of Olive- And Grape-Based Natural Extracts As Potential Preservatives For Food*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. 93, 11-19.

- [23] Conte A., Scrocco C., Sinigaglia M., Del Nobile M.A., *Lemon Extract As Natural Preservative In Fruit Salad*. Journal of Food Safety, 2009. 29, 601-16.
- [24] Rodriguez Vaquero M.J., N.M.C.M., *Growth Parameter And Viability Modifications Of Escherichia Coli By Phenolic Compounds And Argentine Wine Extracts*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. 151, 342-52.
- [25] Oliveira C.E.V., D.S.T.L.M., Gomes Neto N.J., de Souza E.L., *Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 137, 312-16.
- [26] Lila M.A., *Interactions between favonoids that benefit human health. In Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, And Application*, K. Gould, Davies, K., Winefield, C., Editor. 2009, Springer Science Business Media: New York. p. 305-320.
- [27] Abderrahim EL HAIB . Thèse Sur : Valorisation De Terpenes Naturels Issus De Plantes Marocaines Par Transformation Catalytiques. Université de Toulouse. 2011.
- [28] Normes AFNOR Receil Des Normes Françaises, "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. 1992
- [29] Pharmacopée Européenne 1 Conseil De l'Europe, Maisonneuve S.A. Edition, Sainte Ruffine, 1996.
- [30] Apparatus For Volatil Oil Déterminations Description Of New Type J. F. Clevenger, Americain Perfumer & Essential Oil Review, 1928, 467-503
- [31] Natural Essential Oils: Extraction Processes And Applications To Some Major Oils. B. Meyer-Warnod, Perfumer Et Flavorist, 1984, 9, 93-103.
- [32] Julien PAOLINI, Thèse Sur : Caractérisation Des huiles Essentielles Par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN Du Carbone-13 De *Cistus albidus* Et De Deux *Asteraceae* Endemiques De Corse : *Eupatorium Cannabinum* Subsp. *Corsicum* Et *Dorocicum Corsicum*- Docteur De l'Universite De Corse-2005.
- [33] Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P: Manuel Pratique De Chromatographie En Phase Gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- [34] Kováts E., Gas Chromatographic Characterization Of Organic Substances In The Retention Index System, In *Advances In Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247.
- [35] Audigie C.L., Dupon G. et Zongain. F : Principes Des Méthodes D'analyse Biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, 1995.

- [36] McLafferty F.W., Michnowicz J.A., State-Of-The-Art GC-MS, *Chemtech.*, 1992,182-189.
- [37] N.VENTURINI, Thèse Sur: Contribution Chimique A La Définition De La Qualité : Exemples Des Spiritue De Myrte (*Myrtus Communis L.*) Et De Cedrat (*Citrus Medical.*) De Corse .Université De Corse, 2012.
- [38] Constantin E., Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec Et Doc, Paris, 1996.
- [39] Samira BENYAHYA, Thèse Sur : Activités Antimicrobiennes Et Insecticides De *Thymus Capitatus*, *Daucus Crinitus* Et *Tetraclinis Articulata* Sur La Mineuse *Tuta Absoluta* (Meyrick) Et La Microflore Pathogène De La Tomate *Lycopersicum Esculentum*. Université de Tlemcen, 2014.
- [40] Quezel P., Santa S. *Nouvelle Flore De l'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales*, Tome 2, Edition. CNRS, Paris, 1963.
- [41] Bayer, E., Buttler, K., Finkenzeller, X., & Grau, J. *Guide de la flore méditerranéenne*. Delachaux et Niestlé : France.2005.
- [42] Bouchikhi Tani Z., Khelil M A., Bendahou M & Mestari M. *Action Des Huiles Essentielles De Trois Plantes Aromatiques De L'ouest Algérien Sur La Mite Tineola Bisselliella*. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 2009, 14, 175 – 186.
- [43] Tabti L., Dib M A., Djabou N., Gaouar Benyelles N., Paolini J., Costa J & Muselli A. *Control Of Fungal Pathogens Of Citrus Sinensis L. By Essential Oil And Hydrosol Of Thymus Capitatus L.* *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2014, 87, 279 - 285.
- [44] Ruberto G., Biondi D & Piattelli M. *The Essential Oil Of Sicilian Thymus Capitatus(L.) Hoffmanns, et Link*. *Journal of Essential Oil Research*, 1991, 4, 417-418.
- [45] Miceli A., Negro C., Tommasi L. *Essential Oil Variability In Thymbra Capitata (L.) Cav. Growing Wild In Southern Apulia (Italy)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, 34, 528-535.
- [46] Russo M., Suraci F., Postorino S , Serra D., Roccotelli A., Agosteo G E. *Essential oil chemical composition and antifungal effects on Sclerotium cepivorum of Thymus capitatus wild populations from Calabria, southern Italy*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2005, 23, 239-248.
- [47] Casiglia S., Bruno M ., Scandolera E., Senatore F., Senatore F. *Influence Of Harvesting Time On Composition Of The Essential Oil Of Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns. & Link. Growing Wild In Northern Sicily And Its Activity On Microorganisms Affecting Historical Art Crafts*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.

- [48] Amarti F., Satrani B., Aafi M., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., ElAntry S., Chaouch A., *Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Thymus Capitatus Et De Thymus Bleicherianus Du Maroc*. *Phytothérapie*, 2008, 6, 342–347.
- [49] El Ouariachi E M., Paolini J., Bouyanzer A., Tomi P., Hammouti B., Salghi R., Majidi L., Costa J., *Chemical Composition And Antioxidant Activity Of Essential Oils And Solvent Extracts Of Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns and link from Morocco*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, 5(24), 5773-5778.
- [50] Hedhili L., Romdhane M., Abderrabba A., Planche H., Cherif I., *Variability In Essential Oil Composition Of Tunisian Thymus Capitatus (L.) Hoffmanns. Et Link*. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001, 17, 26-28.
- [51] Hedhili L., Romdhane M., Planche H., Abderrabba M., *Towards Gas Chromatography–Mass Spectrometry Coupling Protocols For Both Identifying And Quantification Essential Oils Of Thymus Capitatus Hoff Et Link*. *Journal of Chromatography*. 2004, A, 1064, 129-134.
- [52] Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., *Chemical Composition, Antioxidant And Antibacterial Activities Of The Essential Oils Isolated From Tunisian Thymus Capitatus Hoff. Et Link*. *Food Chemistry*, 2007, 105, 146–155.
- [53] Mkaddem MG., Romdhane M., Ibrahim H., Ennajar M., Lebrihi A., Mathieu F., Bouajila J., *Essential Oil Of Thymus Capitatus Hoff. Et Link. From Matmata, Tunisia: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis And Antimicrobial And Antioxidant Activities*. *J Med Food*, 2010, 13(6), 1500-4.
- [54] Moujahed N., Bouaziz Y., Ben Jannet A., Ghrabi Z., *Nutritive Value And Essential Oils Characterization Of Rosmarinus Officinalis And Thymus Capitatus From The Central Region Of Tunisia*. *Siheam Options Méditerranéennes*, 2011, 99, 245-249.
- [55] Hosni K., Hassen I., Chaabane K., Jemli M., Dallali S., Sebei H., Casabianca H., (2013) *Enzyme-Assisted Extraction Of Essential Oils From Thyme (Thymus Capitatus L.) And Rosemary (Rosmarinus Officinalis L.): Impact On Yield, Chemical Composition And Antimicrobial Activity*. *Industrial Crops and Products*, 2013, 47, 291-299.
- [56] Benjilali B., Hammouni M., M'Hamedi A. & Richard H., *Essential Oil Composition Of Different Moroccan Thyme Varieties: Principal Component Analysis*. *Sci. Aliments*, 1987, 7, 275-299.
- [57] Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Buechberg M. & Allegrini J., *Therapeutic value of the cultivated mountain savory (Satureia Montana L.)*. *Acta Hortic.*, 1980, 96, 35-39.



- [58] Sabah BOUMERFEG, Thèse Sur: ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF *Tamus Communis* L., *Carthamus Caeruleus* L. AND *Ajuga Iva* L. Extracts University Ferhat Abbas Setif, 2010.
- [59] Rania BELABBES, Enquête Ethnobotanique, Caractérisation Chimique Et Activités Biologiques Des Volatils De Deux Plantes Médicinales De L'ouest Algérien : *Calendula arvensis* L et *Carthamus sp L*", Université de Tlemcen, 2012.
- [60] Sylvain Sutour, Thèse Sur : Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats Université De Corse, 2010.
- [61] Nisrin Benayad, Thèse Sur: Les Huiles Essentielles Extraite Par Plantes Médicinales Marocaine : Moyen Efficace De Lutte Contre Les Ravageurs Des Denrées Alimentaires Stockées, Université Mohammed V– Agdal De Rabat, Novembre 2008.
- [62] Foster S. Peppermint: *Mentha piperita*. *American Botanical Council* - Botanical Series 1996; 30, 63- 8.
- [63] World Health organization: *Selected Medicinal plants* volume 2, p 188 ,2002.
- [64] Goudjil M B., Ladjel S., Benchikh S E., Zighmi S., Hamada D., *Chemical Composition, Antibacterial And Antioxidant Activities Of The Essential Oil Extracted From Mentha Piperita . Of Southern Algéria*. Research Journal of Phytochemistry, 2015, 9, 79-87.
- [65] Katiki L M., Chagas A C S., Rizzo H R., Ferreira J F S., Amarante A F T., *Anthelmintic Activity Of Cymbopogon Martini, Cymbopogon Schoenanthus And Mentha Piperita Essential Oils Evaluated In Four Different In Vitro Tests*. Veterinary Parasitology, 2011, 183 (1-2), 103-108.
- [66] Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya S., Efficacy Of *Mentha × Piperita* And *Mentha Citrata* Essential Oils Against Housefly, *Musca Domestica* L. Industrial Crops and Products.2012, 39, 106-112.
- [67] Samber N., Varma A., Manzoor N., *Evaluation of Mentha piperita Essential Oil and its Major Constituents for Antifungal Activity in Candida spp*. International Journal of Innovative Research in Science. 2014, 3, 2319-8753.
- [68] Farshbaf Moghaddam M., Omidbaigi R., Pourbaig VM; Ghaemi A., *Composition And Antifungal Activity Of Peppermint (Mentha Piperita) Essential Oil*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2004, 3(2), 68-69.



- [69] Behnam S., Farzaneh M., Ahmadzadeh M., Tehrani AS. *Composition And Antifungal Activity Of Essential Oils Of Mentha Piperita And Lavendula Angustifolia On Post-Harvest Phytopathogens*. Pub med, 2006, 71, 1321-6.
- [70] SaharkhizMJ., MotamediM., Zomorodian K., Pakshir K., Miri R., Hemyari M., *Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of Mentha piperita L.* International Scholarly Research Network ISRN Pharmaceutics 2012, 718645-6.
- [71] GolpvarA R., Hanipanal., *Chemical Composition Of The Essential Oil From Peppermint (Mentha Piperita L.) Cultivade In Isfahan Condition*. 2013, 4(2), 75-80.
- [72] Mahboubi M., Kazempour N., *Chemical Composition And Antimicrobial Activity Of Peppermint (Mentha Piperita L.) Essential Oil*. Journal of science and technology. 2014, 36 (1), 83-87.
- [73] Fahmideh L., Sargazi A., Mehrabi A M., Armin A., *Chemical Composition Of Peppermint (Mentha Piperita) Grown In Isfahan Province, Iran*. Journal Of Biodiversity And Environmental Sciences.2015, 7(1) 72-76.
- [74] Gavahian M., Farhoosh R., Farahnaky A., Javidnia K.,Shahidi F.,*Comparison Of Extraction Parameters And Extracted Essential Oils From Mentha Piperita L. Using Hydrodistillation And Steamdistillation*. International Food Research Journal, 2015, 22(1): 283-288.
- [75] Hadipanah A., Ghahremani A., Aghaee K., Zolfaghar M., Ardalani H., *Four Ecotypes of Mentha pipertia in Iran; Phytochemical study*. Biological Forum– An International Journal, 2015, 7(1): 1796-1801.
- [76] Debbab A., Mosaddak B., Aly A H.,Hakiki A., Mosaddak M., (2007). *Chemical Characterization And Toxicological Evaluation Of The Essential Oil Of Mentha Piperita L. Growing In Morocco*. Scientific Study & Research, 2007, 8(3), 281-288.
- [77] Derwich E., Benziane Z., Taouil R., SenhajiO.,Touzani M., *Aromatic Plants of Morocco: GC/MS Analysis of the Essential Oils of Leaves of Mentha piperita*. Advances in Environmental Biology, 2010, 4(1), 80-85.
- [78] Kizil S., Hasimi N., Tolan V., Kilinc E., Yuksel U., *Mineral Content, Essential Oil Components And Biological Activity Of Two Mentha Species (M. Piperita L., M. Spicata L.)*. Turkish Journal of Field Crops, 2010, 15(2),148-153.
- [79] Fkren S.,Yerlikaya O.,Tokul H E., Akpinar A., Acu M., *Chemical Composition, Antimicrobial Activity And Antioxidant Capacity Of Some Medicinal And Aromatic Plant Extracts*. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(5), 383-388.

- [80] Nickavar B, Alinaghi A. et Kamalinejad M. *Evaluation Of The Antioxidant Properties Of Five Mentha Species* - Iranian Journal Of Pharmaceutical Research, 2008, vol. 7 (3): 203-209.
- [81] Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. *Screening Of The Antioxidant Potentials Of Six Salvia Species From Turkey*. Food Chemistry. 2006, 95, 200-204.
- [82] Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. Sakata, K. *A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish*. Biosci., Biotechnol., Biochem. 1994, 58, 1780-1783.
- [83] Oyaizu M., *Antioxidative Activities Of Browning Products Of Glucosamine Fractionated By Organic Solvent And Thin-Layer Chromatography*. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 1986, 35, 771-775.