REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II

Département : Science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Etude comparative du pouvoir antimicrobienne d'écorce d'orange, Thymus vulgaris et Santolina chamaecyparissus. Application a la formulation d'un gel buvable

Présenté par :

KHEDDAR Kaddour Mohamed **KAMELI Youcef** **BENOMIER Abderrahmane**

Devant les jurys

Mr. KHAMES Mammar	**MCA**	**Université de Médéa**	**Président**
Mr. HAMOUDI Mounir	**MCB**	**Université d'Ain Defla**	**Examinateur**
Mr. AINAS Mahfoud	**MCB**	**Université de Médéa**	**Examinateur**
Mr. OTMANINE Khaled	**MAA**	**Université de Chlef**	**Promoteur**
Mr. CHAMI Bouaaza	**MAA**	**Université de Médéa**	**Co- Promoteur**
Mr. Zouambia Fouad	**Ingénieur Gpp**	**Saidal Médéa**	**invité**
Dr Bekri Razika	**Hématologue**	**L'hôpital de Médéa**	**invitée**

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier le DIEU Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre encadreur ***OTMANINE Khaled*** *son précieux de votre conseil et son aide durant toute la période du travail. Pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être menée au bon part. et notre Co-encadreur* ***CHAMI Bouaaza*** *son exigence et ses encouragements, en nous faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques, durant la réalisation de ce mémoire.*

Nous adressons nos vifs et sincères remerciements aux membres de jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce modeste travail : ***KHAMES MAAMAR, HAMMOUDI Mounir*** *et* ***AINES Mahfoud.***

Nous tenons à exprimer nos respectueuses gratitudes et nos reconnaissances à ***Tifoura*** *et* ***Mesaad*** *et* ***Yahiaoui*** *les ingénieurs du laboratoire de faculté de science université de Médéa,* ***Moloud Sofiane*** *directeur du hall technologie* ***Benhaoua*** *ingénieur du laboratoire de hall technologie.*

Ainsi ***Dr. Chaib Draa*** *médecin du laboratoire Chiffa lab, Mr* ***Basour*** *sour directeur de groupe saidal Mme* ***Bakhti*** *directrice du laboratoire physico chimique de groupe saidal Mme* ***Benomier*** *chef service du laboratoire microbiologie de groupe saidal .Et bien sûr Mr* ***Zouambia*** *et Mr* ***Laidi*** *analystes du laboratoire* ***Benyahia*** *et* ***Mazari*** *les ingénieurs du laboratoire pharmacologie toxicologie de groupe saidal*

Enfin, nous remercions à tous ceux et celles qui nous ont aidés de près ou de loin, qu'ils trouvent ici toute notre sympathie et notre profonde gratitude.

Dédicace

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la volonté et de m'avoir fourni sa bénédiction.

Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur.

A mes très chers parents, à qui je dois cette fierté et qui m'ont beaucoup soutenu et aidé.

*Mon père **Mustapha** qui a été et sera toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines, son honnêteté et sa responsabilité. Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui.*

*A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, ma douce et tendre maman **Bachira Dougdag**. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi.*

Merci pour votre soutien et pour amour que vous me portez, Merci de m'avoir supportée dans les moments particulièrement stressants que Dieu vous protège et vous donne longue vie.

*A mes sœurs **: Yasmine, Ikram, Anfal et Besma Dina.***

Avec eux j'ai et je partagerai ma vie, et avec eux j'ai passé des moments agréables, ils m'ont encouragé pour réaliser mon rêve après des longues années d'étude en leurs souhaitons à toutes bonne réussite dans leur vie.

A tous mes amis qui me sont chers :

Adel, Abdelkader, Salaheddine, Abdelmalek, Djamel, Watik, AbdelWahab, Houssem, Hamza, Yacine, Mohamed, Walid** et mes chers binômes **Abderrahmane** et **Youcef.

***Lilia, Nadia, Amina, Kaouther, Amira, Chaimaa, Abla, Ilham, Zineb, Hafsa, Noussaiba, Nadera, Selma et Asma**.*

*A tous les membres de la famille **Kheddar, Doudag, Hadj hamdi** et **Kadik** et mes chers cousins et mes cousines.*

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

Mohamed Kaddour

Dédicace

Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur.

A mes très chers parents, à qui je dois cette fierté et qui m'ont beaucoup soutenu et aidé.

Mon père ***Mahfoud benomier*** *qui a été et sera toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines, son honnêteté et sa responsabilité. Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui.*

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, ma douce et tendre maman ***Assia Chiraout*** *Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi.*

Merci pour votre soutien et pour amour que vous me portez, Merci de m'avoir supportée dans les moments particulièrement stressants que Dieu vous protège et vous donne longue vie.

A mes chers frères : ***Abdallah, Amine et Mossaab****. Aussi A ma chère sœur* ***Hafssa*** *; avec eux j'ai et je partagerai ma vie, et avec eux j'ai passé des moments agréables, ils m'ont encouragé pour réaliser mon rêve après des longues années d'étude en leurs souhaitons à toutes bonne réussite dans leur vie.*

A tous mes amis qui me sont chers :

Rafik Ghibouch, Houssam Benteghri, Adel, Abdelkader, Salahdine, Abdelmalek, Djamel, Watik, Abdelwaheb, Houssem, Dehbin, Zakaria, Hamza, Walid *et mes chers binômes* ***Mohamed et Youcef.***

Lilia, Nadia Amina, Kaouther, Amira, Dounia, Chaimaa, Abla, Ilham Zineb, Hafsa, Amina.

A tous les membres de la famille Benomier et Chiraout et mes chers cousins et mes cousines.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

Abderrahmane

Dédicace

Je dédie ce travail aux plus proches à mon cœur.

A mes très chers parents, à qui je dois cette fierté et qui m'ont beaucoup soutenu et aidé.

Mon père ***Boualem*** *qui a été et sera toujours un exemple pour moi par ses qualités humaines, son honnêteté et sa responsabilité. Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui.*

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, ma douce et tendre maman ***Moussaoui Yamina****. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi.*

Merci pour votre soutien et pour amour que vous me portez, Merci de m'avoir supportée dans les moments particulièrement stressants que Dieu vous protège et vous donne longue vie.

A tous mes amis qui me sont chers :

Adel, Abdelkader, Salahdine, Abdelmalek, Djamel, Watik, Abdelwaheb, Houssem, Ayoub, Abdelhadi, Sidahmed, djaafer*,* ***Walid*** *et mes chers binômes* ***Abderrahmane et Mohamed.***

Hadjer, Lilia, Nadia, Kaouther, Amira, Chaimaa, Noussaiba.

A tous les membres de la famille **Kameli et Moussaoui** et mes chers cousins et mes cousines.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

Youcef

Résumé

Le but de cette étude est déterminé et évaluer l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits proviennent de plantes médicinales, l'écorce d'oronge de l'espèce *Citrus sinensis* et *Thymus vulgaris* et *Santolina chamaecyparissus.* L'extraction se fait par deux méthodes hydrodistillation et macération. Les extraits ont été préparés, par deux solvants ; acétone et éthanol et l'extrait aqueux. Le pouvoir antimicrobien des extraits de Citrus et thym et santoline et leurs associations a été évalué, *in vitro,* vis-à-vis de 10 souches microbiennes, par la méthode de diffusion des disques et des cylindres sur milieu solide. Ensuite dans note étude on fait l'analyse physicochimique CGMS au niveau de la police scientifique château neuve Cheraga Alger. L'étude et porté sur un screening de ces plant pour leur activité antioxydant évaluée in vitro par le test : action antiradicalaire contre le radical DPPH. Ainsi que l'activité anti-inflammatoires et la toxicité de notre extrait et produit fini fait au niveau de SAIDAL Médéa (laboratoire physicochimie et pharmacotoxico). Enfin a partir de notre extraits aqueux nous avons formulé un gel buvable considéré comme un complément alimentaire d'origine végétative a plusieurs fin thérapeutique : antivirale, antimicrobienne, anti-infection pulmonaire, anti bronchite. Sachant que on a testé notre gel sur les lapins dans le but de renforcement immunitaire et suivi de paramètre immunologique et hématologique *in vivo.*

Les résultats indiquent que, le meilleur rendement est obtenu par l'extrait Ethanolique 70% Citrus sinensis avec une valeur de 38.15 % Ainsi, les extraits de Citrus et de thym et de santoline ont montré une activité antimicrobienne contre quelque microorganismes testés, la meilleure activité inhibitrice était contre *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 avec des zones d'inhibition significatives entre 20 et 41 mm lors l'utilisation de l'extrait éthanolique de thym. L'analyse par CPG-SM a indiqué plusieurs composants dans les trois extraits. Les valeurs de IC_{50} obtenues par le test de DPPH, sont 2.073 mg/ml pour l'extrait d'écorce d'orange « *Citrus sinensis* »,1.986 mg/ml pour l'extriat de *Santolina chamaecyparissus* et 0.25 mg/ml pour l'extrait de *Thymus vulgaris,* en comparé avec l'IC 50 de l'acide ascorbique qui donne 0.06 mg/ml. L'activité anti-inflammatoires et la toxicité monté un très bon résultat.

Enfin, après la production de notre gel buvable qui testé aux lapins nous avons obtenu des merveilleux résultats montés que notre gel doté d'un pouvoir hépato correcteur et hépato protectrice primordial en plus un régulateur d'immunité.

Mots clés : *Thymus vulgaris, Santolina chamaecyparissus,* antimicrobien, *Citrus sinensis, CGMS, DPPH, anti-inflammatoire, gel buvable.*

Abstract

The aim of this study is to determine and evaluate the antimicrobial and antifungal activity of extracts from medicinal plants, the bark of oronge of the species Citrus sinensis and Thymus vulgaris and Santolina chamaecyparissus. The extraction is done by two methods: hydrodistillation and maceration. The extracts were prepared by two solvents; acetone and ethanol and the aqueous extract. The antimicrobial power of the extracts of Citrus and thyme and santolin and their combinations was evaluated, in vitro, against 10 microbial strains, by the method of diffusion of discs and cylinders on solid medium. Then in note study one made the physicochemical analysis CGMS at the level of the forensic police new castle Cheraga Algiers. The study and concerned a screening of these plants for their antioxydant activity evaluated in vitro by the test: antiradical action against the radical DPPH. As well as the anti-inflammatory activity and the toxicity of our extract and finished product made at the level of SAIDAL Médéa (laboratory physicochemistry and pharmacotoxico). Finally, from our aqueous extracts we have formulated a drinkable gel considered as a food supplement of vegetative origin with several therapeutic purposes: antiviral, antimicrobial, anti-pulmonary infection, anti-bronchitis. Our gelhas been tested on rabbits for the purpose of immune enhancement and monitoring of immunological and haematological parameters in vivo.

The results indicate that, the best performance is obtained by the Ethanolic extract 70% Citrus sinensis with a value of 38.15 % Thus, the extracts of Citrus and thyme and santolin showed antimicrobial activity against some tested microorganisms, the best inhibitory activity was against Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 with significant inhibition zones between 20 and 41 mm when using the Ethanolic extract of thyme. GC-MS analysis indicated several components in all three extracts. The IC50 values obtained by DPPH test, are 2.073 mg/ml for the orange peel extract "Citrus sinensis", 1.986 mg/ml for the Santolina chamaecyparissus extract and 0.25 mg/ml for the Thymus vulgaris extract, in comparison with the IC50 of ascorbic acid which gives 0.06 mg/ml The anti-inflammatory activity and toxicity showed a very good result.

Finally, after the production of our drinkable gel, which was tested on rabbits, we obtained wonderful results showing that our gel has an important hepato-corrective and hepato-protective power and is also an immunity regulator.

Key words: *Thymus vulgaris*, *Santolina chamaecyparissus*, antimicrobial, *Citrus sinensis*, CGMS, DPPH, anti-inflammatory, drinkable gel.

ملخص

تم تحديد الغرض من هذه الدراسة وتقييم النشاط المضاد للميكروبات والفطريات للمستخلصات المستخلصة من النباتات الطبية، يتم الاستخراج .Santolina chamaecyparissus و Thymus vulgaris و Citrus sinensis ولحاء الأنواع بطريقتين من التقطير المائي والتعطين. تم تحضير المستخلصات بمذيلين ؛ الأسيتون والإيثانول والمستخلص المائي. تم تقييم القوة المضادة للميكروبات لمستخلصات الحمضيات والزعتر والسانتولينا وارتباطاتهما، في المختبر، مقابل 10 سلالات ميكروبية، من خلال طريقة انتشار الأقراص والأسطوانات على وسط صلب. ثم في دراستنا نقوم بالتحليل الفيزيائي الكيميائية.

ركزت الدراسة على فحص هذه النباتات. Chateau Cheraga Alger على مستوى الشرطة العلمية الجديدة CGMS .DPPH لنشاطها المضاد للأكسدة الذي تم تقييمه في المختبر عن طريق الاختبار: عمل مضاد للجذور الحرة ضد جذور بالإضافة إلى النشاط المضاد للالتهابات الموسمية مستخلصنا ومنتجنا النهائي المصنوع على مستوى صيدال المدية مختبر فيزيائي وكيميائي ودوائي.

أخيرًا، من مستخلصاتنا المائية، قمنا بصياغة هلام صالح للشرب يعتبر مكملًا غذائيًا من أصل نباتي لعدة أغراض علاجية: مضاد للفيروسات، مضاد للميكروبات، مضاد للالتهابات الرئوية، مضاد لالتهاب الشعب الهوائية.

مع العلم أننا اختبرنا جلنا على الأرانب لغرض تقوية جهاز المناعة ومراقبة المعلمات المناعية والدموية في الجسم الحي.

أشارت النتائج إلى أن أفضل محصول حصل عليه المستخلص الإيثانولي 70 ٪ حمضيات سينينسيس بقيمة 38.15 ٪ وهكذا أظهرت مستخلصات الحمضيات والزعتر والسانتولينا نشاطًا مضادًا للميكروبات ضد بعض الكائنات الحية الدقيقة المختبرة مع مناطق تثبيط كبيرة بين Staphylococcus epidermidis. ATCC ، وأفضل مثبط للنشاط كان ضد بكتيريا 12228 إلى عدة مكونات في جميع المقتطفات CPG-MS 20 و 41 ملم عند استخدام مستخلص الزعتر الإيثانولي. أشار تحليل Citrus " هي 2.073 مجم / مل لمستخلص قشر البرتقال DPPH التي تم الحصول عليها باختبار IC الثلاثة. قيم 50 لمستخلص مستخلص mg / ml و 0.25 1.986 Santolina chamaecyparissus مجم / مل لمستخلص، sinensis" لحمض الاسكوربيك الذي يعطي 0.06 مجم / مل. أدى النشاط المضاد للالتهابات IC مقارنة مع 50 ، Thymus vulgaris والسمية إلى نتيجة جيدة للغاية .

أخيرًا ، بعد إنتاج الجل الفموي الذي تم اختباره على الأرانب ، حصلنا على نتائج رائعة مع هلامنا الذي يتمتع بقوة تصحيحية للكبد وقوة واقية من الكبد بالإضافة إلى منظم المناعة .

الكلمات المفتاحية : الزعتر، الشيح، مضاد للمكروبات، البرتقال، كروماتوغرافيا الغازية الطيف الكتلي *CGMS*، ارجاع الجذر الحر *DPPH* ، مضاد الالتهاب، هلام للشرب.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 1	L'orange (*Citrus sinensis*)	**9**
Figure 2	**A-** feuilles et branches d'orange / **B -** les fleurs des oranges	**10**
Figure 3	Classification systématique des agrumes	**10**
Figure 4	**(A)** Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange **/(B)** écorces d'oronge.	**13**
Figure 5	Structure du phénol **(Macheix et al., 2006)**	**14**
Figure 6	Structure de base des flavonoïdes ***(Erdman et al., 2007).***	**15**
Figure 7	Structure de base de la **Naringenine et l'hesperidine**	**16**
Figure 8	Structures chimiques des acides phénoliques (**Manach et *al*., 2004**)	**16**
Figure 9	La plante et la Classification de *Thymus* vulgaris	**18**
Figure 10	Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L	**19**
Figure 11	**(A)** thymus vulgaris Frais / **(B)** thymus vulgaris sèches (Kuete V.2013).	**20**
Figure 12	Les ingrédients actifs de l'extrait de thym, Structures chimiques du thymol et du carvacrol **(Schwammle et *al., 2001).***	**21**
Figure 13	La plante et la Classification de *Santolina chamaecyparissus* L.	**25**
Figure 14	Aspect morphologique de la plante *Santolina chamaecyparissus.*	**26**
Figure 15	**S**chéma représentant le pouvoir inhibiteur de l'hespéridines contre le coronavirus (SARS-CoV-2) covid-19	**31**
Figure 16	Présente les plantes utiliser : *(1) Citrus sinensis (2) Thymus vulgaris (3) santolina chamaecyparissus*	**46**
Figure 17	Broyage d'écorce d'orange *Citrus sinensis* séché **(originale 2021)**	**46**
Figure 18	Souris Albinos, la race NMRI **(Original, 2021**).	**47**
Figure 19	Lapin de la race géant des Flandres **(Original, 2021**)	**47**
Figure 20	Les étapes de l'extraction (1) prise de poids, (2) macération, (3) filtration, (4) le filtrat (extrait)	**48**
Figure 21	Les étapes de l'extraction (1) prise de poids, (2) macération, (3) filtration, (4) le filtrat	**49**
Figure 22	Rotavaporation par « évaporateur rotatif »	**50**
Figure 23	Un montage d'hydrodistillation	**51**
Figure 24	Décantation par ampoule à décanter	**52**

Figure 25	Les souches bactériennes de référence (l'American Type Culture Collection « ATCC ») laboratoire microbiologie, Saidal à Médéa **(Original 2021).**	**54**
Figure 26	Fisher-Lilly « Antibiotic Zone Reader » **(Original 2021).**	**57**
Figure 27	Schéma représentatif de l'aromatogramme	**57**
Figure 28	Schéma de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant	**58**
Figure 29	Solution éthanolique du DPPH	**59**
Figure 30	(A) Injection sub-plantaire de la carragénine, (B) Principe de gavage des souris. **(Original 2021)**.	**62**
Figure 31	Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital **(Original)**	**63**
Figure 32	homogénéisateur de type IKA T 25 ULTRA-TURRAX **(Original 2021)**.	**65**
Figure 33	pH-mètre pour mesurer le **pH** du gel **(Original2021)**.	**65**
Figure 34	Viscosimètre de type BROOK FIELD **(Original 2021)**.	**66**
Figure 35	Technique de prélèvement du sang, d'après la veine marginale de l'oreille du lapin.	**68**
Figure 36	Les étapes de test antigénique sur les lapins **(originale 2021).**	**70**
Figure 37	Principe de gavage des lapins.	**71**
Figure 38	Histogramme du rendement d'extraits aqueux	**74**
Figure 39	Histogramme du rendement d'extraits éthanol/eau 70%+30%	**74**
Figure 40	Histogramme du rendement d'Extraction des huiles essentielles	**76**
Figure 41	Chromatogramme de l'extrait éthanolique d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* par macération.	**77**
Figure 42	Spectre masse de D-Limonène dont le temps de rétention 8.40 min.	**77**
Figure 43	Spectre masse de de 4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy2-methyl dont le temps de rétention 10.33mn	**78**
Figure 44	Spectre masse de 4H –pyran-4-one, 2,3-dihydro- 3,5-dihydroxy-6-methyl dont le temps de rétention 12.20mn.	**78**
Figure 45	Spectre masse de 5-Hydroxymethyl Furfural dont le temps de rétention 15.35 mn	**79**
Figure 46	Spectre masse de 5-Azido-2.3-epoxycyclopentan-1-ol dont le temps de	**79**

	rétention 23.75 mn.	
Figure 47	Spectre masse de N-HEXADECANOIC ACID dont le temps de rétention 36.28mn.	**80**
Figure 48	Spectre masse de 9, 12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) dont le temps de rétention 40.36mn.	**80**
Figure 49	Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *thymus vulgaris* par macération	**82**
Figure 50	Spectre masse de THYMOL dont le temps de rétention 17.57mn.	**82**
Figure 51	Spectre masse de Carvacrol dont le temps de rétention 17.57mn.	**83**
Figure 52	Spectre masse de P-TERT -BUTYL CATECHOL dont le temps de rétention 22.09mn	**83**
Figure 53	Spectre masse de N-HEXADECANOIC ACID dont le temps de rétention 36.38mn.	**84**
Figure 54	Spectre masse de 9, 12-OCT ADECADIENOIC ACID (Z, Z) dont le temps de rétention 40.47mn.	**84**
Figure 55	Spectre masse de 13 -OCT ADECENAL, (Z) dont le temps de rétention 40.67mn	**85**
Figure 56	Spectre masse d'OLEIC ACID dont le temps de rétention 41.04mn.	**85**
Figure 57	Chromatogramme de l'extrait éthanolique de ***santolina chamaecyparissus*** par macération	**86**
Figure 58	Spectre masse de 1 ,5-HEPTADIEN-4-ONE, 3, 3,6-TRIMETHYL dont le temps de rétention 22.45mn.	**87**
Figure 59	Spectre masse de CURCUMENE dont le temps de rétention 23.26mn	**87**
Figure 60	Spectre masse de Beta-copaene dont le temps de rétention 23.35mn	**88**
Figure 61	Spectre masse de 1 ,6-GERTMACRADIEN-5-OL dont le temps de rétention 24.51mn.	**88**
Figure 62	Spectre masse de Vulgarone A dont le temps de rétention 26.26mn	**89**
Figure 63	Spectre masse de LONGIVERBENONE dont le temps de rétention 28.31mn.	**89**
Figure 64	Spectre masse de Caryophyllene oxide dont le temps de rétention 29.43mn	**90**
Figure 65	Spectre masse de Beta-Costal dont le temps de rétention 30.94mn	**90**
Figure 66	Spectre masse de 1,6-Dioxaspiro [4.4] nona-2,8-diene, 7-(2,4-	**91**

	hexadiynylidene)- dont le temps de rétention 32.48mn.	
Figure 67	Spectre masse de Caryophyllene oxide dont le temps de rétention 34.20mn.	**91**
Figure 68	Spectre masse d'Aromadendrene dont le temps de rétention 35.85mn.	**92**
Figure 69	Spectre masse de 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate dont le temps de rétention 37.54mn	**92**
Figure 70	Spectre masse de 1-Cyclopropyl-2-nonene-1-one dont le temps de rétention 38.24mn	**93**
Figure 71	Spectre masse de Megastigma-5,7-diene-3,4,9-triol dont le temps de rétention 38.88mn	**93**
Figure 72	Spectre masse de (2S,6R')-2-(6-Methylnonyl)oxirane dont le temps de rétention 40.32mn	**94**
Figure 73	Présente l'effet antimicrobien des huiles essentielle de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739*	**97**
Figure 74	Diagramme présent l'activité antibactérienne des huiles essentielles	**98**
Figure 75	Présente l'effet antimicrobien des extraits d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763	**101**
Figure 76	Présente l'effet antimicrobien des extraits *Thymus vulgaris* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763	**102**
Figure 77	Présente l'effet antimicrobien des extraits *Santolina chamacyparissus* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC*	**104**

	8739. Salmonella typhimurium ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763	
Figure 78	Présente l'effet antimicrobien de notre gel Orthymosan sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763	**105**
Figure 79	Résultats de DPPH d'extrait de *Thymus vulgaris* à différentes concentrations	**108**
Figure 80	Activité antiradicalaire d'extraits de l'écorce de citrus sinensis	**108**
Figure 81	Activités anti radicalaire d'extraits de *thymus vulgaris*	**109**
Figure 82	Activités anti radicalaires d'extraits de santolina chamaecyparissus	**109**
Figure 83	Histogramme représente l'IC 50 de test antioxydant par DPPH	**111**
Figure 84	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	**111**
Figure 85	Activité antioxydant de l'acide ascorbique	**112**
Figure 86	Graphe qui montre l'évolution des épaisseurs des pattes, pour les 4	**115**
Figure 87	Résultat de Test antigénique (Ag) **(originale 2021)**	**118**
Figure 88	Histogramme représenter les globules blancs des lapins avant (1) et après (2) le gavage	**120**
Figure 89	Histogramme représenter les globules rouges des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[4-8])**	**120**
Figure 90	Histogramme représenter les Neutrophiles des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[35-55])**	**121**
Figure 91	Histogramme représenter les EOSINOPHILE des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[0-5])**	**121**
Figure 92	Histogramme représenter les plaquettes des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[290-650])**	**122**
Figure 93	**S**chéma représentant le pouvoir inhibiteur de l'hespéridines contre le coronavirus (SARS-CoV-2) covid-19 **(Bellavite & Donzelli, 2020)**	**122**

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
Tableau 1	Les caractéristiques générales de l'espèce *citrus sinensis*	**9**
Tableau 2	La production de l'orange dans le bassin méditerranéen entre 1994 et 2018.	**11**
Tableau 3	Principaux composés de l'orange **(Anonyme, 2007)**	**12**
Tableau 4	Teneur en polyphénols (en µg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišic et al., 2006)	**22**
Tableau 5	Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L.	**22**
Tableau 6	Les souches microbiennes utilisées	**54**
Tableau 7	Les produits utilisés dans la formulation d'orthymosan	**64**
Tableau 8	Les produits utilisés dans la formulation de Tamsonat plus	**64**
Tableau 9	Paramètres physiologiques des lapins **(Derelanko & Rusch, 2008).**	**68**
Tableau 10	Intervalle des mesures typiques du sérum chez des lapins **(Derelanko & Rusch, 2008).**	**69**
Tableau 11	Pourcentage leucocytaire général des lapins **(Harcourt B, Frances, 2002).**	**69**
Tableau 12	Présente les rendements obtenus	**73**
Tableau 13	Les molécules composant l'extrait d'écorce d'orange de (*Citrus sinensis)* obtenu par analyse CG-MS	**81**
Tableau 14	Les molécules composant l'extrait d'écorce d'orange de (*Citrus sinensis)* obtenu par analyse CG-MS	**86**
Tableau 15	Les molécules composant l'extrait *santolina chamaecyparissus* obtenu par analyse CG-MS	**94**
Tableau 16	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, AMC : Amoxicilline. (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).	**96**
Tableau 17	Analyse statistique (ANOVA)	**99**
Tableau 18	Activité antibactérienne des extraits de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par	**99**

	les diamètres des zones d'inhibition en mm, avec des antibiotique AMC, AMP, LEV, RIF, NYS (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)	
Tableau 19	Activité antibactérienne des combinaison des extraits de *thymus vulgaris*, Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, avec des antibiotique AMC, AMP, LEV, RIF, NYS (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).	**106**
Tableau 20	l'IC50 de test DPPH pour nos extraits	**110**
Tableau 21	Résultats de la toxicité aigüe de notre gel buvable après 15 jours	**113**
Tableau 22	Lot I : mis en évidence de l'effet de l'extrait pure (contient 1ml de chaque extrait)	**113**
Tableau 23	Lot II : Témoin positive (effet du médicament de référence le Diclofénac®)	**114**
Tableau 24	Lot III : mis en évidence de l'effet de l'extrait diluée (contient 0.5ml de chaque extrait + 3.5ml de l'eau distillé)	**114**
Tableau 25	Lot IV : mis en évidence de l'effet phlogogène de la carraghénine (administré par solution physiologique)	**115**
Tableau 26	Les résultats de contrôle du pH et la viscosité de formulation **« Orthymosan »**	**117**
Tableau 27	Présenté le bilan hépatique	**120**

Liste des abréviations

Abs : Absorption

IC50 : Concentration Inhibitrice 50

D.O : Densité Optique

DPPH : radical 1, 1-Diphényl-2 picrylhydrazyl

e- : électron

R : rendement

µg : Microgramme

ML : millilitre.

% : pourcentage

FAO : Food and Agriculture Organisation of the United Nations /L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

OMS : Organisation mondiale de la santé

CMI : concentration minimal inhibitrice.

HE : huile essentielle

µM : micro mitre

ATCC : American Type Culture Collection.

G : gram.

Mg : milligramme

MH : Muller Hinton

SB : Sabouraud.

µL : micro litre.

µg : micro gramme.

Mm : millimètre.

UFC : unité formant colonie

TA : extrait acètonique de Thymus vulgaris

TE : extrait ethanolique de Thymus vulgaris

OE : extrait ethanolique d'écorce d'oronge

SE : extrait ethanolique de santolina

ANOVA : analyse de variance.

P : la probabilité de faire une erreur.

AMC : amoxicilline

CEF : cèfazoline

LPS : lipopolysaccharid

DL50 : Dose Létale 50

PI : Pourcentage d'inhibition

CGMS : chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

AOX : Antioxydant

TDR : test diagnostic rapide

Sa : Staphylococcus aureus

Sai : Staphylococcus aureus isolé

Se : Staphylococcus epidermidis

St : Salmonella typhimurium

B1 : Bacillus subtilis

B2 : Bacillus Spizizenii

Pseudo : Pseudomonas aeruginosa

E.coli : Escherichia coli

Ca : Candida albicans

SS : Saccharomyces cerevisiae

Table des matières

Introduction 2

I.1 La phytothérapie 6

I.2 Les plantes médicinales 7

I.3 L'écorce d'orange *Citrus sinensis* 8

I.3.1 Généralité sur les agrumes 8

I.3.2 Origine et histoire les agrumes 8

I.3.3 L'ORANGE 9

I.3.4 Description botanique 10

I.3.5 Classification 10

I.3.6 La production de l'orange dans le monde et en l'Algérie 11

I.3.7 Composition chimique et valeur nutritive d'orange 11

I.3.8 L'écorces d'oronge 12

I.3.9 Composition chimique des écorces d'oronge 13

I.3.9.1 Composés phénoliques 14

I.4 *Thymus vulgaris* L. 16

I.4.1 Généralité 16

I.4.2 Classification 18

I.4.3 Description botanique 18

I.4.4 Distribution mondiale de thymus 19

I.4.5 Composition chimique 20

I.4.6 Utilisation de *Thymus vulgaris* 22

I.5 Santolina chamaecyparissus L. 24

I.5.1 Généralités 24

I.5.2 Caractères diagnostiques 24

I.5.3 Classification de la plante *Santolina chamaecyparissus* 25

I.5.5 Propriétés biologiques 26

I.5.6 Phytochimie 26
I.5.7 Composition chimique 27
I.5.8 Usage traditionnel 27
II.1 Pharmacologie et toxicologie des écorces d'orange 30
II.1.1 Activité antibactérienne 30
II.1.2 Activité antivirale 31
II.1.3 Activité antifongique 31
II.1.4 Activité antioxydante 32
II.1.5 Activité antiparasitaire 32
II.1.6 Activité antiallergique 33
II.1.7 Activité dans le système cardiovasculaire 33
II.1.8 Activité anti-cancer 34
II.2 Pharmacologie et toxicologie de *Thymus Vulgaris* 34
II.2.1 Activité antibactérienne 35
II.2.2 Activité antifongique 36
II.2.3 Activité antivirale 36
II.2.4 Activité antioxydante 37
II.2.5 Activité anti-tumorale 39
II.2.6 Activité d'irritation anti-gastrique 40
II.3 Pharmacologie de santolina chamaecyparissus 40
II.3.1 Activité antibactérienne 40
II.3.2 Activité anti inflammatoire 41
II.3.3 Activité antitumorale 41
II.3.4 Activités antidiabétiques et anticancéreuse 42
II.3.5 Activité hépatoprotectrice 42
III.1 Matériel 44
III.1.1 Matériel du laboratoire 44

III.1.2 Produit 45
III.2 Matériel végétal 45
III.2.1 Récolte 45
III.2.2 Séchage 45
III.2.3 Broyage et conservation 46
III.3 Animaux 47
III.4 Procédés d'extraction 48
III.4.1 Méthode d'extraction par macération 48
III.4.1.1 Extraction aqueuse 48
III.4.1.2 Extraction par solvant 48
III.4.2 Méthode extraction des huiles essentielles 50
III.4.2.1 Extraction par Hydrodistillation 50
III.4.2.2 Isolation des huiles essentielles 51
III.4.2.3 Calcul du rendement en huile essentielle 52
III.5 Etude physicochimique des extraits 52
III.5.1 Méthode chromatographique et spectroscopique de séparation et d'identification 52
III.5.1.1 Analyse de CG MS 52
III.5.1.2 Méthode CG-MS 53
III.6 Etude microbiologique 53
III.6.1 Activité antimicrobienne des extraits 53
III.6.1.1 Méthodes de diffusion sur milieu solide 55
IV.7 Détermination du potentiel antioxydant 58
IV.7.1 Détermination de l'activité antioxydante par le test au DPPH 58
III.7.2 Préparation des échantillons d'acide ascorbique 60
III.8 Etude de l'effet anti-inflammatoire 61
III.8.1 Test de l'œdème plantaire induit par carragénine 61
III.9 Application à la formulation 63

III.9.1 Formulation d'un Gel buvable à base des extraits aqueux 63
III.9.1.1 Formulation 64
III.9.1.2 Caractérisation du gel buvable 65
III.10 Etude de la toxicité aigue 66
III.11 Evaluation du gel buvable par le suivi de paramètre immunologique et hématologique chez les lapins du laboratoire 67
IV.1 Analyse physicochimique des extraits 73
IV.1.1 Rendements des extraits 73
IV.1.2 Analyse de la composition chimique 76
n) Megastigma-5,7-diene-3, 4, 9-triol : Temps de rétention t =38.88mn 93
IV.2 Résultats de la toxicité aigue 112
IV.3 Activité anti-inflammatoire 113
IV.4 Application à la formulation 117
IV.5 Evaluation du gel buvable par le suivi de paramètre immunologique et hématologique chez les lapins du laboratoire 118
IV.5.1 Test antigénique (Ag) pour la détection de covid-19 chez les lapins 118
IV.5.2 Analyse médicale sur les lapins 119
CONCLUSION 124
Référence bibliographique 127

INTRODUCTION

Introduction

Pendant des milliers d'années, les civilisations du monde entier ont utilisé des plantes médicinales pour traiter une variété de maladies. La plus ancienne preuve écrite de l'utilisation de plantes médicinales a été trouvée sur une plaque d'argile sumérienne, d'environ 5000 ans **(Petrovska, 2012)**.

De nos jours, les plantes médicinales traditionnelles continuent d'être la principale source de soins de santé dans de nombreux pays en développement et régions rurales. Les études ethnobotaniques se sont révélées très utiles pour identifier les plantes bioactives, et de plusieurs recherches ont été Menées sur les activités et la composition chimique des plantes ethnomédicinales **(Reverter et al., 2017)**.

Les plantes médicinales et les médicaments dérivés des plantes sont largement utilisés dans les cultures traditionnelles du monde entier et ils deviennent de plus en plus populaires dans la société moderne comme alternatives naturelles ou compléments aux produits chimiques de synthèse.

Les produits naturels et leurs dérivés (y compris les antibiotiques) représentent plus de 50% de tous les médicaments à usage clinique dans le monde. Les plantes supérieures contribuent à pas moins de 25% au total (**Van Wyk et Wink, 2018)**.

Le lien entre les plantes médicinales, l'homme et les médicaments dérivés des plantes médicinales, décrit le passé de l'humanaité. Les plantes médicinales constituent la base généreuse des médicaments naturels **(Omar et al., 2019)**.

De nos jours, dans de nombreux pays du monde, les plantes aromatiques et médicinales ont reçu une attention croissante **(Al-Tawaha et al., 2014)**. En Algérie, de nombreux chercheurs ont étudier et explorer les constituants bioactifs de leur métabolisme secondaire, pour autoriser leur utilisation prolongée en médecine populaire **(Bouzouina et al., 2016).**Avec plus de 3139 espèces **(Quézel et Santa, 1963)**, la flore algérienne est l'une des plus riches d'Afrique du Nord. Parallèlement à sa richesse en biodiversité, l'Algérie a une riche tradition médicale à base de plantes **(Miara et al., 2018)**.

Parmi cette végétation, on trouve un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément qui constituent une source de substances ayant des vertus thérapeutiques diverses, utilisées depuis l'Antiquité dans la pharmacopée traditionnelle et pour l'aromatisation des aliments.

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, la plupart des maladies induites par le stress oxydant

apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes augmente la multiplication mitochondriale de radicaux **(GIRODON *et al.*, 2010).** Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant **(MEDDOUR *et al*., 2013).**

Aussi la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale **(BENBRINIS, 2012**).

Les végétaux furent de plus en plus utilisés pour l'extraction des substances physiologiquement actives ou pouvant être transformées en médicament. Mais avec l'introduction de la chimiothérapie, l'usage des plantes médicinales a connu un certain recul. Cependant l'emploi abusif et souvent incontrôlé de cette chimiothérapie en particulier l'antibiothérapie a fait apparaitre un phénomène de résistance chez la plupart des agents bactériens. Face à ce problème de résistance, l'utilisation de la phytothérapie est de plus en plus d'actualité. La recherche de nouvelles molécules possédant un pouvoir antibactérien est également très active, notamment au niveau des plantes de la pharmacopée africaine **(ATEFBEIBU, 2002).**

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tache très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs **(TEIXEIRA DA SILVA, 2004).**

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse des molécules odorantes et volatiles qui consistent à ce qu'on appelle les huiles essentielles **(B. Reguig 2017)** ces huiles sont utilisées comme une source de molécules bioactifs d'origine naturels jouissantes d'activités biologiques notamment l'activité antimicrobienne, anti oxydantes, antiseptiques et anti-inflammatoires **(G.m.bilal 2015)**

L'objectif de notre travail vise en particulier à étudier l'effet antibactérien, ainsi que d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne des composés bioactifs de ces plantes écorce d'orange « *Citrus sinensis »,* thym *« thymus vulgaris » et* santoilne *« santoilna chaemaparecessus »* extraits par usage des solvants à différents polarités (ethanol, ethanol et l'eau, acétone)

Plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été utilisées lors de cette étude :

- Procéder à des extractions à l'Ethanol, ethanol et l'eau, acétone des principaux composés bioactifs des plantes.
- Suivre les effets antibactériens des extraits decitrus sinensis et thymus vulgaris et santoilna chaemaparecessus cultivés in vitro par la méthode de contact direct sur milieu solide.
- Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de la plante effectuée en comparaison à un ATB.
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).
- Les propriétés physico-chimiques et biologiques comme DPPH et CGMS.
- Formulation d'un gel buvable a à activité antivirale et antimicrobienne.
- La toxicité et l'activité anti-inflammatoire du l'extrait et du gel.

Chapitre I

Généralité sur les plantes médicinales

I.1 La phytothérapie

Étymologiquement, le terme phytothérapie vient de deux racines grecques anciennes "phyton" (plante) et "therapeuein" (cure, soigné). Elle pourrait donc être traduite par l'art de soigner à l'aide des plantes, ou encore la thérapie par le végétal **(Jorite, 2015).** Au sens large la phytothérapie est sans doute la plus vieille médecine du monde **(Iserin, 2001)**. Est une thérapeutique populaire disponible à tous, qui exploite exclusivement et sous diverses formes des plantes reconnues comme faiblement ou pas toxique, grâce à une sélection rigoureuse et attentive opérée à travers l'histoire, dans le traitement des maladies chroniques et les perturbations de tout genre en général, à l'exception des cas très aigus **(Rwangabo, 1993).**

L'efficacité d'un traitement de phytothérapie repose avant tout sur le choix des plantes qui le composent. C'est essentiellement la qualité des plantes **(WHO, 2000)**. La qualité botanique de plante ; qui se caractérisée par l'identification de l'espèce et de la partie active qui possède des propriétés thérapeutiques. Ensuite, la qualité chimique qui est déterminée par la pureté de la plante, la teneur en composants actifs et même la présence des résidus de produit phytosanitaire et les métaux lourds. Enfin, la qualité microbiologique des plantes afin de garantir leur innocuité **(Kudjued-Bunneton et Sauvain, 1989)**.

Il existe différents types de la phytothérapie, à savoir :

- **Aromathérapie :** Cette forme de soins se pratique avec des « huiles essentielles », produits de la distillation à la vapeur d'eau de plantes aromatiques. Il s'agit d'extraire de la plante cette essence à l'odeur particulièrement intense pour s'en servir ensuite en diffusion, en usage externe ou beaucoup plus rarement, en usage interne **(Garreta, 1998). Exemple :** L'administration orale de l'huile essentiel de cumin peut contrôler les complications glycémiques et inflammatoires chez des patients atteints de diabète de type II. De même, l'huile essentielle de cannelle (qui est très forte car dermocaustique) a un effet connu hypoglycémiant et permet de baisser le taux de glucose sanguin.
- **Gemmothérapie :** Provenant du latin "gemmae" qui veut dire "bourgeon" ; est une méthode de traitement fond sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissu embryonnaires et/ou jeunes des végétaux tel que les bourgeons et les radicelles **(Viriot, 2015). Exemple :** le bourgeon d'aubépine, une plante fréquemment utilisée en gemmothérapie, posséderait à la fois les propriétés du fruit (action sur le muscle cardiaque) et de la fleur (action sur le rythme cardiaque).
- **Herboristerie :** ce terme décrit un guérisseur traditionnel spécialisé dans l'utilisation des plantes médicinales pour traiter diverses maladies. En attend de lui une grande connaissance de

l'efficacité, de la toxicité, du dosage et de la préparation des plantes médicinales. **(Sofowora, 2010).**

- **Phytothérapie pharmaceutique :** correspond à l'extraction des substances d'origines végétales et par la suite sont dilués dans un solvant tel que l'alcool éthylique. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présents sous forme de sirop, des goutes, des gélules et des lyophilisats **(Sebih, 2019).**
- **Homéopathie :** l'origine de l'homéopathie remonte à la fin du 18e siècle par Samuel Hahnemann, il vient des mots grecs « *homoios* » semblable et « *pathos* » douleur ou maladie. Les traitements homéopathiques étaient destinés à « équilibrer les humeurs de l'organisme par des effets opposés », Hahnemann est développer sa (loi de similitude) une notion suivant laquelle les symptômes de la maladie peuvent être guéris par des doses extrêmement petites de substances produisant des symptômes semblables chez les personnes en bonne santé si on les administre en grande quantité. Les préparations homéopathiques sont formulées suivant le principe d'infinitésimalité en prenant un échantillon d'une substance végétale (minéraux de plantes) et en le diluant de manière répétée avec l'eau, mélange eau/alcool ou du lactose. **(Barrett, 2016).**

I.2 Les plantes médicinales

Selon la définition formulée par le groupe consultatif de l'OMS, les plantes médicinales sont définies comme suit « ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutique ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des drogues utiles **» (Sofowora, 2010).** Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Chabrier, 2010).**

D'après le docteur Al-Snafi, près de 80% de la population mondiale utilise les plantes pour se soigner **(Al-Snafi, 2016)**. En effet le recours aux pratiques de soins traditionnels est très ancré dans les habitudes, pour deux raisons. Le premier est d'ordre curatif : les plantes contiennent des principes actifs qui exercent une action biologique directe sur l'organisme. Le second est d'ordre économique et infrastructurelle : principalement le coût élevé des prestations et des médicaments importés **(Adiko et *al*., 2014).**

I.3 L'écorce d'orange *Citrus sinensis*

I.3.1 Généralité sur les agrumes

Les agrumes possèdent de nombreuses vertus, leur teneur élevée en vitamines, leur faible apport calorique et leur potentiel antioxydant font de ces fruits un aliment très demandé au niveau mondial **(ALIOUANE Fatiha 2015).**

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence **(Tigrine 2016).**

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orange sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en terme culinaire. La couche interne, blanche et spongieuse, est le mésocarpe ou albédo **(Tigrine 2016).**

La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine C. Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces botaniques est en revanche complexes, car les différentes espèces s'hybrident très facilement et sont difficiles à fixer. Le genre Citrus ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces **(Bénédicte et Michel, 2011).**

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées, qui comprend de nombreuses espèces (environs 16000), pour la plupart ligneuses, l'une des caractéristiques de cette famille est la présence dans les fruits de glandes oléifères contenant des essences fortement aromatiques **(Colombo, 2004).**

Les citrus comprennent six espèces orange, mandarines, limettes, pamplemousses, citrons, et kumquats et chaque espèce comporte de nombreuses variétés. De plus, par croisement sont nés de nombreux hybrides, tels que les clémentines, ou les limes (citrons doux) **(Espiard, 2002).**

I.3.2 Origine et histoire les agrumes

« Citrus », plus communément appelés agrumes, sont originaires d'Asie. Ils ont été introduits dans le bassin méditerranéen par Alexandre le Grand. C'est pour cela qu'on les désigne également sous le nom d'Hespéridé qui provient du grec Esperos « le jardin où se trouvaient les fruits succulents ». Plus tard, les agrumes ont été introduits sur la côte et dans

l'Afrique par des échanges commerciaux qu'assuraient les califes arabo-musulmans. Leur entrée, en Amérique, s'est faite par les européens **(Ferhat et al** 2010**).**

I.3.3 L'ORANGE

L'orange est l'un des agrumes le plus répandu au monde et le plus connu**.** C'est le quatrième fruit le plus cultivé au monde **(Escartin, 2008).**

C'est un fruit juteux, sucré, excitant et très riche en vitamine C ; le plus Comestible, on l'utilise pour les salades de fruits, les confitures, ou pour consommer son jus **(Bousbia, 2011).** Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orange pour les lavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou rou violace pour les anthocyanes



Figure 1 : L'orange (*Citrus sinensis*)

Les caractéristiques générales de l'espèce *citrus sinensis* sont récapitulées dans le **tableau 1**

Tableau 1 : Les caractéristiques générales de l'espèce *citrus sinensis*

Espèce	**Variété**	**Caractéristiques générales**
Citrus Sinensis	**Washington** **Thomson Navel**	**.**Aspect général : arbre au port harmonieux et croissance rapide, il peut atteindre de grande taillée pleine terre (7 à 8m) **.**Fleurs : blanches et immaculées, très parfumées. .Feuilles : vert profond, légèrement ailées. **.**Fruits : de forme et de coloration variable en **.**fonction des différents groupes auxquelles ils **.**appartiennent. La pulpe juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés.

I.3.4 Description botanique

Les espèces des agrumes sont de 3 genres principaux du groupe citrinae dans la famille des Rutacées : *Citrus* (agrumes), Forunella et Poncirus **(Baches, 2002)**.



(A) **(B)**

Figure 02 : A- feuilles et branches d'orange / **B -** les fleurs des oranges

I.3.5 Classification

Une classification botanique de *Citrus sinensis* a été récapitulée **(figure 2) (Kimball et Guignard 1999)**

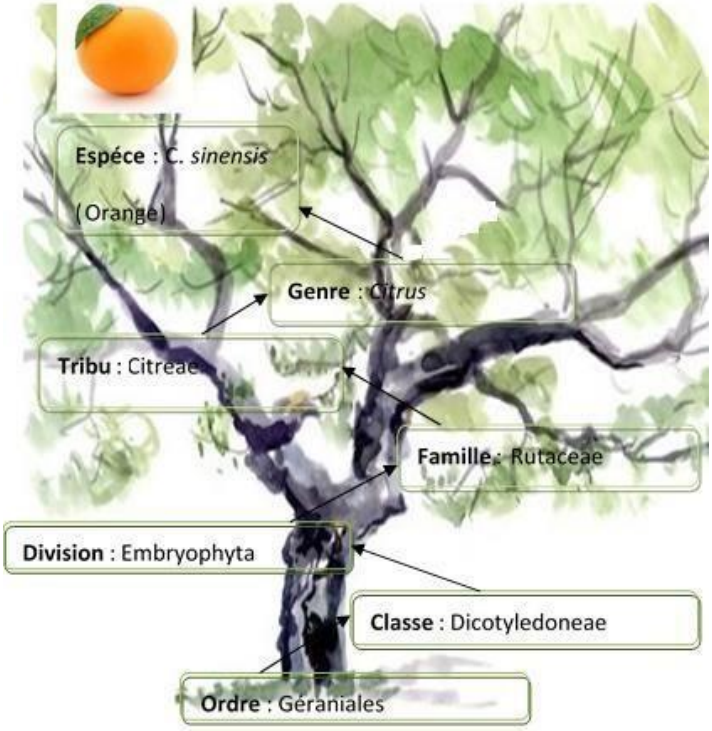


Figure 3 : Classification systématique des agrumes **(Kimball et Guignard 1999)**

I.3.6 La production de l'orange dans le monde et en l'Algérie

La production mondiale d'oranges et d'agrumes tendres devrait légèrement augmenter dans le monde en 2021, tandis que les citrons devraient connaître une baisse, selon un rapport de l'USDA. Au Maroc, le rapport parle d'une augmentation de 30% de la production d'agrumes tendres pour atteindre 1,2 million de tonnes. **(FAO, 2021).**

La production Algérienne d'oranges pour l'année 2018 est estimée de 558573.13 tonnes. Elle occupe la 14ème place dans le monde, la 2éme place dans la région nord-africaine et la 4ème place dans le continent.
Elle occupe la 7ème place dans le bassin méditerranéen selon des études préliminaires entre 1994 et 2018 **(Tableau 2) (FAO, 2020).**

Tableau 2 : La production de l'orange dans le bassin méditerranéen entre 1994 et 2018.

Pays	**Production en milles de tonnes (MT)**
Espagne	2950082.6
Egypte	2203243.4
Italie	1902199.4
Turquie	1411453.4
Grèce	909555.84
Maroc	854095.56
Algérie	558573.16

I.3.7 Composition chimique et valeur nutritive d'orange

L'orange contient de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium, riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (Bousbia, 2011) Les principaux composés de l'orange sont résumes dans le **Tableau 3.**

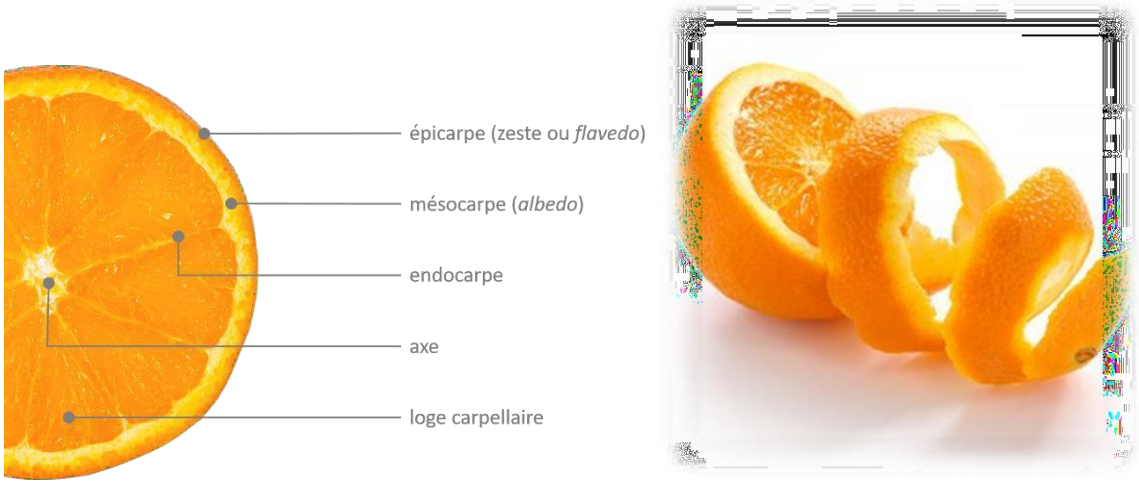
Tableau 3 : Principaux composés de l'orange **(Anonyme, 2007)**

Constituants	Teneurs
Glucides	8.5 à 12 % dans le fruit à maturité, représente par le saccharose (40 %). Fructose et glucose
Acides organiques	1.2 %, surtout de l'acide citrique et de l'acide malique
Autres composés Energétiques	Lipides concentres dans les pépins peu de protéines
Vitamines	Teneur élevée en vitamine C (40 à 80 mg pour 100g). Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B1 et B9, en particulier), vitamine A (0.05 à 0.2 mg pour 100g), vitamine E (0.24mg pour 100g).
Minéraux	Calcium, Magnésium, Potassium et Phosphore
Oligoéléments	Fer, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode, trace de Bore et de Sélénium Fibres
Fibres	Une teneur de 2.4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en pectine (environ 50 %)
Flore mésophile	Levures et lactobacilles indispensables à sa bonne digestion
Substances aromatiques	Ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (aldéhydes, esters), des essences odorantes
Pigments	Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orange pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou violace pour les anthocyanes

I.3.8 L'écorces d'oronge

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orange sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en cuisine. La couche interne, blanchet spongieuse, est le mésocarpe ou albédo. La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine (C). Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltes à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aises à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces botaniques est en revanche complexes, car les différentes espèces s'hybrident très facilement et sont

difficiles à fixer. Le genre Citrus ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces **(Bénédicte et Michel, 2011).**



(A) **(B)**

Figure 4 : (A) Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange **/(B)** écorces d'oronge **(Bénédicte et Michel, 2011).**

I.3.9 Composition chimique des écorces d'oronge

La composition chimique des écorces d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux) **(Hamidi et Limam 2018).**

Les écorces d'orange présentent des teneurs élevées en eau (variant de 2,97-3,79 g/g bs), soit 60% à 75% en base humide) et en sucres solubles (6,52-47,81 g/100g bs). De ce fait, c'est un coproduit hautement périssable qui fermente et présente un développement des moisissures **(Ferhat et al., 2011 ; Kammoun et al., 2011**). De plus, ce coproduit est riche en protéines (1,799,06 g/100g bs) et en minéraux (2,52-10,03 g/100 bs) alors que les lipides sont très peu abondants (de 0,48 jusqu'à 4 g/100g bs) **(Hamidi et Limam 2018).**

Les écorces sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire **(Bampidis & Robinson, 2006).** L'utilisation des écorces fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la

consommation de ce produit (mycotoxicose, para kératose du rumen) **(Duoss-Jennings et *al.*, 2013).**

Les écorces d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles de 0,6 à 1% **(Oreopoulou et *al.*, 2007 ; Yeoh et *al.*, 2008 ; Hosni et *al.*, 2010 ; Farhat et *al.*, 2011).** Les écorces contiennent aussi des pigments, essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20 g/100g bs) mais aussi des anthocyanes (dans le cas des oranges Sanguines) **(Hamidi et Limam 2018).**

D'autre part, plusieurs études montrent que les écorces d'agrumes contiennent aussi des composés biologiquement actifs comme la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) **(Goulas et *al.*, 2012 ; Barros et *al.*, 2012)** et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g bs) **(Ghasemi et *al.*,2009 ; Magda et *al.*, 2008)**. Les écorces d'agrumes sont aussi riches en composés phénoliques (0,67-22,32 g/100g bs) **(Hamidi et Limam 2018).**

I.3.9.1 Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux, non essentiels à la survie de la plante. Au niveau végétal, les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des **plantes (Manach et al., 2004 ; Ignat et al., 2011)**. Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique et d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure **(Figure 5)** et se différencient par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des groupes hydroxyles ainsi que la présence de divers substituant (groupes alkyles, glygosyles, acides organiques…) **(Macheix et al., 2006 ; Hollman et al., 2010).**

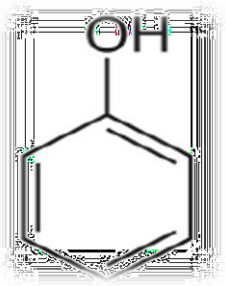


Figure 5 : Structure du phénol **(Macheix et al., 2006)**

Les oranges sont une très bonne source de composés phénoliques **(Balasundram et *al*. 2006)**. Ces derniers se trouvent en grande proportion dans l'écorce (plus de 15% que la pulpe) **(Gorinsteinet *al*, 2001 ; Goulaset Manganaris, 2012).**

On retrouve principalement deux classes de composés phénoliques dans les écorces d'oronge : **les flavonoïdes** et **les acides phénoliques.**

- **A/ Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire possédant un squelette carboné en C6-C3-C6. Ils sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone **(Figure 6)** formant 2 noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle (C) à oxygène dont la nature définit l'appartenance du flavonoïde à un groupe déterminé **(Erdman et al., 2007 ; Ignatet al., 2011).** Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans les écorces d'agrumes sont les flavanones, les flavones et les flavonols. Chaque groupe comprend lui-même de nombreux composés qui différent selon le degré d'hydroxylation et de glycosylation.

Les flavonoïdes individuels majoritaires des écorces de l'orange Maltaise sont : la Néo hespéridine et l'hespéridine qui représente à eux seuls 87,69% des flavonoïdes totaux.

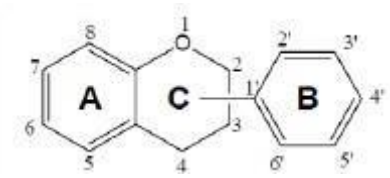
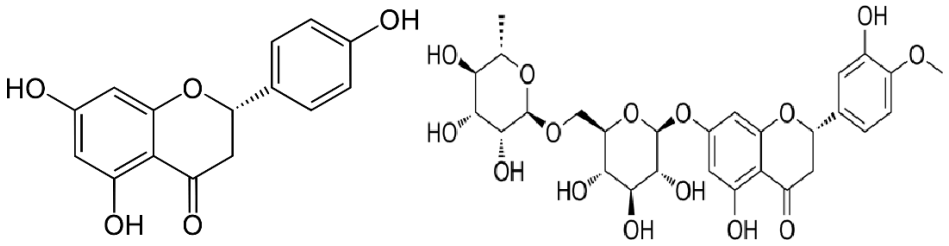


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes ***(Erdman et al., 2007).***

Les flavanones sont rarement présents dans les fruits exceptés dans les agrumes où on les retrouve en grande quantité, concentrées dans les écorces **(Tomas Barberan et Clifford, 2000).** Les flavanones les plus abondantes dans les écorces sont **la naringine, / l'hespéridine.**



Naringenine (R1= OH) **Hesperidine** (R1= OH)

Naringine (R1 = néohespéridoside) **Hespéridine (**R1 = rutinoside)

Figure 7 : Structure de base de la **Naringenine et l'hesperidine (Tomas Barberan et Clifford, 2000)**

- **B/ Les acides phénoliques**

Un acide phénolique est un composé organique qui possède au moins une fonction Carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les acides phénoliques sont divisés en deux Classes : les acides hydrox benzoïques et les acides hydroxy cinnamiques **(Richter, 1993).**

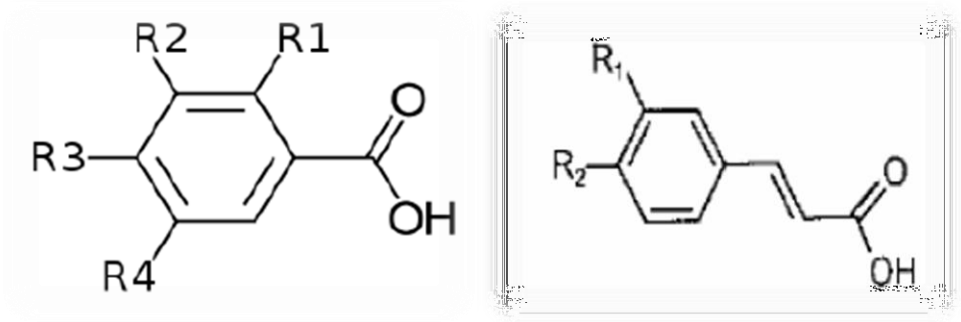


Figure 8 : Structures chimiques des acides phénoliques (**Manach et *al*., 2004**)

I.4 *Thymus vulgaris* L.

I.4.1 Généralité

Le genre Thymus est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen **(Morales, 2002).** Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste Thymus vulgaris L. localement connu "zaatar". En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre ("thym" et "thyme" respectivement) pour désigner l'espèce Thymus vulgaris **(Amiot, 2005).**

Le nom (Thymus) dérive du mot grec « thymos » qui signifie "parfumer" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage **(Pariente, 2001).** L'espèce Thymus vulgaris est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales **(Iserin, 2001).**

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Cette variation peut être quantitative ou qualitative. Un grand nombre d'espèces possèdent des individus dont les composés secondaires varient quantitativement d'un individu à un autre. Par contre, les exemples de variation qualitative, c'est-à-dire l'existence de chémotypes au sens strict dont les individus peuvent porter des molécules de nature chimique différentes les uns des autres, sont moins fréquents. C'est notamment le cas de *Thymus vulgaris* qui exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (exemples : thymol (T), carvacrol (C), …). **(Amiot, 2005**).

Le genre Thymus est connu comme épice et conservateur alimentaire, ainsi qu'un remède protecteur et curatif pour de nombreux produits alimentaires **(Hamdani et al., 2014)**, il présente de nombreuses activités biologiques, celles-ci peuvent être répertoriées comme suit : antibactérien, antifongique, analgésique, carminatif, antioxydant, spasmolytique et anti mutagène **(Messaoudi et al., 2019).**

I.4.2 Classification

D'après **(Goetz et Ghédira 2012),** le thymus est une espèce qui appartient à :

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



Figure 9 : La plante et la Classification de *Thymus* vulgaris

I.4.3 Description botanique

Le thymus est une plante aromatique qui a une tige dressée, pouvant atteindre 40 cm de hauteur **(Hosseinzadeh *et al*. 2015)**. Cette plante possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique **(Bruneton, 1999 ; Morales, 2002) (Fig.2).**

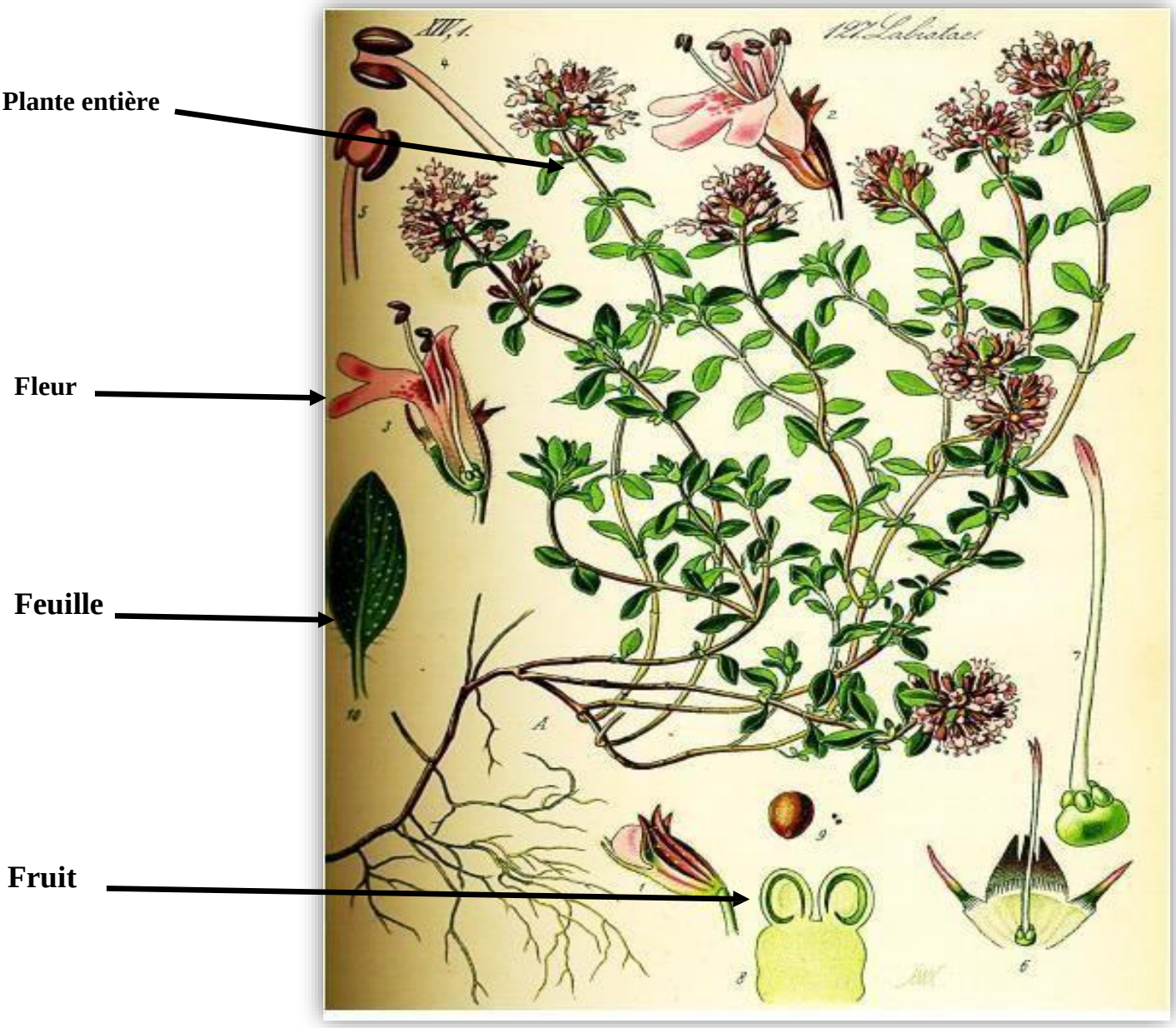


Figure 10 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L

I.4.4 Distribution mondiale de thymus

Le thymus a une distribution mondiale se trouve dans toutes les zones tempérées d'hémisphère nord, il est cultivé dans la plupart des pays européens, tels que la France, l'Espagne, l'Italie, la Bulgarie, il est également bien cultivé dans plusieurs pays africains **(Hosseinzadeh *et al.* 2015)** en Egypte, au Maroc, Algérie, Tunisie, Libye **(Stahl-Biskup et Sáez, 2002),** Cameroun **(Nkouaya Mbanjo *et al.* 2007),** au Nigéria et en Afrique du Sud **(Schmitz, 2015**), et certaines parties de l'Asie. **(Mebarki 2010)**.



(A) **(B)**

Figure 11 : (A) thymus vulgaris Frais / **(B)** thymus vulgaris sèches (Kuete V.2013).

En Algérie, il existe plusieurs espèces de thymus, environ 215 espèces y a compris le *thymus vulgaris* à michelet tizi ouzou, *Thymus algériensis* qui est endémique dans les régions montagneuses et dans le tell d'Algérie, *Thymus fontanesii* se trouve en Est Algérie-Tunisie, *Thymus pallidus* à constantine et dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et beaucoup d'autre espèces **(Mebarki 2010).**

I.4.5 Composition chimique

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *T. vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varis selon la variabilité des conditions géographique, climatique, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intraspécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produit chimique **(Balladin et headley, 1999 ; Amiot, 2005).**

Les constituants phytochimiques du thym comprennent les phénols, les terpénoïdes, et surtout thymol, et les saponines **(Elmir *et al*. 2014)**. L'huile essentielle de thym a montré une haute teneur en monoterpènes oxygénée (56,53%) et faible teneur en hydrocarbures monoterpènes (28,69%), les hydrocarbures sesquiterpène (5,04%) et les sesquiterpènes oxygénés (1,84%) **(Reddy *et al*. 2014).**

Le thymol a généralement été identifié comme étant le principal constituant de *Thymus vulgaris*, accompagné de carvacrol et de linalol **(Palmieri e*t al.* 2020).**

Le composé prédominant parmi les composants de extraits de thymus a été identifiés comme thymol (composé 9 ; 51,34%) tandis que la quantité de tous les autres composants était inférieur

à 19%, par exemple terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 – 6,2 %) **(Reddy et *al.* 2014)**. Les structures chimiques des principaux terpénoïdes de thymus sont présentées dans la figure 12 **(Reddy *et al.* 2014)**.

Le thymol a généralement été identifié comme étant le principal constituant de *Thymus vulgaris*, accompagné de carvacrol et de linalol **(Palmieri et *al.* 2020).** La présence du carvacrol est confirmée par de nombreuses expériences de laboratoire et des recherches effectuées dans plusieurs universités aux États-Unis. L'autre ingrédient actif est le thymol. Ces deux substances chimiques agissent ensemble comme de puissants agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires **(Stahl-Biskup and Venskutonis, 2012)**.

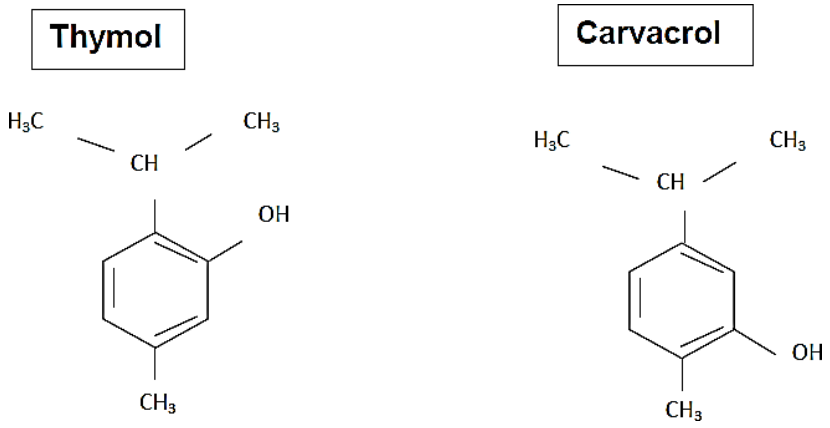


Figure 12 : Les ingrédients actifs de l'extrait de thym, Structures chimiques du thymol et du carvacrol **(Schwammle et *al., 2001).***

D'après **(Kivilompoloet Hyotylainen, 2007 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012),** une partie des principaux constituants d'extraits provient de thym contient également des phénols, tels que l'acide rosmarinique qui contribuent à l'utilisation commerciale de l'herbe d'acide caféique), Environ 25 différents flavonoïdes **(Wang *et al*. 1998; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012; Vila, 2002**) tels que apigénine), lutéoline qui a un effet antimycobactérienne le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuses préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques **(Kulišic et al., 2006)**. Le **tableau 4**, ci-dessous résume les résultats.

Tableau 4 : Teneur en polyphénols (en µg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišic et al., 2006)

Plante	Phénols totaux	Flavonoïdes	Non- flavonoïdes	Catéchines	Anthocyanines
Thymus vulgaris	**33.3**	**25.0**	**8.3**	**1.2**	**6.7**

Les méthodes courantes pour étudier les dérivés de flavonoïdes dans les plantes comprennent l'extraction continue avec plus d'un solvant, plusieurs étapes de distillation fractionnée et différentes techniques chromatographiques pour extraire, séparer, séparer, purifier et identifier les composés cibles. Le tableau 5 répertorie les flavonoïdes trouvés dans les feuilles de thym par plusieurs auteurs utilisant la méthode ci-dessus.

Tableau 5 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L.

Flavonoïdes	**Références**
Cirsilineol (5,4'-dihydroxy-6,7,3'-trimethoxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Morimitsu *et al.*, 1995
Thymonine (5,6,4 '- trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone)	Morimitsu *et al.*, 1995
Eriodictyol (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Morimitsu *et al.*, 1995
Sideritoflavone (5,3',4'-trihydroxy- 6,7,8-trimethoxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Guillén et Manzanos, 1998
5-Desmethylnobiletine (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Guillén et Manzanos, 1998
Apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Kulišic *et al.*, 2006
Lutéoline (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet *et al.*, 1988 Kulišic *et al.*, 2006
Xanthomicrol (5,4'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
5-Desmethylsinensetine (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
Quercetine (3,5,7,3',4'-pentahydrxyflavone)	Morimitsu *et al.*, 1995 Kulišic *et al.*, 2006

I.4.6 Utilisation de *Thymus vulgaris*

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

est exploitée en aromathérapie et dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques **(Tisserand, 2014)**.

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

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

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

Le thym a été utilisé dans les industries alimentaires et aromatiques comme un exhausteur de saveur dans une grande variété d'aliments, de boissons et de produits de confiserie, ainsi que d'un agent de conservation des aliments, en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Outre ces effets, le thym présente une variété d'activités biologiques. **(Zhou *et al.* 2014)**.

I.5 Santolina chamaecyparissus L

I.5.1 Généralités

Santolina chamaecyparissus L. appelée communément la santoline, est une plante vivace appartenant à la famille des Astéracées (composées). En Algérie, elle est connue sous le nom de « Jaada ». Il s'agit d'un sous-arbrisseau qui présente un goût amer et une odeur très forte. Très florifère, la santoline a un parfum proche de la lavande d'où son nom de "Lavande-Coton", et ressemble à un mini cyprès d'où son noms de "Petit Cyprès". Les anciens l'utilisaient pour ses pouvoirs antimites ce qui lui a valu aussi le nom de "Garde-robe". Appelée encore "Aurone femelle" ou "camomille de Mahon", elle faisait partie au Moyen-âge des plantes officinales et a été longtemps cultivée dans les jardins dits de curé. La santoline est originaire de la Méditerranée du sud (le Sud d'Europe et le Nord d'Afrique) **(Kisiel, 2003).** Plus précisément, elle provient des coteaux arides de la région méditerranéenne, des Alpes-Maritimes aux Pyrénées-Orientales, Corse, Espagne, Italie, Dalmatie et l'Afrique septentrionale. Assez rustique, la santoline supporte les embruns, le vent, la sécheresse et ne craint aucune maladie ayant comme seul ennemi l'humidité stagnante.

I.5.2 Caractères diagnostiques

Les santolines sont des plantes méditerranéennes appartenant au genre ***Santolina*** et à la famille des astéracées (composées), dans laquelle, ce qu'on appelle couramment fleur est en réalité une inflorescence, capitule de fleurons reposant sur un involucre de bractées, ce genre comprend quelques espèces, la plus répandue étant de loin ***Santolina chamaecyparissus* L,** appelée aussi ***santoline ou petit-cyprés*.**

I.5.3 Classification de la plante *Santolina chamaecyparissus*

Selon **Barrero en 1999** la classification de ka plante est **:**

- **Règne** Plantae
- **Embranchement** Angiospermes
- **Classe** Dicotylédones
- **Sous classe** Asteridae Gamopétales
- **Ordre** Astérales
- **Division** Magnoliophyta
- **Famille** Asteraceae
- **Genre** Santolina
- **Espèce** *Santolina chamaecyparissus* L.



Figure 13 : La plante et la Classification de *Santolina chamaecyparissus* L **(originale 2021).**

I.5.4 Description botanique

La santoline est un sous-arbrisseau très décoratif et très aromatique de 20 à 60 cm de hauteur, possède de très nombreuses tiges ligneuses très ramifiées qui se développent en touffes denses. Les rameaux minces dressés et pubescents sont couverts de petits poils et munis de feuilles blanchâtres, velues, pubescentes, pennatifides, sessiles, découpées en lobes très courts ne dépassant pas 2 mm sur 2 rangs de part et d'autre de l'axe, subcylindriques ou obovales. Les capitules bombés d'un jaune vif, dépourvus de ligules, larges de 8 à 10mm, sont solitaires au sommet des rameaux Les corolles en tube dilaté à la base et coiffant l'ovaire, sur un réceptacle muni d'écailles étroites et obtuses, sont entourées d'un involucre glabre à bractées portant une nervure saillante sur le dos. Les fruits à 4 angles sont dépourvus d'aigrettes **(Giner Pons et Rios canavate, 2000).**



Figure 14 : Aspect morphologique de la plante *Santolina chamaecyparissus* **(originale 2021).**

I.5.5 Propriétés biologiques

La plante *S. chamaecyparissus* est très prisée en phytothérapie notamment grâce à son importante teneur en composées bioactives qui lui donnent des propriétés médicinales non négligeables **(Da Silva, 2004)**. Les extraits de cette plante ont produit une réduction significative de l'activité spontanée chez les souris et ont montré un effet analgésique **(Giner 1988)**. Ils ont inhibé les contractions induites par différents agonistes incluant l'histamine et la sérotonine chez le muscle lisse isolé, comme ils ont induit des effets anti-inflammatoires dans les essais de l'oedème de la patte induit par la carrageenane (Giner *et al.*, 1989). Par ailleurs, la plante s'est révélé une bonne source de composés inhibiteurs de l'activité de la phospholipase A2 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* **(Sala 2000**). La santoline est aussi utilisée en phytothérapie pour traiter les différents types de dermatites **(Da Silva, 2004)**. Par ailleurs, son huile essentielle a des propriétés antifongiques **(Suresh 1997)** et est utilisée en parfumerie et en cosmétique.

I.5.6 Phytochimie

Plusieurs études phytochimiques réalisées sur le genre Santolina ont permis d'identifier certains composants bioactifs auxquels est attribuée l'activité pharmacologique de cette plante, comme les composés acétyléniques **(Christensen, 1992),** les huiles essentielles **(Djeddi et al., 2012 ; Seo et al., 2014),** les coumarines **(Ferrari et al., 2005)** et les flavonoïdes **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000).** D'autres composés très répandus dans différentes espèces de ce genre sont les sesquiterpènes de type eudesmane, germacrane et farnesane **(Barrero et al., 1999),** les tri-terpènes

de type dammarane **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000),** les hétérocycles acétylènes **(Ferrari et al., 2005)** et les acétylènes de type éther spiroketalenol **(Barrero et al., 1999 ; Ferrari et al., 2005).** Les monotérpènes irréguliers fréquemment rencontrés dans les huiles de Santolina sont : artemisia cétone qui présente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool, chrysanthémyle alcool et parfois lavandulol **(Cherchi et al., 2001 ; Pala-Paul et al., 2012 ; Seo et al., 2014).** Des flavones comme l'apigenine, la lutéoline ainsi que leurs glucosides (glucoronides et ramnoglucosides), des flavanes methoxylés comme le pectolinaringinine, hispiduline, nepetine et jaceosidine et des flavonols methoxylés en position 7 glucosyl ont été aussi isolés à partir de *S. chamaecyparissus* **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000).**

I.5.7 Composition chimique

Le genre Santolina est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région Méditerranéenne **(Derbesy 1989)**. Plusieurs espèces ont été investiguées phytochimiquement et un nombre de composés acétyléniques **(Christensen, 1992**), d'huiles essentielles (**Sala 2000)**, de coumarines (Ferrari *et al.,* 2005) et de flavonoïdes **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000)** ont été identifiés. Il parait que les composés phytochimiques les plus répandus dans différentes espèces de ce genre ayant des activités pharmacologiques sont des sesquiterpènes de type eudesmane, de type germacrane et de type farnesane **(Sanz 1991 ; Barrero 1999)**, des tri-terpènes de type dammarane **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000),** des hétérocycles acétylènes **(Ferrari 2005)** et des acétylènes de type éther spiroketalenol **(Barrero 1999 ; Ferrari, 2005)**. Les monotérpènes irréguliers fréquemment rencontrés dans les huiles de *Santolina* sont : artemisia cétone qui présente plus de 60% de la composition chimique de l'huile, artemisia alcool, artemisia triène, santolina triène, santolina alcool, yomogi alcool, chrysanthémyle alcool et parfois lavandulol **(Pala- Paul 1999 ; Cherchi 2001)**. Des flavones comme l'apigenine, la lutéoline ainsi que leurs glucosides (glucoronides et ramnoglucosides), des flavanes methoxylés comme le pectolinaringinine, hispiduline, nepetine et jaceosidine et des flavonoles methoxylés en position 7 glucosyl ont été aussi isolés à partir de *S. chamaecyparissus* **(Giner Pons et Rios Canavate, 2000).**

I.5.8 Usage traditionnel

Elle est largement utilisée en médecine folklorique grâce à ses propriétés antispasmodiques, analgésiques, désinfectantes, anti-inflammatoires, bactéricides et fongicides **(Da Silva, 2004)**. En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuges pour les enfants et pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les problèmes **menstruels (Gross. 2009**). L'infusion de la santoline a aussi une action insectifuge sur les pucerons, les acariens et les chenilles. La

poudre de la santoline est utilisée localement pour soulager les douleurs liées aux piqures des insectes. Quand elle est appliquée sur les plaies, elle accélère la cicatrisation **(Ahuja 2005 ; Lopez 2008)**. La santoline est largement utilisée dans les cas de maux de tête, maux de ventre, comme dépurative, tranquillisante et digestive pour les moutons **(Akerreta 2007)**

Afrique du Nord, elle est utilisée de manière traditionnelle comme remède anthelminthique et comme antispasmodique. En Navarre, dans la péninsule ibérique, les inflorescences sont utilisées sous forme d'infusion pour plusieurs applications : le traitement des troubles digestifs, en ophtalmologie pour le nettoyage oculaire, et pour traiter les céphalées et les catarrhes. Selon les dires de la médecine populaire, cette infusion serait un « remède à tout » **(Cavero R.Y., Akerreta 2011).**

Chapitre II

Pharmacologie et Toxicologie

II.1 Pharmacologie et toxicologie des écorces d'orange

Les Citrus contiennent des quantités élevées de composes qui ont des effets bénéfiques pour la sante, y compris les polyphénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols **(Ercan et al., 2011).** Ils ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et pour la fabrication des produits comestibles **(Choi et al., 2007).** Comme ils présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse **(Del-rio étal., 2004).**

II.1.1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle, des extraits bruts et des composés purs de *C. sinensis* a été démontrée dans plusieurs études. Des nanoparticules d'argent synthétisées à 25 ° C et 60 ° C à l'aide d'extrait aqueux de peau de *C. sinensis*, ont montré diverses zones d'inhibition en utilisant la méthode de diffusion en puits d'agar contre *Escherichia coli* (25 ° C 12,5 mm, 60 ° C 16,0 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (25 ° C 11,7 mm, 60 ° C 13,4 mm) et *Staphylococcus aureus* (25 ° C 7,8 mm, 60 ° C 9,2) **(Kaviya S et al 2011).**

Peler l'extrait d'hexane de *C. sinensis a* montré une activité antimycobactérienne contre les variants sensibles aux médicaments (CMI 200 µg / mL), résistants à l'isoniazide (CMI 25 µg / mL) et résistants à l'éthambutol (CMI 50 µg / mL) de *Mycobacterium tuberculosis*H37Rv **(Kaviya S et al 2011).**

Dans cette étude, les médicaments standards ont montré une meilleure activité que les extraits testés. Cependant, à partir de l'extrait le plus actif, il est possible d'obtenir des composés avec une meilleure activité que les médicaments standards **(Camacho-Corona et al., 2008)** Des extraits d'acétone et d'hexane de feuille de *C. sinensis* ont montré des zones d'inhibition de 27 mm vers **Helicobacter pylori**. De la **clarithromycine** (0,05 µg / mL) a été ajoutée comme contrôle positif, et cet antibiotique a montré une meilleure activité que les extraits testés. Il est important de souligner que les extraits actifs pourraient contenir des composés ayant une meilleure activité **(Guzeldag G et al., 2014)**

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antibactérienne comme : Hesperetine, l'aglycone d'hespéridine, possède une activité antimicrobienne modérée contre salmonella typhi et salmonella typhimurium **(Tripoli et al. 2007).**

II.1.2 Activité antivirale

Parmi les flavonoïdes, l'hespéridine a récemment attiré l'attention des chercheurs, car elle se lie aux protéines clés du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Plusieurs méthodes de calcul, appliquées indépendamment par différents chercheurs, ont montré que l'hespéridine a une faible énergie de liaison, à la fois avec la protéine du « pic » du coronavirus et avec la principale protéase qui transforme les premières protéines du virus (pp1a et ppa1b) en le complexe responsable pour la réplication virale. L'énergie de liaison de l'hespéridine à ces composants importants est inférieure à celle du lopinavir, du ritonavir et de l'indinavir, ce qui suggère qu'elle pourrait exercer une action antivirale efficace. Par ailleurs, l'hespéridine et l'acide ascorbique neutralisent les effets néfastes des radicaux libres d'oxygène sur les cellules déclenchés par l'infection virale et l'inflammation. Il existe une discussion sur l'efficacité préventive de la vitamine C, à la dose réalisable par l'alimentation, mais des revues récentes suggèrent que cette substance peut être utile en cas de forte charge du système immunitaire causée par une maladie virale **(Bellavite & Donzelli, 2020).**

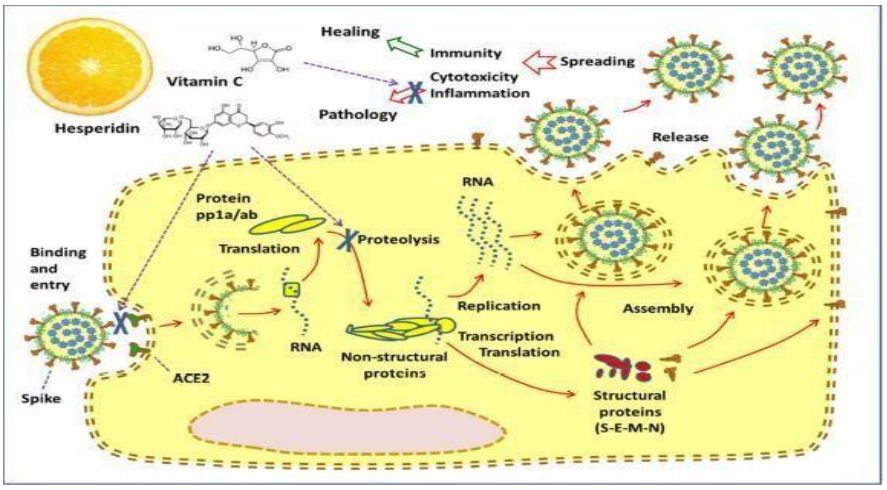


Figure 15 : Schéma représentant le pouvoir inhibiteur de l'hespéridines contre le coronavirus (SARS-CoV-2) covid-19 **(Bellavite & Donzelli, 2020).**

II.1.3 Activité antifongique

Une activité antifongique d'extraits bruts de plantes, d'huiles et de métabolites secondaires de *C* sinensis a été signalée. Le composé 3- [4-hydroxy, 3- (3-méthyl-2-buténynl) -phényle] -2- (*E*) -pro pénal isolé à partir d'extrait d'hexane de peau lésée de *C. sinensis* L. Osbeck cv . Valence ou *C. paradisa* MacFaden cv. Marsh a montré une activité contre *Penicillium digitatum* et contre *Cladosporium cucumerinum* sur des plaques Si gel tlc en utilisant 7 µg de composé Des extraits aqueux, à l'éthanol et à l'éther de pétrole de *C. sinensis* L.

(Osbeck) ont montré une activité contre *Candida albicans* (**Van-Hung P., Chi PT, Phi NT 2013).**

Les huiles essentielles hydrodistillées de six variétés différentes de *C. sinensis* ont montré une efficacité antifongique contre *P. digitatum* (ED 50 2389,9–1004,6 ppm) et *P. italicum* (ED 50 5407,5–3142,2 ppm). L'huile essentielle de pelures obtenues par pressage à froid a montré une activité contre *Mucor hiemalis* , *P. expansum* et *F. proliferatum* ayant une inhibition de 36,5%, 34,9% et 59,5% en utilisant la technique de dilution de gélose (**Van-Hung P., Chi PT, Phi NT 2013).**

II.1.4 Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode du DPPH. Les résultats montrent que la capacité antioxydante de ces huiles essentielles varie significativement (*p ≤ 0,05) en fonction du cultivar. Les valeurs varient de 50,94 % à 74,47 %.**(Lagha-Benamrouche et al., 2017).**

L'activité antioxydante des huiles essentielles des écorces est exprimée en CE50. Cette valeur est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante. Ces CE50 sont déterminées graphiquement dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage. Une faible CE50 correspond à un fort pouvoir scavenger. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE50 est petite [19, 36] **(Lagha-Benamrouche et al., 2017).**

II.1.5 Activité antiparasitaire

Les maladies parasitaires sont de graves problèmes de santé publique dans le monde, et C. sinensis est une alternative dans le traitement et le contrôle de ces maladies. L'hexane (IC 50 42,13 µg / mL), le chloroforme (IC 50 88,03 µg / mL), l'acétate d'éthyle (IC 50 26,67 µg / mL), l'acétone (IC 50 > 100 µg / mL) et le méthanol (IC 50 > 100 µg / mL) d'extraits de peau de C. sinensis, ont montré une activité antipaludique modérée contre la souche sensible à la chloroquine (CQ) (3D7) de Plasmodium falciparum. Dans cette étude, divers médicaments standards ont été utilisés : artémisinine (souche 3D7 IC 50 0,0045 µg / mL), chloroquine (souche 3D7 IC 500,021 µg / mL), diphosphate CQ (souche D6 IC 50 0,00311 µg / mL), méfloquine (souche D6 IC 50 0,01608 µg / mL) et quinine (souche 3D7 IC 50 0,02 µg / mL) **(Bagavan A., 2011).**

- Bien que les extraits aient montré une faible activité antiparasitaire, il est nécessaire de séparer, de purifier et d'élucider structurel des composés purs à partir d'extraits et d'huile essentielle de C. sinensis afin de trouver des médicaments antiparasitaires potentiels **(Bagavan A., 2011).**

Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certains nombres de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B **(Manthey *et al*. 2001).**

II.1.6 Activité antiallergique

Les citrus sont également des propriétés antiallergiques qui sont dues a sa richesse en quercitrine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur implique dans les réactions allergiques et l'inflammation **(Gonzalez-Molina et al., 2010)**

II.1.7 Activité dans le système cardiovasculaire

Les variétés de C*itrus* sont une riche source de flavonoïdes alimentaires qui réduisent le risque d'événements cardiovasculaires indésirables. La consommation d'alcool de commerce *C.* du jus (CJS) diminution de la pression artérielle diastolique et systolique à 5,13% (p = 0,03) et -5,91% (p = 0,003) respectivement chez des volontaires en bonne santé en utilisant 500 ml / jour de jus d'orange deux fois par jour pendant quatre semaines. Cependant, l'administration de CSJ naturel pendant quatre semaines n'a pas eu d'effets significatifs sur la pression artérielle diastolique ou systolique (**Asgary S., Keshvari M. 2013)**. Les extraits de feuilles eau-éthanol et acétone de *C. sinensis* ont montré une dépression inotrope sur les oreillettes des cobayes des deux sexes (300–500 g) avec des valeurs de CE 50de 300 µg / ml et 140 µg / ml, respectivement. Les médicaments témoins naloxone (10 µM), propranolol (1,5 µM de sulfate d'atropine), sulfate d'atropine (1 µM de propranolol) n'ont pas modifié l'effet de l'extrait brut (**Oliveira ED, 2005**). En fait, les médicaments cardiovasculaires sont indiqués et / ou utilisés pour traiter de nombreux troubles, affections et maladies affectant le système cardiovasculaire, mais peuvent dans certains cas produire des effets intensifiés, des niveaux toxiques, des effets secondaires et / ou des effets indésirables. Les résultats de ces recherches montrent que les oranges peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques pour traiter cette maladie et pourraient être sans danger (**Asgary S., Keshvari M. 2013)**.

II.1.8 Activité anti-cancer

La littérature scientifique a été sélectionnée pour cette revue dans le but de collecter les preuves expérimentales pertinentes pour les effets anticancéreux de Citrus fruits et leurs flavonoïdes. Les résultats discutés dans cette revue soutiennent fortement leur potentiel en tant qu'agents anticancéreux et peuvent représenter une base scientifique pour développer des nutraceutiques, des compléments alimentaires ou des médicaments complémentaires et alternatifs dans le cadre d'une stratégie pharmacologique multi-cibles en oncologie **(Cirmi et al., 2016).**

II.2 Pharmacologie et toxicologie de *Thymus Vulgaris*

Les huiles essentielles (HE) extraites de plantes aromatiques et médicinales ont suscité une attention particulière pour leurs propriétés bénéfiques **(de Sousa Barros et al., 2015)**. Il a été rapporté que les HE présentent des activités antiseptiques, antibactériennes, antivirales, antioxydantes, antiparasitaires, antifongiques et insecticides importantes **(Chouhan et al., 2017 ; Ma et Yao, 2020),** Le thym est considéré comme une source importante d'huiles essentielles **(Sobeh et al., 2020)**.

La majorité des espèces de thym sont largement utilisées comme herbes médicinales **(Bukvicki et al., 2018)** en raison de leurs propriétés pharmacologiques et biologiques. En médecine indigène, les parties florales et les feuilles des espèces de Thymus ont été largement utilisées comme tisane tonique, carminative, antitussive et antiseptique, ainsi pour traiter le rhume **(Labiad et al., 2017).**

Parmi les diverses propriétés biologiques signalées pour le thym, certaines sont très bien établies, comme les activités antioxydantes, insecticides, antibactériennes, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires **(Sidali et al., 2017)** et anthelminthiques. Le thym a été également recommandé comme un agent de prévention du cancer **(Ghasemi Pirbalouti et al., 2015)**. Toutes ces activités sont liées à la teneur élevée en monoterpènes, en composés phénoliques, en particulier en thymol et le carvacrol et d'autres composés plus ou moins biologiquement actifs dont l'eugénol, le p-cymène, γ-terpinène, linalool, germiniol et broneol **(Sidali et al., 2017).**

Les propriétés pharmacologiques de la plante *Thymus vulgaris* et de ses différents extraits, en particulier l'huile essentielle et l'extrait aqueux, ont était bien étudié. En plus de leurs nombreuses utilisations traditionnelles, la plante et ses extraits ont trouvé de nombreuses

applications industrielles (principalement comme additifs alimentaires) et médicinales **(Hudaib *et al,* 2002).**

II.2.1 Activité antibactérienne

L'huile essentiel de Thymus vulgaris à des concentrations de 16 à 256 µg / mL a présenté une forte activité inhibitrice sur tous les isolats cliniques produisant des zones d'inhibition de 7,5 à 42 mm, mesurées par la méthode de diffusion sur disque d'agar. *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus mutants* étaient les isolats les plus sensibles avec des concentrations inhibitrices minimales de 1,9 et 3,6 µg / mL, respectivement **(Mohammad Mehdi Fani, et Jamshid Kohanteb, 2017).**

Plusieurs scientifiques attribuent l'activité antimicrobienne d'espèces du genre Thymus à la forte concentration de carvacrol dans son huile essentielle. Il a des propriétés biocides qui entraînent des perturbations de la membrane bactérienne. De plus, il peut traverser les membranes cellulaires, atteindre l'intérieur de la cellule et interagir avec les sites intracellulaires vitaux pour les activités antibactériennes **(Hussein et al., 2018).**

Le thymol a également une activité antimicrobienne en raison de sa structure phénolique, et a montré une activité antibactérienne contre certaines souches bactériennes dont *Aeromoans hydrophila* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité antibactérienne est causée par l'inhibition de la croissance, la production de lactate et par la diminution de l'absorption cellulaire du glucose **(Youssif et Hussein, 2014).**

Une autre étude a montré que l'huile essentielle de thym sauvage a des effets bactéricides, mais pas bactériostatiques sur les espèces bactériennes *Escherichia coli, Salmonella Typhi, Shigella ferarie, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Lactobacillus acidophilus, Micrococcus luteus, Staphylococcus albus, Staphylococcus* et *Vibrio cholera.* Cela confirme les résultats antérieurs selon lesquels le thymol est un bon agent antimicrobien **(Hussein et al., 2018).**

Une forte activité antibactérienne de *Thymus vulgaris* est enregistrée contre 120 souches de Staphylococcus, Enterococcus, Genres Escherichia et Pseudomonas. **(Sienkiewicz et al., 2011)**

L'activité antibactérienne *de Thymus vulgaris* est enregistrée contre 14 isolats cliniques de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et d'autre souche bactérienne standard (*B. cereus* ATCC 9634, *E. coli* ATCC 3428, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. aureus* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 33592) **(Tohidpour et al., 2010).**

Les huiles essentielles montrent une plus forte activité par rapport aux extraits chloroformiques **(Abu-Darwish et al., 2012).**

II.2.2 Activité antifongique

La plupart des espèces de thym possèdent une grande quantité de monoterpènes phénoliques ce qui révèle leurs effets fongicides en raison de la présence des composés phénoliques tels que le thymol comme composant principal qui pourraient perturber la membrane cellulaire fongique. Une autre classe de composant qui semble montrer une activité antimicrobienne est les hydrocarbures terpéniques (γ-terpinène). Les huiles essentielles ont la capacité pour pénétrer et perturber la paroi cellulaire fongique et les membranes cytoplasmiques, les perméabiliser et finalement endommager les membranes mitochondriales **(Leal et al., 2017).**

Plusieurs recherches ont révélé que le thym possède un effet contre les champignons. En **2012 De Lira Mota et ses collaborateurs,** ont montré que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est considérée comme un antifongique efficace et pourrait être utilisé pour le traitement du mucor mycose en raison de son interférence avec l'ergostérol provoquant une perturbation de la membrane des champignons et la perte de contenu intracellulaire. Aussi, il inhibe la germination des sporangiospores et le développement de mycélium. L'huile essentielle de thym, riche en thymol et autres substances antifongiques, utilisées pour désinfecter les murs moisis dans les habitations à faible concentration **(Šegvić Klarić et al, 2007**).

Rasooli et Owlia en 2005, ont découvert que les principales cibles des huiles de thym est la paroi cellulaire et la membrane d'*Aspergillus parasiticus*, et ils conduit à ralentir la croissance d'*Aspergillus parasiticus* et sa production d'aflatoxines, en provoquant des dommages irréversibles de la paroi cellulaire, de la membrane et des organites cellulaires du champignon ce qui inactive ensuite les enzymes critiques, provoquant une réaction avec les protéines de la membrane cellulaire ou interrompant fonctionnellement les substances génétiques **(Khafaji, 2018).**

Selon Leal et al en **2017** La *thymus vulgaris* a un effet sur les micro-organismes fongiques suivants : *Candida albicans, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Penicillium chrysogenum.*

II.2.3 Activité antivirale

Un virus est une petite particule infectieuse (20–300 nm), capable d'infecter des cellules d'un autre organisme vivant et se reproduire. Les virus ne peuvent pas se reproduire seuls car

ils ne sont composés que de gènes et d'une enveloppe protéique, et sont parfois entouré d'une enveloppe lipidique. Les infections virales provoquent une réponse immunitaire qui élimine généralement le virus infectant **(Böhme et al., 2014).**

En **2006, Silke Nolkemper et ses collaborateurs**, ont mené une expérience avec des extraits aqueux d'espèces de la famille des Lamiacées examinés pour leur activité antivirale contre le virus Herpès simplex (HSV). L'extrait du thym (*Thymus vulgaris*) a montré une activité inhibitrice contre l'herpès virus simplex type 1 (HSV-1), type 2 (HSV-2) **(Prasanth Reddy et al., 2014).**

L'activité antivirale des huiles essentielles est mal connue. Il existe des rapports sur l'activité de certaines huiles sur les virus. Cependant, ses mécanismes n'ont pas été entièrement décrits. En 2011, Saderi et Abbasi ont observé que l'huile de thym est potentiellement efficace contre les adénovirus **(Adaszyńska-Skwirzyńska et Szczerbińska, 2017).**

Les huiles essentielles (HE) ont suscité une attention particulière pour leurs propriétés antivirales intégrant et, dans certains cas, remplaçant les médicaments conventionnels. *Thymus vulgaris* HE (THE) s'est déjà révélé efficace contre plusieurs virus à ARN, y compris les CoV. Dans la présente étude, l'efficacité antivirale du THE contre le FIPV a été évaluée *in vitro* **(Catella et al., 2021)**.

II.2.4 Activité antioxydante

Un antioxydant est une molécule qui inhibe l'oxydation de différentes molécules. L'oxydation est un processus chimique qui transfère des électrons ou de l'hydrogène d'une substance à un agent oxydant. Les réactions d'oxydation produiront des radicaux libres **(Prasanth Reddy et al., 2014).**

Ces derniers sont des structures atomiques ou moléculaires avec des électrons non appariés. Ils ont un rôle important dans les processus alimentaires, pharmacologiques et biologiques, ainsi que dans diverses conditions physiopathologiques **(Köksal et al., 2017).** Ils peuvent réagir avec les macromolécules comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides résultant des altérations de la structure et de l'activité des molécules biologiquement actives ce qui cause des dommages cellulaires **(Ezzat Abd El-Hack et al., 2016).**

Ces radicaux libres sont impliqués dans la progression d'une variété de troubles chez l'homme, y compris les lésions tissulaires, la mort cellulaire, le cancer, les lésions du système

nerveux central, le vieillissement, l'arthrite, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, les cardiopathies ischémiques, l'obésité, les troubles neuraux, l'inflammation, la gastrite et les lésions de reperfusion de nombreux tissus **(Köksal et al., 2017)**. Inversement, les composés antioxydants peuvent retarder ou inhiber l'oxydation de diverses molécules en inhibant l'initiation ou la propagation d'une réaction oxydative en chaîne et agit comme agents réducteurs, piégeurs de radicaux libres, complexants potentiels de métaux prooxydants, et extincteurs d'oxygène singulet **(Baiano et Del Nobile, 2016).**

Les composés antioxydants peuvent être endogènes ou exogènes. Les antioxydants exogènes doivent être pris par des moyens alimentaires pour compléter les endogènes. De nombreuses plantes, comme les légumes, les fruits et les herbes, sont les principales sources d'antioxydants naturels **(Köksal et al., 2017).** Les antioxydants naturels sont étudiés de manière approfondie pour leur capacité à protéger les organismes et les cellules des dommages induits par le stress oxydatif, ce dernier est considéré comme une cause de vieillissement et de maladies dégénératives **(Elmastas et al., 2006).**

Le thym est une source d'une variété de matières bioactives naturelles, il contient de nombreux flavonoïdes, comme la lutéine, l'apigénine, la naringénine, la lutéoline et la thymonin, en plus du thymol et du carvacrol dans la partie volatile (l'huile essentielle) de la plante. Ces deux composés phénoliques ont été considérés comme des fortes antioxydants **(El-Guendouz et al., 2019).** Plusieurs chercheurs ont évalué l'activité antioxydante par le test de DPPH des différentes espèces de Thymus. Ces études ont montré que la structure chimique des composés phénoliques des huiles essentielles de thym leur permet de donner de l'hydrogène aux radicaux libres ce qui explique leur activité antioxydante **(Nieto, 2017).**

L'activité antioxydante des extraits éthanoliques et aqueux du thym est due aux composants phénoliques non volatils, les plus puissants étant l'acide rosmarinique et le 3′-O- (8 ″ -Zcaffeoyl) -acide rosmarinique. En outre, les composés biphényles sont responsables du pouvoir antioxydant du thym, à savoir le p-cymène 2,3-diol et le p-cymène 2,3-diol 6,6′-dimère, en raison de leurs propriétés donneuses d'électron. À cet égard, les aglycones, l'ériodictyol (flavanone) et la 7-O-méthyl lutéoline et deux glycosides de flavone, à savoir le lutéolin-O-glucoside et l'ériodictyol rutinoside, se sont révélés d'être les flavonoïdes les plus efficaces **(Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012).**

II.2.5 Activité anti-tumorale

De nombreuses études ont montré qu'un grand nombre de terpénoïdes et de composés aromatiques contenus dans les huiles essentielles ont des activités anti-cancéreuses importantes, à la fois sur les lignées cellulaires et sur les tumeurs chez les animaux. L'activité de ces constituants est liée à l'activation de la mort cellulaire (apoptose) induite par les protéines caspases dans les cellules cancéreuses, avec des modifications mineures des cellules saines. De nombreux phénomènes semblent se produire, parmi lesquels : la surexpression et la régulation des enzymes de détoxification du foie, les modifications du potentiel membranaire des cellules cancéreuses et des mitochondries, la production de radicaux libres dans les cellules cancéreuses, l'inhibition de l'angiogenèse et la modification des gènes inducteurs de tumeurs. Ces constituants actifs des huiles essentielles semblent agir en synergie avec la chimiothérapie et la radiothérapie conventionnelles **(Lesgards et al., 2014).**

Plusieurs chercheurs ont montré que le carvacrol de thym est le produit cytotoxique le plus important, testé contre la lignée cellulaire P815 mastocytoma. En effet, les huiles essentielles avec une quantité élevée de carvacrol ont une activité cytotoxique plus importante **(Jaafari et al., 2007).**

En 2007, Ait M'barek et ses collaborateurs ont conclu que l'huile essentielle de thym a des effets cytotoxiques *in vitro* contre les cellules humaines de l'adénocarcinome ovarien qui sont résistantes aux agents chimiothérapeutiques ainsi qu'un effet antitumoral significatif chez la souris, en raison des composants biologiques actifs du thym comme le carvacrol et le thymol. Ce multicomposant de produits naturels est efficace pour prévenir le développement de la tumeur chez la souris et donc retarder la mortalité animale. Le mécanisme des actions cytotoxiques du thym peut être dû à sa nature lipophile, provoquant l'accumulation de composés volatils de plante dans la membrane cellulaire conduisant une augmentation de sa perméabilité, provoquant par la suite une fuite de métabolites et des enzymes **(Khafaji, 2018).**

L'analyse des mécanismes d'action anticancéreuse a inclus des marqueurs diagnostiques et pronostiques bien décrits et validés qui sont utilisés à la fois dans l'approche clinique et la recherche préclinique. À cet égard, les analyses des cellules de carcinome de rat traitées ont montré une diminution de l'expression de CD44 et d'ALDH1A1 et une augmentation de l'expression de Bax. **(Kubatka et al., 2019)**

Les taux de Malo dialdéhyde (MDA) et l'expression du VEGFR-2 ont été diminués dans les carcinomes de rat chez les *T. vulgaris* groupes traités. En ce qui concerne les évaluations des changements épigénétiques dans les tumeurs de rat, nous avons trouvé une diminution du statut de méthylation de la lysine de H3K4me3 dans les deux groupes traités (H3K9m3, H4K20m3 et H4K16ac n'ont pas été modifiés); réglementation à la hausse des expressions miR22, miR34a et miR210 (uniquement à des doses plus élevées); et des réductions significatives du statut de méthylation de quatre promoteurs de gène - ATM sérine / thréonine kinase, également connue sous le nom de gène NPAT (ATM); Famille de domaines d'association Ras 1, isoforme A (RASSF1); homologue de phosphatase et tensine (PTEN); et l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-3 (TIMP3) (le promoteur du facteur de transcription homéodomaine de type apparié (PITX2) n'a pas été modifié). *T. vulgaris* L. a démontré des activités chimiopréventives et thérapeutiques significatives contre le carcinome mammaire expérimental. **(Kubatka et al., 2019)**

Pour terminer, Il a été observé que l'huile essentielle de *T. vulgaris* inhibe considérablement la croissance du carcinome épidermoïde de la cavité buccale humaine. Cet effet s'accompagne de la régulation de la biosynthèse des N-glycanes et de la signalisation extracellulaire de la kinase 5 régulée par le signal (ERK5) et de l'interféron **(Kubatka et al., 2019)**

II.2.6 Activité d'irritation anti-gastrique

Le thym est fréquemment utilisé dans les médecines traditionnelles comme agent qui est efficace pour soulager le patient de l'estomac les irritations. (**Shaily Rastogi et al 2020)** ont fait des recherches sur l'activité du thym huiles essentielles contre la vidange gastrique retardée et constipation chronique chez les rats animaux de laboratoire. Le chercheur a trouvé des activités pharmacologiques positives contre divers troubles gastriques et constipation comme action pharmacologique importante dans les huiles essentielles présentent dans la plante Thymus vulgaris. (**Rtibi, Kais. 2019).**

II.3 Pharmacologie de santolina chamaecyparissus

II.3.1 Activité antibactérienne

Cependant l'huile essentielle possède une forte activité antibactérienne. Par contre l'extrait éthanolique a montré une faible activité antimicrobienne. (**Chirane Manel et all)**

L'huile essentielle de capitule a démontré de puissantes propriétés antibactériennes contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC et *Enterococcus faecalis*ATCC, avec une CMI de 0,625 µg/ml. Ces résultats démontrent que les huiles essentielles de capitules de *S. chamaecyparissus* ont d'excellentes propriétés antibactériennes et pour cette raison, elles pourraient contribuer à diminuer le problème de résistance microbienne aux antibiotiques **(Bel Hadj Salah-Fatnassi et al., 2017).**

Les actions antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles de capitule et de racine de *S. chamaecyparissus* ont été rapportées pour la première fois. Cependant, peu d'études sur les activités antimicrobiennes de *S. chamaecyparissus* ont été précédemment décrites. Une huile essentielle obtenue à partir de l'herbe de *S. chamaecyparissus* L. est efficace pour contrôler la candidose à la fois *in vivo* **(Suresh et al., 1995)** et *in vitro* **(Djeddi et al., 2012 , Nouasri et al., 2015**) ; tandis que les extraits au dichlorométhane de *S. chamaecyparissus* L. subsp. *squarrosa a* montré une inhibition intéressante contre *Rhizopus stolonifer* **(Lopez et al., 2008).**

II.3.2 Activité anti inflammatoire

A la recherche d'alternatifs curatifs avec moins d'effets indésirables, l'homme a s'orienté vers l'utilisation de plantes médicinales. Afin de valoriser l'utilisation de ces plantes médicinales, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont été consacrées à la recherche des propriétés physicochimiques, biologiques et pharmacologiques de ces plantes. En général, les résultats obtenus ont montré que ces propriétés sont dues à la richesse de ces plantes en métabolites secondaires doués de diverses activités y compris l'activité anti-inflammatoire comme les saponines, les alcaloïdes, les terpènes et principalement les polyphénols **(Yu et al., 2016).**

II.3.3 Activité antitumorale

L'activité cytotoxique de l'extrait d'huile brute de Santolina chamaecyparissus a été évaluée in vitro contre A549, HCT116, HepG2 et MCF7. Les pourcentages d'inhibition par rapport au médicament de référence (doxorubicine). L'extrait d'huile à la concentration de 100 et 50 µg/ml a montré une cytotoxicité élevée (97 % à 100 ppm) contre HepG2, et une faible activité (11,8) à la concentration de 100 µg/ml contre A549, tandis que l'extrait n'a montré aucune inhibition contreMCF7et HCT116 à toutes les concentrations, par rapport au médicament de référence (doxorubicine). Les résultats montrent que l'extrait d'huile de Santolina chamaecyparissus a une cytotoxicité élevée contre le carcinome hépatocellulaire humain.Les résultats montrent que l'extrait d'huile de Santolina chamaecyparissus a une

cytotoxicité élevée contre la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain, et que l'activité augmente avec la concentration.les constituants chimiques de l'huile qui contiennent un rapport élevé de bisbolol et d'oxyde de Caryophllène, il y a beaucoup d'études qui montrent que ces composés ont un effet anticancéreux.revue a montré que ces composés ont une activité anticancéreuse.**(Eman Ramadan Elsharkawy 2014)**

II.3.4 Activités antidiabétiques et anticancéreuse

L'analyse GC-MS de l'EAE de S. chamaecyparissus a donné 44 composés. Le tétrapentacontane (27,15 %), l'acétate d'eicosyle (8,40 %), le 2-méthylhexacosane (6,87 %) et le n-pentadécanol (5,44 %) sont les principaux constituants chimiques. L'EAE de santolina chamaecyparissus a montré une inhibition de l'enzyme α-glucosidase dépendante de la concentration et la valeur IC50 (IC50 110 ± 4,25 µg/mL) était comparable à celle de l'acarbose standard (IC50 105 ± 3,74 µg/mL). Les résultats de la qRT-PCR en temps réel ont montré que la protéine EGFR (bcl-2) dans la lignée cellulaire du cancer du sein humain (MCF7) était exprimée négativement avec une valeur de -0,69297105 après traitement par EAE (100 µg/mL). Les résultats de l'étude suggèrent l'utilisation possible de S. chamaecyparissus dans la gestion du diabète et du cancer du sein humain. (**Abuzer Ali et all 2021).**

II.3.5 Activité hépatoprotectrice

L'analyse phytochimique a révélé la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de Santolina chamaecyparissus. Les deux extraits contiennent de l'acide chlorogénique comme constituant significatif (1958,21, 2726,57 mg/kg d'extrait, respectivement), tandis que l'apigénine-7-glycoside a été détectée comme le flavonoïde significatif (42,44, 66,63 mg/kg d'extrait, respectivement). L'administration intra-péritonéale de CCl4 à des rats a induit une hépatotoxicité remarquable en augmentant les dommages hépatiques. Cependant, l'administration orale des deux extraits à 30, 150 et 300 mg/kg pendant 7 jours a empêché de manière significative les lésions hépatiques en diminuant les activités de l'aspartate aminotransférase, de l'alanine aminotransférase, de la phosphatase alcaline et du lactate déshydrogénase. La bilirubine totale, le cholestérol, les triglycérides et le malondialdéhyde ont également diminué, tandis que l'activité du superoxyde dismutase a été restaurée. D'autre part, les extraits aqueux et éthanoliques ont protégé le tissu hépatique contre la stéatose et la nécrose hépatocytaire. L'effet hépatoprotecteur des deux extraits était similaire à celui de 100 mg/kg de silymarine, utilisée comme référence (**Dalila Messaoudi et all 2018).**

Chapitre III

Matériel et Méthode

Le présent travail consiste en une étude comparative du pouvoir antimicrobien d'écorce d'orange (Citrus sinensis), thym (thymus vulgaris) et santolina chamaecyparissus et l'application à la formulation d'un gel buvable a partie du ces extraits des plantes.

Ce travail est réalisé conjointement au :

- Laboratoire de la faculté des sciences au niveau de pole l'université de Yahia Farés Médéa.
- Hall de technologie au niveau de Ain Dhab l'université de Yahia Farés Médéa.
- Laboratoire de Microbiologie, physico-chimique, pharmacotoxicologie à complexe antibio-tical -SAIDAL- Médéa.
- Laboratoire d'analyses médicales el Chifa-lab Dr S. Chaibeddra Médéa.

Le stage s'est déroulé du mois de Février jusqu'au mois du Juin 2021.

III.1 Matériel

III.1.1 Matériel du laboratoire

Cette recherche a été menée dans plusieurs laboratoires et plusieurs outils doivent être utilisés. Pour cela, nous avons utilisé :

- Spectrophotomètre UV/visible type lambda 25 Perkin Elmer.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des milieux de culture.
- Autoclave pour la stérilisation des solutions et les milieux de cultures.
- Rotavapeur RE300 Cole-Parmer pour la séparation du solvant de l'extrait.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des milieux de culture.
- Filtres stériles (whatmanfilterpapers) à porosité de diamètre de 150mm utilisé pour la filtration de homogénat/filtrat et la solution.
- Disque imbibé Schleicher &SchuellØ 9 mm pour l'antibiogramme.
- Toutes les pesées sont effectuées à l'aide d'un Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg.
- Bain marie pour chauffer un récipient dans un bain d'eauen fonction de la température souhaitée
- Pour l'utilisation microbiologique on a utilisé Vortex de type VELP.
- Etuve utilisé pour l'incubation des microorganismes.
- Fisher-Lilly (Antibiotic Zone Reader) utilisé pour mesurer les zones d'inhibitions

- Verreries : ballons, fioles, entonnoirs, béchers, tube à essai, Pipettes, erlenmeyer, ampoule à décanter,
- Homogénéisateur de type (IKA T 25 ULTRA-TURRAX) pour homogénéiser les compositions dans la formulation du gel buvable.
- Viscosimètre de type BROOK FIELD pour mesurer la viscosité du gel.

III.1.2 Produit

• **Ethanol 96%**	• **Soja Agar**	• **carragénine**	• **Benzoate Sodium**	• **Glycérol**
• **Acétone**	• **Eau physiologique 0.9%**	• **Sulfate de magnésium (MgSO4)**	• **Para Hydroxybenzoate de Methyl**	• **Gomme xanthane**
• **Eau distillée**	• **NAOH**	• **Saccharose**	• **Acide ascorbique (vit C)**	• **DPPH**
• **Mueller Hinton**	• **carragénéne**	• **Arome d'orange**	• **Huile végétale de menthe poivré**	• **Twin 80**

III.2 Matériel végétal

III.2.1 Récolte

Les plantes choisies pour cette étude : écorce d'orange *(Citrus sinensis)*, thym (*Thymus vulgaris)*, *santoline (santolina chamaecyparissus)*

Echantillon 1 : L'espèce *Citrus sinensis*, l'écorce d'orange de la région de Mitidjaa été procuré du marché local de Médéa, Algérie durant le mois de Février 2021.

Echantillon 2 : L'espèce *Thymus vulgaris* L. a été récoltée durant le mois de Février 2021, de la région de Ben chicao, Médéa, Algérie. La partie prise en considération pour réaliser cette étude est la partie aérienne (les tiges feuillées).

Echantillon 3 : L'espèce *santolina chamaecyparissus*, a été récoltée durant le mois de Mars 2021, de la région de pole, Médéa, Algérie

III.2.2 Séchage

La partie aérienne de la plante est séchée directement après la récolte sur papier absorbant, sec et propre à l'air libre à l'abri de la lumière pendant une période étalant sur deux semaines.



(1) **(2)** **(3)**

Figure 16 : Présente les plantes utiliser : *(1) Citrus sinensis (2) Thymus vulgaris (3) santolina chamaecyparissus*

III.2.3 Broyage et conservation

La partie aérienne séchée est réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. Cette opération permet de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer les organites et les molécules contenues dans la cellule ce qui permet d'augmenter leur surface de contacté avec les différents solvants utilisés et par conséquence améliorer le rendement d'extraction.

La poudre résultante est conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés



Figure 17: Broyage d'écorce d'orange *Citrus sinensis* séché **(originale 2021)**

III.3 Animaux

Nous avons utilisé des souris de laboratoire (Figure 18) issues de l'élevage animalerie antibiotical de SAIDAL de Médéa (Algérie), ayant les caractères suivants, selon **(la pharmacopée européenne 2008)** :

- Espèce : souris Albinos
- Sexe : mâle
- Nombre : 80
- Poids : 17 à 24g
- Nourriture : ONAB granulée
- Boisson : eau de ville

Dont les conditions d'hébergement sont :

- Température : 24ºC
- Humidité : 50%
- Eclairage : 10/24heures



Figure 18 : Souris Albinos, la race NMRI **(Original, 2021)**

On a utilisé un lot contient 3 lapins sélectionné pour les laboratoires d'analyses. De telle sorte qu'on les traite séparément dans des cages.

- Espèce : lapin de la race géant des Flandres
- Sexe : mâle
- Taille : 80 cm
- Durée de vie : 10 à 15 ans
- Poids d'adulte : 6 kg à 11 kg
- La consommation d'eau pour lapin adulte : 80-100 ml / kg de poids corporel



Figure 19 : Lapin de la race géant des Flandres **(Original, 2021)**

III.4 Procédés d'extraction

III.4.1 Méthode d'extraction par macération

III.4.1.1 Extraction aqueuse

L'extraction a été faite par une macération de 50 g de plante dans 500 ml d'eau distillé pendant 24h dans un récipient fermé et à température ambiante. Après 24 h, la solution est filtrée par un filtre de 150mm diamètre. Enfin le filtrat est conservé à 4 °C dans obscurité pour les analyses ultérieures.



(1) **(2)** **(3)** **(4)**

Figure 20 : Les étapes de l'extraction (1) prise de poids, (2) macération, (3) filtration, (4) le filtrat (extrait)

III.4.1.2 Extraction par solvant

L'extraction a été faite par une macération de 50 g de plante dans 500 ml de solvant (70% ethanol ou acétone + 30% eau distillé) pendant 24h dans un récipient fermé et à température ambiante sous agitation.

Après 24 h, la solution est filtrée par un filtre de 150mm diamètre. Ensuite la séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un appareil appelé Rotavapor « évaporateur rotatif ». Dans cet appareil, l'évaporation sous vide est réalisée en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon de récupération de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite à 55°C et l'extrait est récupéré en évitant ainsi la dégradation thermique

éventuelle des composés extraits. Enfin l'extrait est conservé à 4 °C dans obscurité pour les analyses ultérieures.

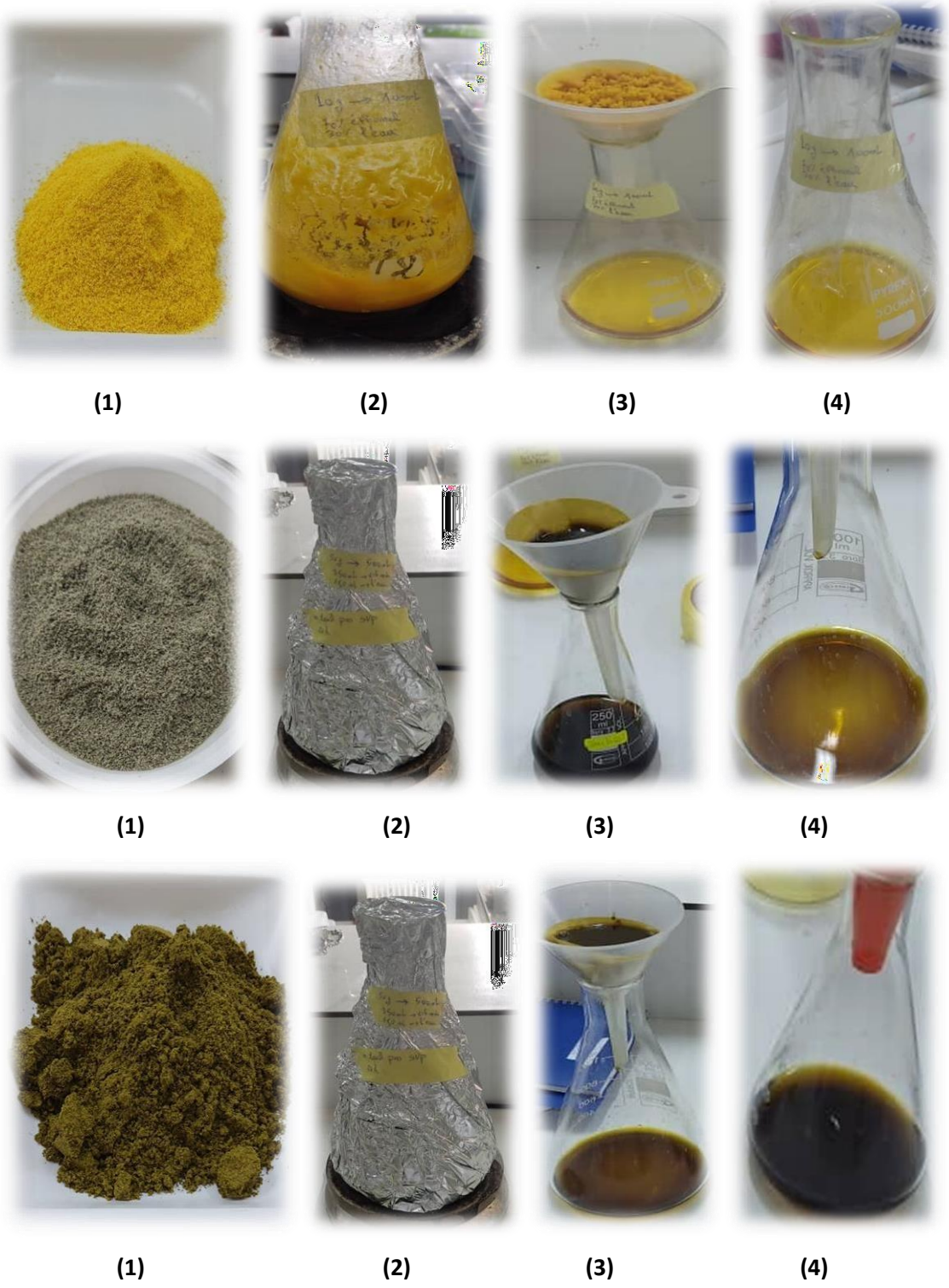


Figure 21 : Les étapes de l'extraction (1) prise de poids, (2) macération, (3) filtration, (4) le filtrat

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un appareil appelé Rotavapor à température de 78°.



Figure 22 : Rotavaporation par « évaporateur rotatif »

Afin d'épuiser la plante et le filtrat est séché à 40°C puis le pesé pour calculer le rendement de l'extraction R selon la formule détaillée ci- dessous :

$$\boldsymbol{R}\,(\%) = \frac{(\boldsymbol{P0} - \boldsymbol{P1})}{\boldsymbol{P0}}\ \boldsymbol{X}\ \mathbf{100}$$

R : Rendement

P0 : Poids initial.

P1 : Poids après extraction et séchage.

III.4.2 Méthode extraction des huiles essentielles

III.4.2.1 Extraction par Hydrodistillation

C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleur rendement. Elle consiste à porter à ébullition un mélange d'une partie de la plante et de l'eau dans un ballon. Sous l'action de la chaleur, les cellules éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils. Les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparé par différence de densité **(Bruneton, 1993).**

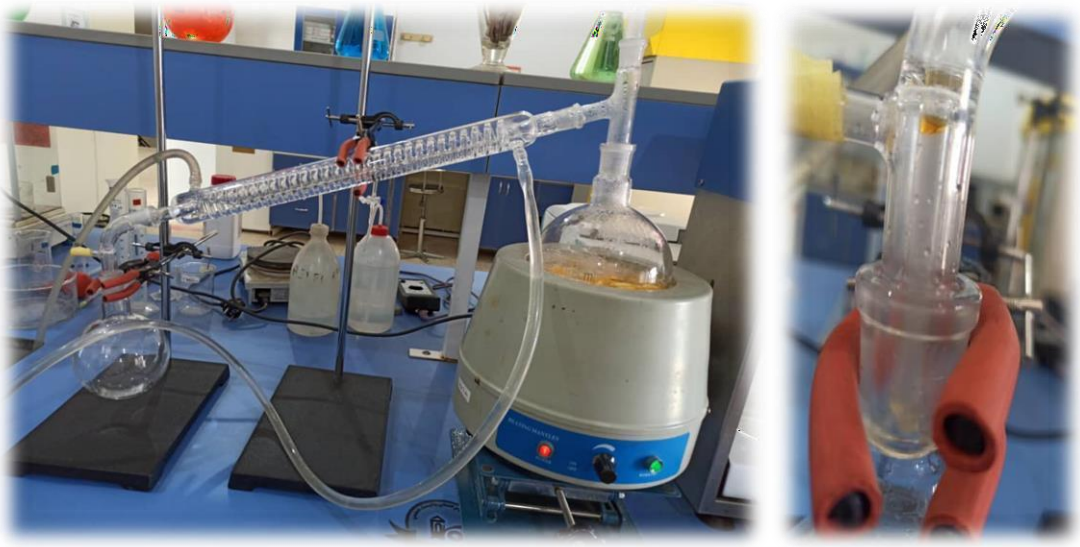


Figure 23 : Un montage d'hydrodistillation

Après séchage de la plante, une quantité de la matière végétale est introduite dans le ballon, elle est ensuite immergée d'eau distillée. Le ballon est mis sur un chauffe ballon et est raccordé avec le reste de l'appareil d'extraction, le mélange eau matériel végétale sera chauffera une température voisine de 100°C, on met 25g de matière végétale dans un 250ml d'eau distillé.

Le mélange est tenu en ébullition de 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation ensuite, l'huile se sépare de l'eau par différence de densité.

III.4.2.2 Isolation des huiles essentielles

La phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau par simple décantation et à laquelle on ajoute du sulfate de magnésium (MgSO4) pour éliminer les traces d'eau. L'efficacité de cette opération peut être accrue par une étape préalable de relargage (adjonction du chlorure de sodium) qui permet une bonne séparation entre les 2 phases non miscibles en diminuant la solubilitédes HE dans l'eau. La quantité d'essence obtenue est alors pesée pour le calcul du rendement. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. La décantation est bien expliquée dans **l'annexe**.

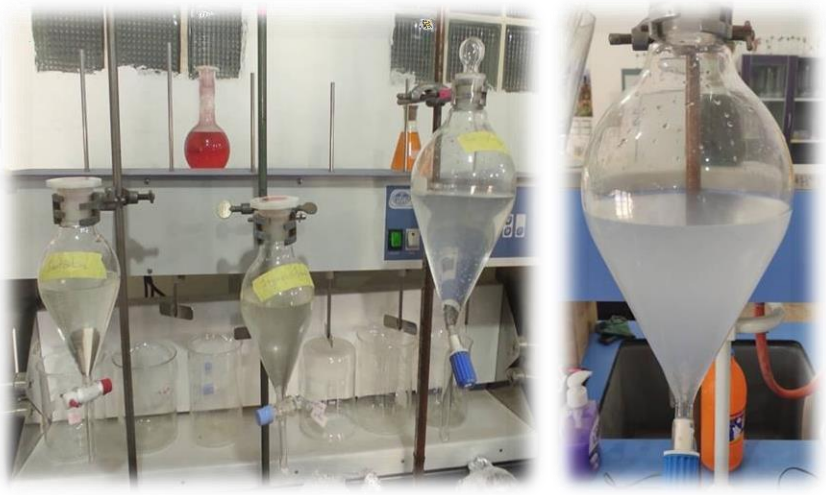


Figure 24 : Décantation par ampoule à décanter

III.4.2.3 Calcul du rendement en huile essentielle

On definit le rendement en huiles essentielles comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (MHE) à la masse de la matière végétale séché (MS) ou humide (MH).

Exprime dans les mêmes unités de masse. Le rendement (R) en huile essentielle, exprime en pourcentage est donne par la relation suivante :

$$R\ \% = \frac{MHE}{MS}\ x\ 100$$

R : rendement de HE en % **MHE** : poids dev l'HE extraite (g)

MS : poids de materiel vegétale traité (g)

Enfin les HE est conservé à 4 °C dans le réfrigérateur jusqu'à nouvelle utilisation.

III.5 Etude physicochimique des extraits

III.5.1 Méthode chromatographique et spectroscopique de séparation et d'identification

III.5.1.1 Analyse de CG MS

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

Cette analyse est un contrôle de qualité visant à déterminer les composés les plus pharmacologiquement actifs. Afin d'extraire les trois espèces : l'écorce d'orange *(Citrus*

sinensis), thym (*Thymus vulgaris),* santoline *(santolina chamaecyparissus)* séché, l'éthanol a été utilisé comme solvant d'extraction. L'analyse a été réalisée au laboratoire de la police scientifique d'Alger. Appareil : GC MS model CLARUS 500 brand Perkin-Elmer.

III.5.1.2 Méthode CG-MS

Les conditions expérimentales du système GC-MS étaient les suivantes : colonne non polaire standard capillaire TR 5-MS, dimension : 30 Mts, ID : 0,25 mm, épaisseur du film: 0,25 µm. Le débit de la phase mobile (gaz porteur : He) a été ajusté à 1 ml min-1.

Dans la partie chromatographie en phase gazeuse, le programme de température (température du four) a été augmenté de 40 ° C à 220 ° C à 4 ° C min-1 et le volume d'injection était de 1 µl. Les échantillons ont été entièrement analysés à une plage de 20 et 550 m / z et les résultats ont été comparés en utilisant le programme de recherche de la bibliothèque spectrale de Wiley et Nist.

III.6 Etude microbiologique

III.6.1 Activité antimicrobienne des extraits

Les Souches utilisé

- Dans notre étude, nous avons testé la sensibilité de neuf (9) souches bactériennes de référence (l'American Type Culture Collection « ATCC ») provenant laboratoire microbiologie au niveau de groupement Saidal à Médéa vis-à-vis des agents antimicrobiens standards (antibiotiques et antifongiques) et biologiques (huiles essentielles et extrait).

Il s'agit de sept (7) souches bactériennes (Sinc (5) Gram négatives et deux (2) Gram positive) :

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus subtilis* ATCC 6631, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, et de deux (2) souches fongiques connues pour être responsables d'infections nosocomiales *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763.

- Ainsi qu'une (1) souche isoler est :

La souche bactérienne isolée de prélèvements humain et identifiée au niveau du laboratoire de bactériologie d'établissement public de santé de proximité Médéa, DSP : *staphylococcus aureus.*

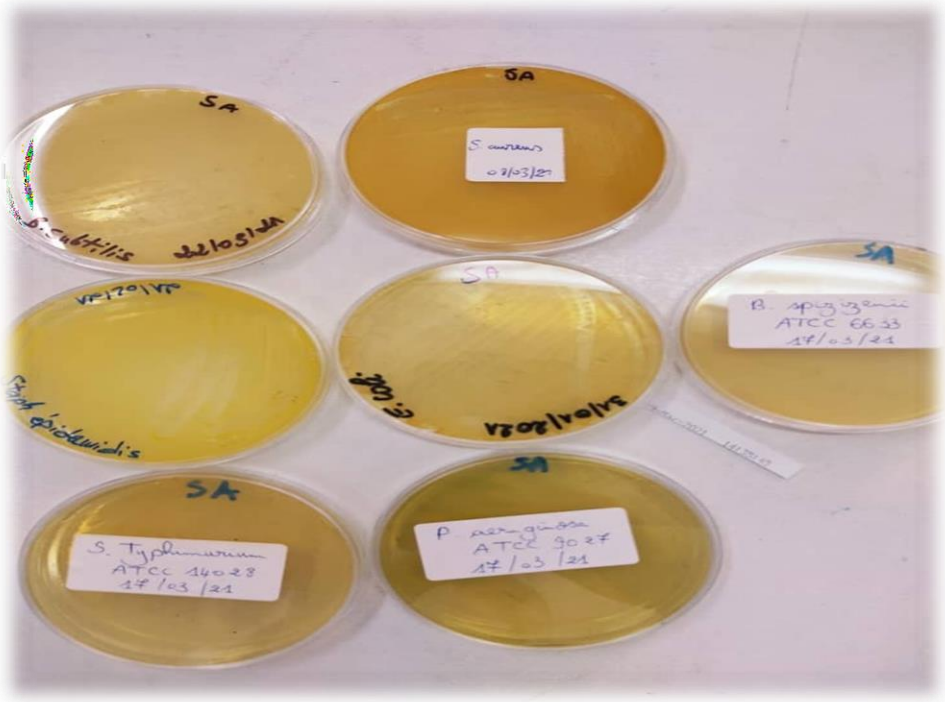


Figure 25 : Les souches bactériennes de référence (l'American Type Culture Collection « ATCC ») laboratoire microbiologie, Saidal à Médéa **(Original 2021).**

Tous ces micro-organismes sont pathogènes, ont des potentiels différents selon le type d'infection qu'ils provoquent, sont à l'origine d'infections hospitalières, et sont résistants aux antibiotiques, ce qui les motive à faire des choix.

Les milieux de culture des souches, leurs grammes, leur température d'incubation et les codes qu'elles utilisent sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Les souches microbiennes utilisées

Num	Microorganismes	Gram	Milieux de culture	Températures d'incubation	Code
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538	+	Chapman	37 ºC	Sa
2	*Staphylococcus aureus* isolé	+	Chapman	37 ºC	Sai
3	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228	+	Chapman	37 ºC	Se

4	*Salmonella typhimurium* ATCC 14028	+	Hektoen	37 ºC	St
5	*Bacillus subtilis* ATCC6631	+	Gélose Nutritif	37 ºC	B1
6	*Bacillus Spizizenii*ATTCC 6633	+	Gélose Nutritif	37 ºC	B2
7	*Pseudomonas aeruginosa*ATCC 9027	-	MacConkey	37 ºC	Pseudo
6	*Escherichia coli* ATCC 8739	-	Hektoen	37 ºC	E.coli
9	*Candida albicans*ATCC 10231		Sabouraud Agar	30 ºC	Ca
10	*Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763		Sabouraud Agar	25 ºC	SS

III.6.1.1 Méthodes de diffusion sur milieu solide

Aromatogramme

Méthode de diffusion sur disque

L'aromatogramme permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile essentielle. Elle consiste à utiliser des boites de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman, préalablement imprégnés de quantités connues d'HE, sont alors placés en surface de la gélose **(Wilkinson, 2006 ; Traoré, 2006 ; kechkar, 2008),** après incubation les bactéries se développent sur toute la surface de gélose sauf ou elles rencontrent une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissante. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies appelée une zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus elle est petit, plus la bactérie résistance à l'HE **(Faucher et avril 2002).**

Méthode de diffusion utilisant des cylindres

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits végétaux, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé (solide) en utilisant des cylindres en inox. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boite de Pétri déjà ensemencée par une culture bactérienne. L'effet antimicrobien du produit sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Mode opératoire

- Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé (soja agar) et (Muller Hinton) **(Annexe II)** en surfusion dans des boites de Petri à raison de 10 à 15mL par boite. On laisse le milieu refroidir et solidifier sur la paillasse (sous la hotte).

- Une suspension bactérienne correspond aux normes de 0.5 Mc Ferland a été préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Ces normes équivalentes à une densité optique de 0,08-0,1 à 625 nm, cet inoculum sert à ensemencer les géloses de MH ou SA coulées dans des boites de Pétri par un écouvillon imbibé dans la suspension par des stries serrées.
- A l'aide d'une pince stérile, poser des cylindres en inox stériles de 6mm de diamètre ou des disques Schleicher & Schuell Ø 9 mm de diamètre stériles selon le besoin sur la surface de la boite de Pétri contenant des géloses ensemencées puis imprégnés de 15 µl de chaque HE ou bien extrait et de chaque concentration. Les boites ensemencées contenant les disques d'huiles essentielles ou bien extrait ont été mises à 4°C pendant 2 heures pour faciliter la diffusion d'HE et d'extrait.
- Les boîtes de Pétri ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 1H. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 25°C pendant 48H pour les levures et 7 jours pour les champignons.
- La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition par Fisher-Lilly (Antibiotic Zone Reader), qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

- Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits **(Ponce et al., 2003).**

- D≥30mm : Très fortement inhibitrice.
- 21mm≤D≤29mm : Fortement inhibitrice.
- 16mm≤D≤20mm : Modérément inhibitrice.
- 11mm≤D≤16mm : Légèrement inhibitrice.
- D<10mm : Non inhibitrice.

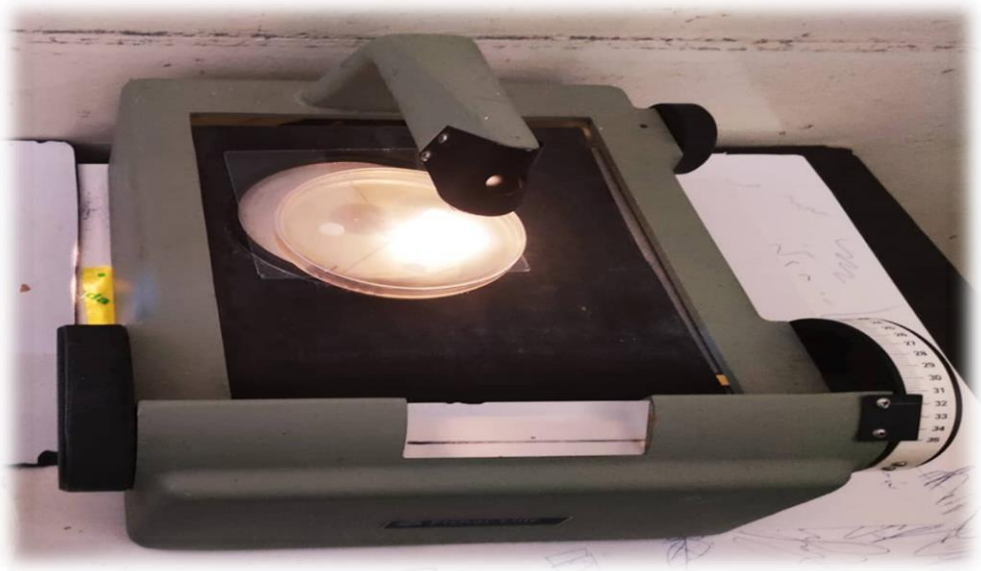


Figure 26 : Fisher-Lilly «Antibiotic Zone Reader » **(Original 2021).**

PS : Les différents antibiotiques et antifongique testés contre les microorganismes sont listés dans l'**annexe**

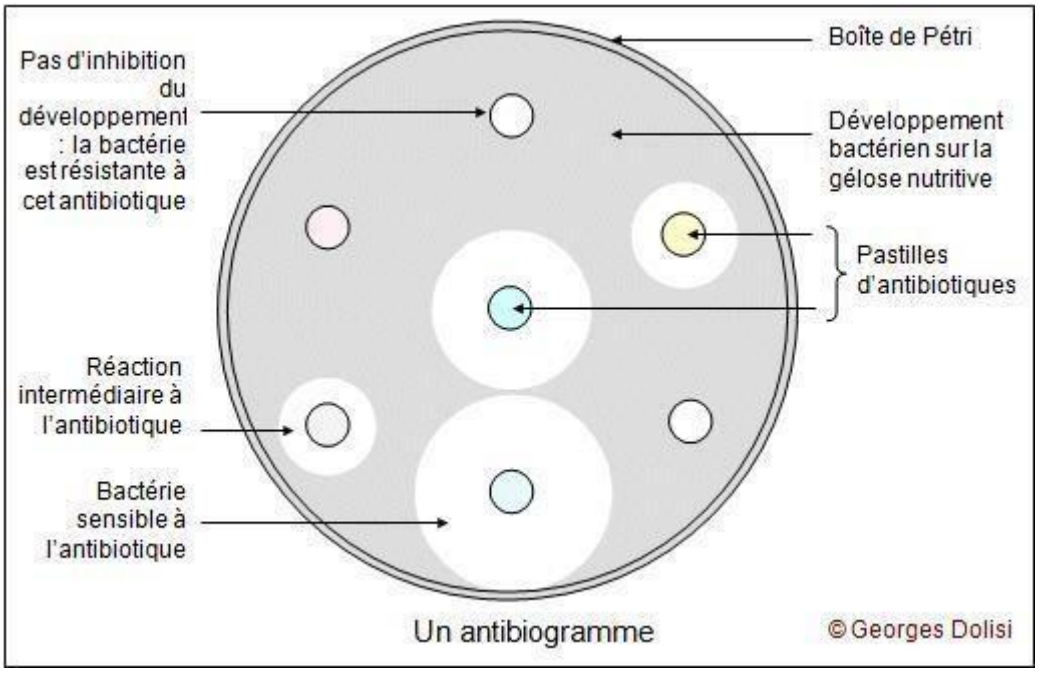


Figure 27 : Schéma représentatif de l'aromatogramme **(Wikipédia).**

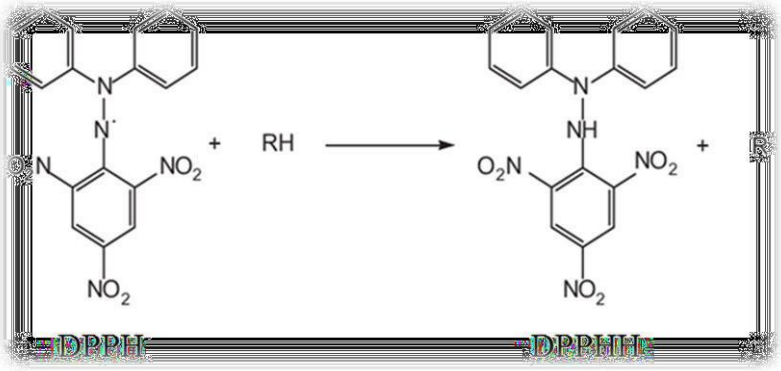
IV.7 Détermination du potentiel antioxydant

IV.7.1 Détermination de l'activité antioxydante par le test au DPPH

Principe du test de DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits a été testée par l'utilisation du radical DPPH (Méthode de Blois (1958) avec quelques modifications). Le DPPH, 2.2'- Diphényl-1 picrylhydrazyl (Sigma, C18H12N506: PM-394.33), est un radical libre stable soluble dans le méthanol (ou l'éthanol). D'une couleur violette intense, il présente un maximum absorbance à 517 nm. Lorsqu'une molécule antioxydante réduit le radical DPPH. la couleur violette disparaît rapidement pour donner une couleur jaune pâle), selon la réaction suivante **(Pokorny et al., 2001; Roginsky et Lissi, 2005)**:

DPPH+ (AH) n------>DPPH-H+ (A°) n



2.2 diphenyl-1-picrylhydrazyl — diphenyl-picrylhydrazine

Couleur Violette — couleur jaune

Figure 28 : Schéma de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant

Mode opératoire :

Cette étude a été effectuée en quatre étapes :

- **Préparation de la solution oxydante du DPPH**

La préparation de la solution DPPH est de 0,004% (m/v), obtenue par dissolution de 0,004g de DPPH dans un 100ml d'éthanol, ou bien 0,002g de DPPH dans un 50 ml d'éthanol selon le besoin **(Toudhert Faiza ; Abbani Soumia 2017)**.



Figure 29 : Solution éthanolique du DPPH **(originale 2021).**

- **Préparation des échantillons**

Nous avons calculé la concentration de notre extrait :

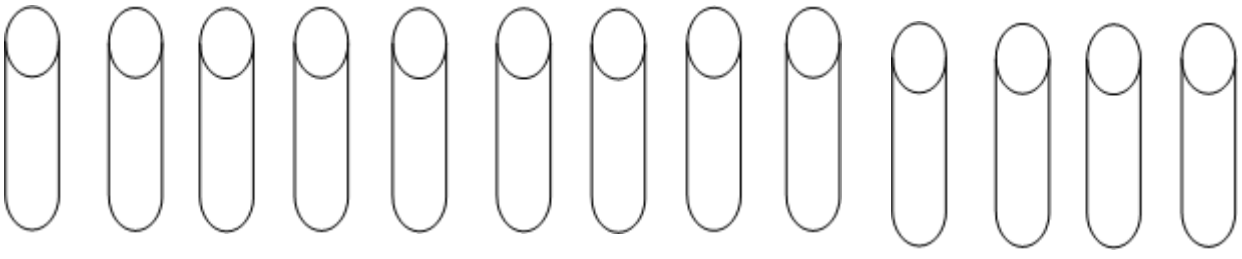
10 g.....100ml

10000 mg ---------- 100ml

100 mg----------1ml ⟶ $c_{1=}$ **100 mg/ml**

Puit, dans une fiole de 20 ml prend : 1ml d'extrait + 19 ml d'eau distillé.

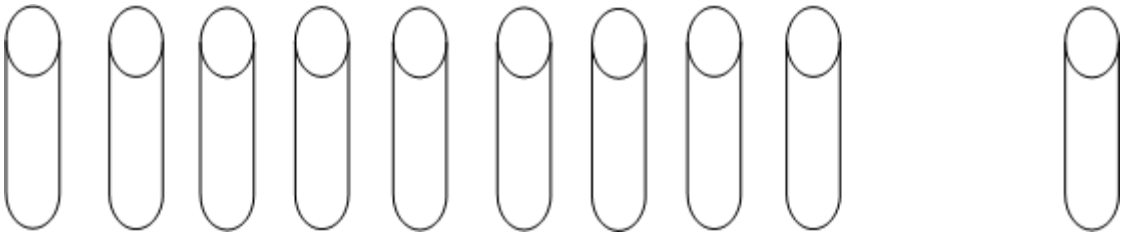
Pour cela : **100 mg /20 ml = 5mg/ml (solution mère)** c'est la concentration initiale de notre activité



0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 2 2.25 2.5 2.75 3 3.5

0.25 =0.5 ml (extrait) + 9.5 ml (solvant)

0,1ml à différentes concentrations de notre extrait sont ajoutés à 3 .9ml de la solution éthanolique du DPPH



0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 2 2.25 Solution contrôle :

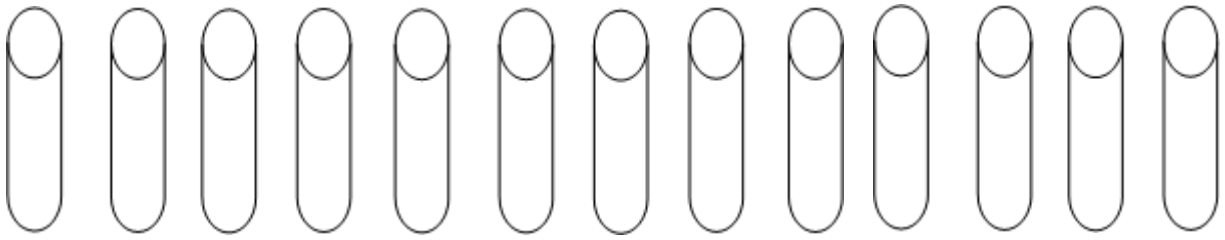
3.9ml DPPH + 0.1ml SOLVANT

0.1 ml (extrait) + 3.9 ml (DPPH) = 4 ml

Apres l'Incubation de 30min la lecture se fait par UV visible à 517 nm, le blanc : éthanol.

Pour un travail plus propre et plus parfait nous avons calculé l'absorbance du blanc a 517 nm.

Abs du Blanc :



0.25 0.5 0.75 1 1.25 1.5 1.75 2 2.25 2.5 2.75 3 3.5

0.1 ml (extrait) + 3.9 ml (Ethanol)
0.2

La lecture se fait par UV visible à 517 nm, le blanc : éthanol

III.7.2 Préparation des échantillons d'acide ascorbique

Dans le but de comparer l'éventuel effet antioxydant de nos extraits, nous avons étudié l'effet antioxydant de l'acide ascorbique (vitamine C) connue par son effet anti radicalaire très fort (Knekt et al., 2004). Différentes dilutions d'acide ascorbique à faible concentrations exprimée en mg /ml (0,004 ;0,006 ; 0,008 ;0,01 ;0,015 ;0,02 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,06 ; 0,08) préparées selon le protocole expérimental disponible au complexe antibiotique SAIDAL.

Mode opératoire de l'activité anti radicalaire de la vitamine C

0,1ml de chaque solution aqueuse d'acide ascorbique (standard) à différentes concentrations sont ajoutés à 3 .9ml de la solution éthanoïque du DPPH (0,024mg /ml)

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 0,1 ml d'eau distillée avec 3,9 ml de la solution éthanolique du DPPH.

La lecture de l'absorbance pour chaque concentration contre un blanc déjà préparé est faite à 517nm après 30 minutes d'incubation à une température ambiante.

Expression et résultats

L'évaluation de l'activité anti-oxydant en utilisant la méthode DPPH estexprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\boldsymbol{AA\ \%} = \frac{\mathbf{(Abs\ Controle - (Abs\ Extrait - Abs\ blanc)}}{\mathbf{Abs\ Contole}}\ \boldsymbol{X}\ \mathbf{100}$$

Abs Contrôle : est l'absorbance du tube contrôle.

Abs Extrait : est l'absorbance de la concentration en test.

Abs Blanc : est l'absorbance d'échantillon sans DPPH.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de ces extraits et de l'acide ascorbique, permet également de calculer le paramètre IC50 qui représente la « Concentration Efficace ». Cette dernière est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle ou d'extrait (ou bien aussi de l'acide ascorbique) nécessaire pour réduire 50% de l'activité de DPPH° **(Molyneux, 2004 ; Samarth R.M; Panwar M; Soni A; Kumar M; et Kumar A. 2008)**

III.8 Etude de l'effet anti-inflammatoire

III.8.1 Test de l'œdème plantaire induit par carragénine

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits :

- D'écorce d'oronge (Citrus sinensis) par l'eau 100%
- Thym (thymus vulgaris) par 70% éthanol + 30 % eau
- Santoline (santolina chamaecyparissus) par eau 100 %

A été réalisée selon la méthode décrite par **Winter et al. (1962).** Pour ce faire, les souris des deux sexes sont été soumises à un jeune de 18 H avant l'expérimentation avec un accès libre à l'eau. Elles ont été réparties en 4 lots de 6 animaux chacun. Le lot I contient l'extrait pure 1ml de chaque extrait (1 ml+1ml+1ml), le lot II administrant le médicament de référence le Diclofénac® (témoin positif), tandis que le lot III contient 0.5 ml de chaque extrait nous avons complété par l'eau distillé jusqu'à 5ml dans le but de dilution (extrait diluée), le dernière lot VI administrant de la solution physiologique au lieu du produit à contrôler (témoin négatif).

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration des doses du produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester.

Quinze minutes après le traitement par injection de 0.2 ml de carragénine (1% p/v) au niveau de la voute plantaire de la patte postérieure droite l'œdème a été induit.



(A) **(B)**

Figure 30 : (A) Injection sub-plantaire de la carragénine, (B) Principe de gavage des souris. **(Original 2021)**.

L'épaisseur de la patte (mm) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant injection (V0) et pendent et toutes les 30 min pendant 3H après induction de l'inflammation.



Figure 31 : Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse digital **(Original).**

III.9 Application à la formulation

Afin de notre travail nous avons formulé un gel buvable a bas des extraits qui ont fait au début de cette étude

III.9.1 Formulation d'un Gel buvable à base des extraits aqueux

- **Matériel utilisé pour la préparation**
  - Verreries courantes de laboratoire (Bécherde250ml, éprouvette100m).
  - Plaque d'agitation
  - Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg.
  - Homogénéisation.
  - Flacon pour mettre le produit fini.
- **Les produits utilisés**

Pour essai 1 : on propose le nom **Orthymosan** comme nom de notre gel qui contient 10% d'extrait *citrus sinensis*, 10 % d'extrait de *Thymus vulgaris* et 10% d'extrait *santolina chamaecyparissus.*

Les produits utilisés sont présentés dans le **Tableau 7.**

Tableau :7 Les produits utilisés dans la formulation d'orthymosan

Produits de Formulation 1 « Orthymosan »		
Extrait citrus sinensis 10%	Extrait thymus vulgaris 10 %	Extrait santolina chamaecyparissus 10%
Para Hydroxybenzoate de Methyl	Benzoate Sodium	Glycérol
Gomme xanthane	Acide ascorbique (vit C)	Saccharose
Huile végétale de menthe poivré	NAOH	L'eau déminéralisée

Pour essais 2 on propose le nom **Tamssonat plus** comme nom de notre gel qui contient 10% d'extrait *citrus sinensis*,

Tableau 8 : Les produits utilisés dans la formulation de Tamsonat plus

Produits de Formulation 2 « Tamssonat plus »		
Extrait citrus sinensis 10%	Acide ascorbique (vit C)	Arome d'orange
Para Hydroxybenzoate de Methyl	Benzoate Sodium	Glycérol
Gomme xanthane	L'eau déminéralisée	Saccharose
NAOH	------	------

III.9.1.1 Formulation

Le but de cette partie est d'optimiser la formulation d'un complément alimentaire un gel buvable antivirale, anti-infection pulmonaire, anti bronchite et antimicrobienne. Pour ce faire on utilise des techniques des plans d'expériences qui permettent de planifier les essais de formulation, de rationaliser le nombre et d'assurer la qualité des résultats.

Méthode de préparation du gel buvable

Le mode opératoire se résume comme suivant :

- **Préparation de la phase aqueuse**

C'est la phase qui a été extraite dans la première partie de notre travail.

- **Préparation du gel buvable**

Dans un bécher de 250 ml, tous les excipients sont mis sous agitation mécanique à température environ de 15°C pendant dix minutes puis homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de type (IKA T 25 ULTRA-TURRAX) afin d'assurer une bonne stabilité de gel formulé.



Figure 32 : homogénéisateur de type IKA T 25 ULTRA-TURRAX **(Original 2021)**

III.9.1.2 Caractérisation du gel buvable

- **Caractérisation physico-chimique**

Contrôle du pH : la mesure du pH est un paramètre important étant donné quele produit est conçu afin qu'il soit consommé directement par l'être humain.

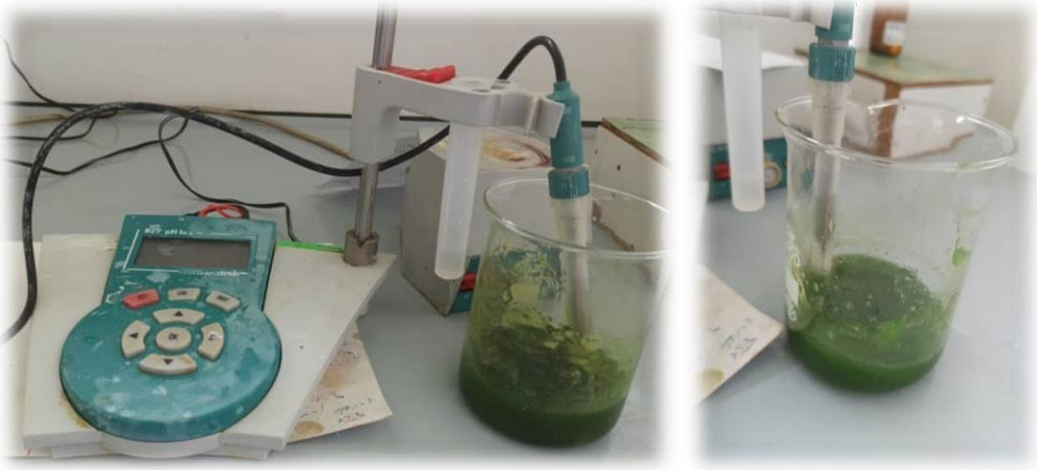


Figure 33 : pH-mètre pour mesurer le **pH** du gel **(Original2021)**.

- **Mesure de la viscosité**

Les coefficients de viscosité sont des grandeurs physiques qui jouent un rôle essentiel en rhéologie. Leur connaissance suffit parfois à caractériser de façon précise le comportement rhéologique du matériau. On définit différents coefficients de viscosité : Viscosité dynamique ou apparente (Pa.s), Viscosité cinématique (cm2/s), Viscosité relative, spécifique, intrinsèque.

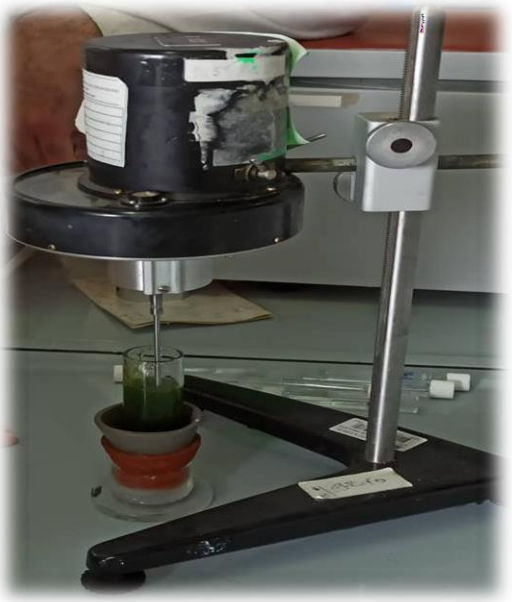


Figure 34 : Viscosimètre de type BROOK FIELD **(Original 2021)**.

- **Évaluation de la stabilité et vieillissement accéléré**

Les principaux phénomènes d'instabilité des gels buvables sont appréciés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalles de temps réguliers et sous des conditions physiques rigoureuses.

En raison de la fin de stage au niveau du groupement Saïdal et de la rareté des capacités du laboratoire universitaire, il nous suffisait de mesurer pH (l'acidité), la viscosité et d'observer à l'œil en cas de changement de couleur.

III.10 Etude de la toxicité aigue

Principe

- Ce test, est réalisé sur des souris disponible au niveau de laboratoire de pharmacotoxicologie (Saidal, Médéa). La race utilisée est sélectionnée pour laboratoire d'analyse, ayant le qualificatif d'une race albinos de 19 à 23 g de poids, de type NMRI (Naval Médical research institute).

- Selon le protocole du laboratoire de pharmacotoxicologie de SAIDAL, un essai limite peut être effectué, sur des rongeurs (souris) en administrant, par vois intra-gastrique, une dose unique du produit à tester. Nous observons pendant 15 jours les cas de mortalité.

Mode opératoire :

Nous avons utilisé nos deux gels buvables Orthymosane et Tamssonate plus qui ont une dose de 30 % du principe actif

- **Orthymosane :** 10 % thymus, 10% citrus, 10% santolina.
- **Tamssonate plus :** 30% citrus sinensis

- 3 ml est le volume du chaque gel à préparer pour chaque lot de souris. Nous avons utilisé 2 lots, 6 souris de chaque lot.
- Mettre les souris à jeun de nourriture la veille du test.
- A l'aide d'une sonde, pratiquer le gavage. Chaque souris reçoit 0.5ml d'une dose donnée.
- Priver ensuite les souris de nourriture pendant 2 à 3h après l'administration. Procéder à leurs observations afin de noter toute anomalie ou mortalité.

III.11 Evaluation du gel buvable par le suivi de paramètre immunologique et hématologique chez les lapins du laboratoire

Dans le but du renforcement d'immunité, nous avons traité des lapins de la race géante des Flandres par notre gel buvable **« Orthymosan »** et on a mesuré quelque paramètre hématologique, biochimique et immunologique (sérologie).

Le lapin géant des Flandres est l'une des plus grandes races de lapin qui existent au monde. Ce lapin domestique, longtemps élevé pour sa chair très appréciée, est aujourd'hui un excellent animal de compagnie, au caractère tendre, affectueux, joueur et très attaché à son maître. Il aime la compagnie de l'homme. Le lapin géant des Flandres est néanmoins en voie de disparition, cette race originaire de la Belgique **(Jardiner avec Binette et Jardin 2020).**

- **Analyse médicale sur les lapins avant le gavage**

Pour ce fait, on fait le prélèvement du sang d'après la veine marginale de l'oreille du lapin (figure.35), ensuite on met le sang dans des tubes à EDTA, Héparine et SEC pour l'analyse du : FNS (formule numération sanguine), urée, créatinine, sérologies HBS-HIV-HCV, bilan

hépatique (ASAT/ALAT, PAL, GGT, BILI) et le test rapide antigénique du covid 19 (SARS-COV 2) au niveau de laboratoire d'analyse médicale el Chifa-lab Dr S. Chaibeddra Médéa.



Figure 35 : Technique de prélèvement du sang, d'après la veine marginale de l'oreille du lapin.

Selon **Derelanko et Rusch, 2008** les caractéristiques biochimiques, et physiologiques des lapins sont compilées dans les tableaux suivants :

Tableau 9 : Paramètres physiologiques des lapins **(Derelanko & Rusch, 2008).**

Paramètre	Mesures
Durée de vie	10-15 ans
Poids d'un mâle adulte	6 kg à 11 kg
Poids d'une femelle adulte	6 kg à 11 kg
Poids de naissance	90-110 g
Nourriture d'un adulte	75-100g
La consommation d'eau pour lapin adulte.	80-100 ml / kg de poids corporel
Particularités diététique	Régime granulé
Elevage des males âge / poids	6–7 mo/3.5–4.0 kg
Elevage des femelles âge / poids	5–6 mo/4.0–4.5 kg
Gestation	30-32 jours
Perte maximum du sang sans causé un danger	6.5-7.5 ml/kg
Globules rouges	4.5-7.0 10^6 /mm^3
Globules blancs	5-12 10^3/mm^3
Hémoglobine	11-14 g/dl
Hématocrite	32-48 %

Plaquettes	250-750 $10^3/mm^3$
Fréquence cardiaque	250-300 battement /min
Taux respiratoire	35-55 haleine/min
Température rectale	39.5 °C
pH des urines	8.2
Volume des urines	50-130 ml/kg
Nombre de chromosome	2n= 44

Tableau 10 : Intervalle des mesures typiques du sérum chez des lapins **(Derelanko & Rusch, 2008).**

	Ages		
Paramètres	15-20 Sem.	25-40 Sem.	1-2 An
Cholestérol, total (mg/dl)	20-60	20-60	20-60
Créatinine (g/dl)	1.0-1.6	0.8-1.6	0.8-1.7
Glucose (mg/dl)	100-160	100-175	80-140
Protéine, total (g/dl)	5.4-6.6	5.5-7.0	5.5-7.5
Urée nitrogène (mg/dl)	10-20	12-22	12-25

Tableau 11 : Pourcentage leucocytaire général des lapins **(Harcourt B, Frances, 2002).**

Leucocytes	Pourcentage %
PNN	30-50
EOS	0-5
BASO	0-8
LYM	30-60
MONO	2-10

Test antigénique (Ag) pour la détection de covid 19 chez les lapins

Pour détecter le virus SARS-CoV-2 responsable de la maladie covid 19. Dans de nombreux pays, l'accès à ce type de test est limité. Des efforts sont donc déployés pour mettre au point des tests de diagnostic fiables, plus rapides et moins coûteux reposant sur la détection des antigènes spécifiques du SARSCoV-2. Ces tests diagnostiques antigéniques, conçus pour détecter directement les protéines du SARS-CoV-2 produites par la réplication du virus dans les sécrétions respiratoires, sont destinés à être utilisés soit en laboratoire, soit à proximité immédiate des patients sous forme de tests de diagnostic rapide (TDR) **OMS (2020).**

Mode opératoire

La plupart des TDR-Ag destinés au diagnostic de la COVID19 reposent sur une méthode d'immun détection de type « sandwich » et se présentent sous forme de dispositifs à flux latéral simples d'utilisation, comme ceux qui sont couramment employés pour le dépistage du VIH, du paludisme et de la grippe. Les TDR-Ag sont généralement constitués d'une cassette en plastique avec des puits pour l'échantillon et le tampon, une membrane de nitrocellulose, une ligne de test à laquelle sont fixés des anticorps spécifiques pour la détection des complexes anticorps-antigènes cibles conjugués et une ligne témoin à laquelle sont fixés des anticorps spécifiques pour la détection des anticorps conjugués. Dans le cas du SARS-CoV-2, l'analyte le plus souvent ciblé par les TDR est la nucléocapside du virus, cette protéine étant privilégiée en raison de son abondance relative. En règle générale, tout l'équipement nécessaire à la réalisation du test, y compris le matériel de prélèvement des échantillons, est fourni dans le kit commercial, à l'exception d'un minuteur.



Figure 36 : Les étapes de test antigénique sur les lapins **(originale 2021).**

Après avoir prélevé l'échantillon respiratoire et l'avoir appliqué sur la membrane, l'opérateur lit les résultats dans un délai de 10 à 30 minutes, avec ou sans l'aide d'un instrument de lecture. L'utilisation d'un instrument de lecture permet une interprétation standardisée des résultats, réduisant la variabilité dans l'interprétation des tests par les différents opérateurs.

Le gavage

5 ml de notre Gel est administré par gavage à chaque animal une fois par jour pendant une

semaine à l'aide d'une sonde gastrique.



Figure 37 : Principe de gavage des lapins.

- **Analyse médicale sur les lapins après le gavage**

Pour avoir les résultats du notre Gel on fait le deuxième prélèvement du sang après une semaine de traitement des lapins par le Gel buvable **(Orthymosan),** le prélèvement fait au niveau de la veine marginale de l'oreille du lapin ensuite on met le sang dans des tubes à EDTA et Héparine pour l'analyse du : FNS (formule numération sanguine), Urée, Créatinine et bilan hépatique (ASAT/ALAT, PAL, GGT, BILI) au niveau de laboratoire d'analyse médicale el Chifa-lab Dr S. Chaibeddra Médéa.

Chapitre IV

Résultat et Discussion

IV.1 Analyse physicochimique des extraits

IV.1.1 Rendements des extraits

Les rendements moyens des extraits préparés ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la plante. Le tableau suivant illustre ces résultats.

Tableau 12 : Présente les rendements obtenus

Plante	Solvant	Poids initiale	Poids finale	Rendement
Citrus sinensis	Eau distillé	10 g	6.990	30.10 %
	Ethanol+eau (70%+30%)	50 g	30.924	38.15 %
Santolina chamaecyparissus	Eau distillé	15 g	12.936	13.76 %
	Ethanol+eau (70%+30%)	30 g	26.123	12.92 %
	Acétone +eau (70%+30%)	30 g	26.365	12.11 %
Thymus vulgaris	Ethanol+eau (70%+30%)	50 g	44.218 g	11.56 %

L'échantillon de *Thymus vulgaris* a fourni un taux de rendement de 11.56% lors de l'utilisation d'éthanol + eau (70%+30%) comme solvant.

Ainsi que, Les échantillons de *santolina chamaecyparissus*ont fourni un taux de rendement de 12.11%, 12.92% et 13.67 % lors de l'utilisation d'acétone +eau (70%+30%), d'éthanol+eau (70%+30%) et d'eau distillé comme solvant successivement,

Par contre, les échantillons d'écorce d'orange (*Citrus sinensis*), ont montré un taux plus élevé par rapport les échantillons des deux plantes mentionnées précédemment. Les rendements obtenus lors de l'utilisation d'éthanol + eau (70%+30%), eau distillée sont respectivement 38.15% et 30.10%.

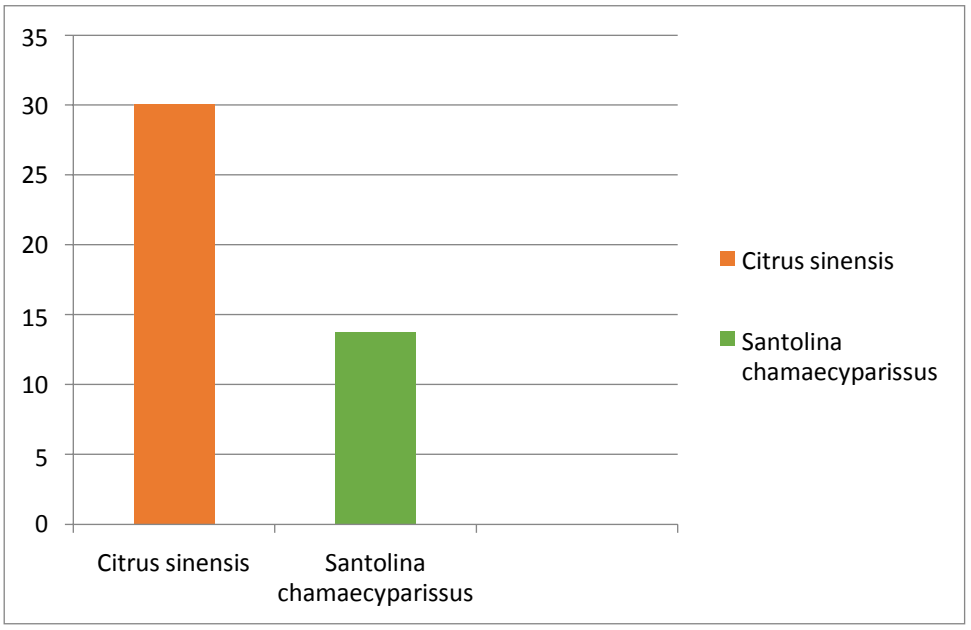


Figure 38 : Histogramme du rendement d'extraits aqueux

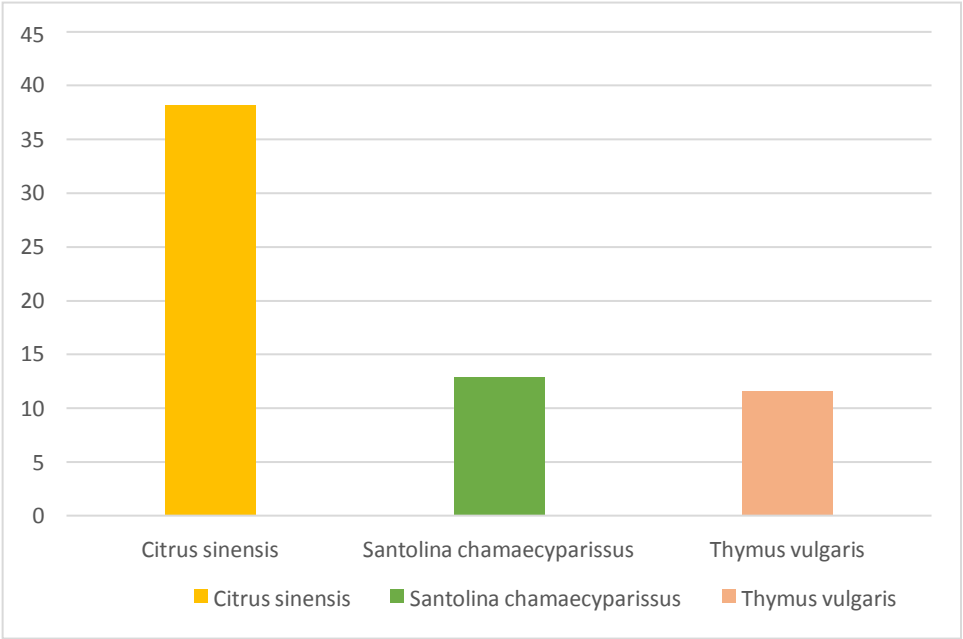


Figure 39 : Histogramme du rendement d'extraits éthanol/eau 70%+30%

Les espèces ont été soumis à des extractions par macération (pendant 24 h) en utilisant plusieurs solvants de polarité différente éthanol/eau 70%+30%, acétone/eau70%+30% Cette différence de polarité permet d'extraire une large gamme de métabolites secondaires de la plante **(Green, 2004).**

Le taux de notre plante thym (11.56%) est beaucoup plus important comparé à celui obtenu par **Yakhlef (2010)** pour le thym originaire de Batna, à l'est de l'Algérie (9.40%).

De plus, **Wisam H *et al* (2017)** ont démontré que les teneurs phénoliques déterminés dans l'extrait éthanolique sont beaucoup plus élevées que dans l'extrait aqueux.

Les variations rencontrées dans la teneur en eau de nos échantillons comparé aux travaux précités, peuvent être dues à des facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques et la répartition géographique **(Besombes, 2008).**

Extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle des trois plantes obtenues par hydrodistillation est un liquide visqueux, limpide, d'une coloration jaunâtre et odeur forte. Le rendement des extraits des trois plantes (*Thymus, Citrus, santolina)* est exprimé en pourcentage massique (g/100g) par rapport à la matière sèche

Plante	Quantité de la matière Végétale (g)	Quantité d'eau distillée (ml)	Rendement
Thymus	**40**	**500**	**1.49 %**
Citrus	**40**	**500**	**0.70 %**
Santolina	**40**	**500**	**1.65 %**

Les différents rendements des trois extraits sont présentés sur la figure suivante on note que le rendement du *santolina* (1,46%) est supérieur à celui de thymus (1.49%) et de citrus (0.70%)

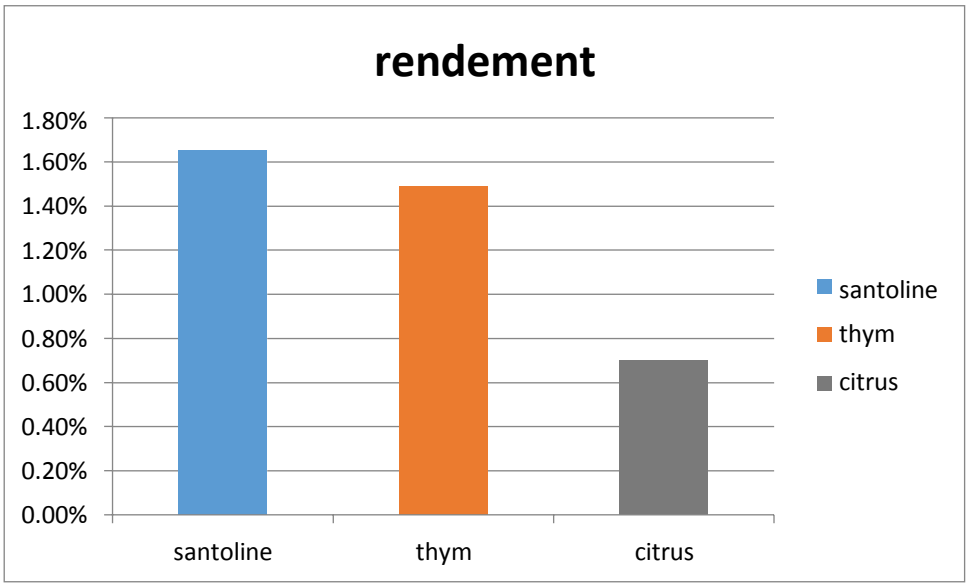


Figure 40 : Histogramme du rendement d'Extraction des huiles essentielles

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle obtenu par hydrodistillation à partir des écorces d'orange est de 0.70 %. Ce rendement est obtenu au bout d'une durée de 2 h30 min. L'huile essentielle récupéré est incolore et présente une odeur caractéristique de l'orange. Cette valeur du rendement est très inférieure à celle obtenue par **Atti-Santos et al. (2000)** dans le cas de l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles des limes. Ces auteurs ont obtenu un rendement de 2.5 % pour une durée de 2 h30 min. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la nature de l'espèce d'agrume utilisée (**Rega et al., 2003**) et par le choix de la période de récolte **(Kelen et Tepe, 2008).**

IV.1.2 Analyse de la composition chimique

L'analyse chimique des extraits éthanolique d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)*, thym (*Thymus vulgaris)*, santoline *(santolina chamaecyparissus)* réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG - SM) ont permis d'obtenir les résultats résumés ci-dessous

Les spectres de masse de chromatographie en phase gazeuse GC-MS révèle que notre extrait contient des molécules différentes, avec un temps de rétention et un poids moléculaire caractéristique de chaque molécule.

- **L'écorce d'orange de (*Citrus sinensis)***

Chromatogramme de l'extrait éthanolique d'écorce d'orange par macération. Voir la Figure 41 :

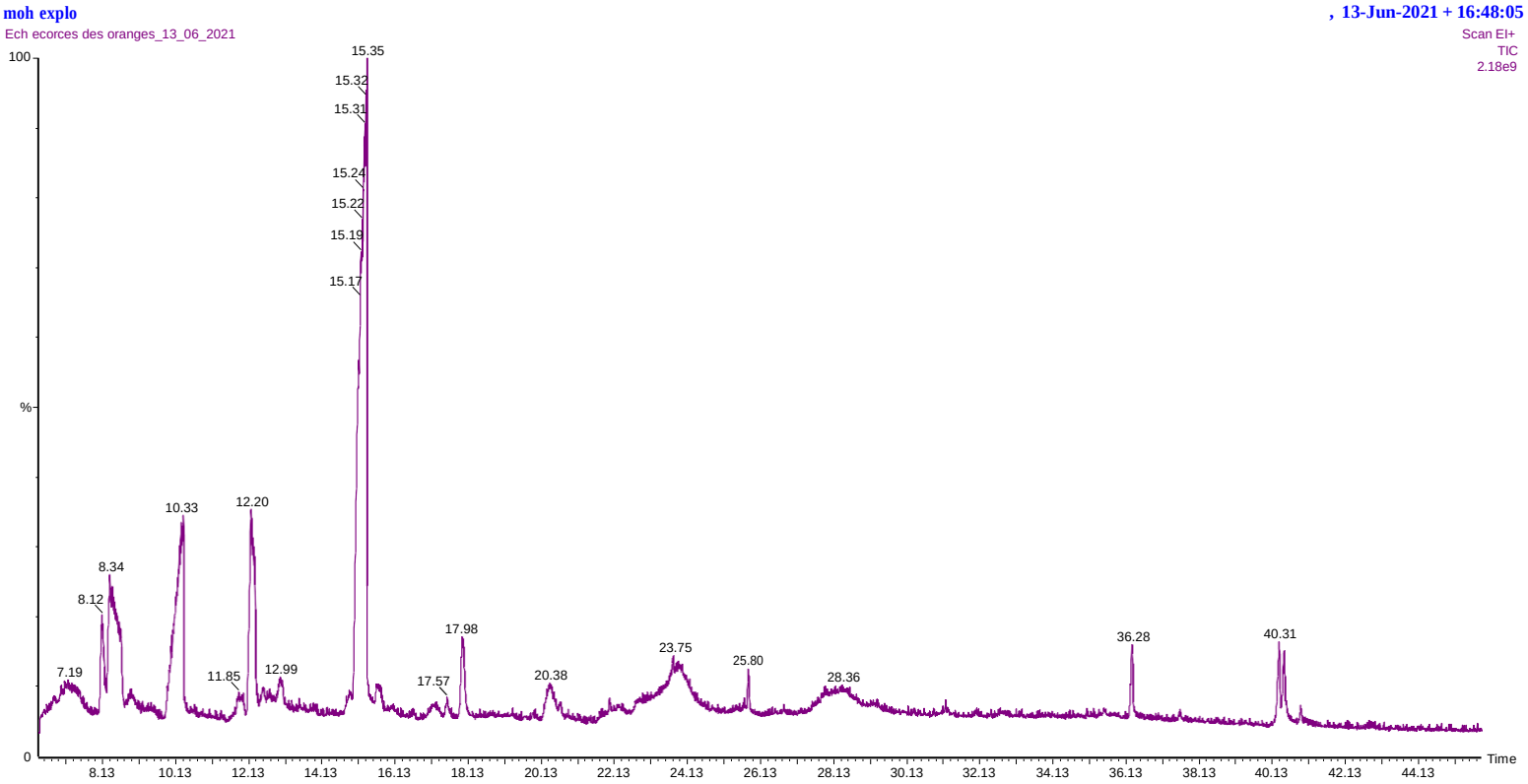


Figure 41 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* par macération.

Spectres de masses

a) D-Limonène : Temps de rétention t =8.40mn

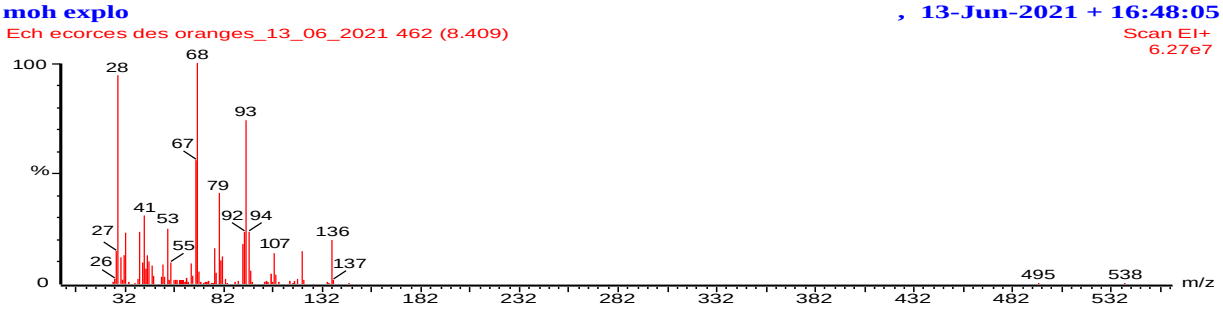


Figure 42 : Spectre masse de D-Limonène dont le temps de rétention 8.40 min.

D'après les recherches bibliographiques, on note que le l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de D-Limonène dans le temps de rétention 8.40 min.

b) 4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy2-methyl : Temps de rétention t =10.33mn

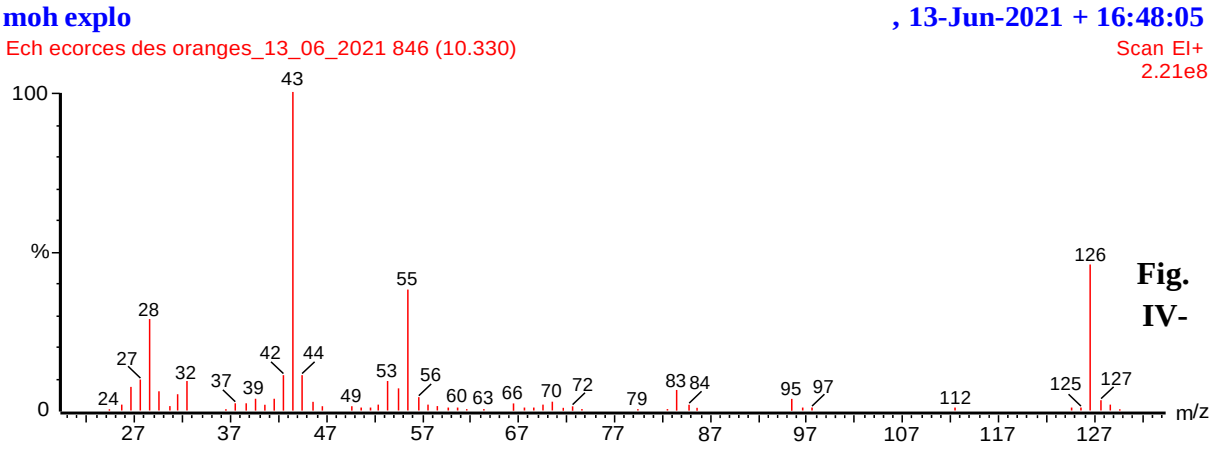


Fig. IV-

Figure 43 : Spectre masse de de 4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy2-methyl dont le temps de rétention 10.33mn

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce du *Citrus sinensis* contient de 4H-Pyran-4-one, 3-hydroxy2-methyl dans le temps de rétention 10.33mn.

c) 4H –pyran-4-one, 2,3-dihydro- 3,5-dihydroxy-6-methyl :

Temps de rétention t = 12.20 mn

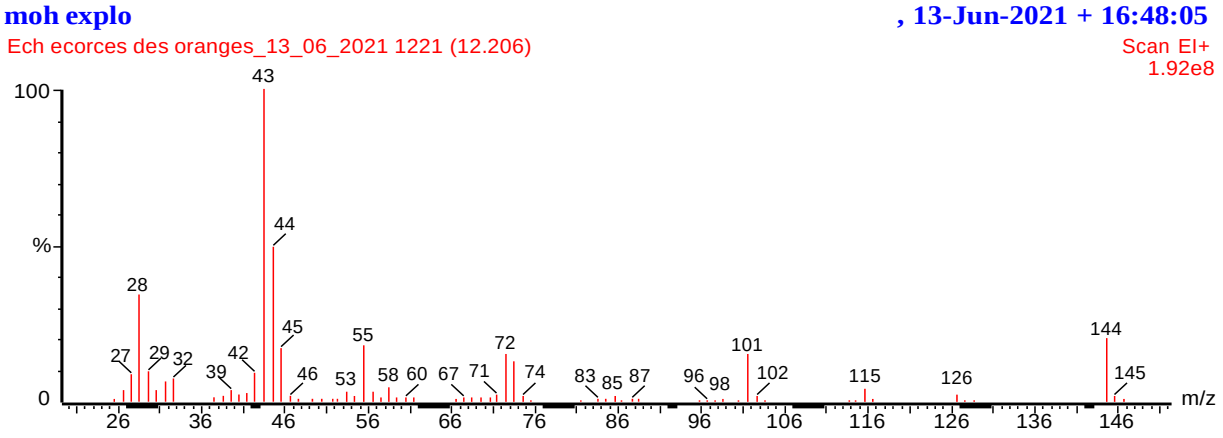


Figure 44 : Spectre masse de 4H –pyran-4-one, 2,3-dihydro- 3,5-dihydroxy-6-methyl dont le temps de rétention 12.20mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de 4H –pyran-4-one, 2,3-dihydro- 3,5-dihydroxy-6-methyl dans le temps de rétention 12.20mn.

d) 5-Hydroxymethyl Furfural : Temps de rétention t =15.35 mn

Figure 45 : Spectre masse de 5-Hydroxymethyl Furfural dont le temps de rétention 15.35 mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de 5-Hydroxymethyl Furfural dans le temps de rétention 15.35 mn.

e) 5-Azido-2.3-epoxycyclopentan-1-ol : Temps de rétention t =23.75 mn

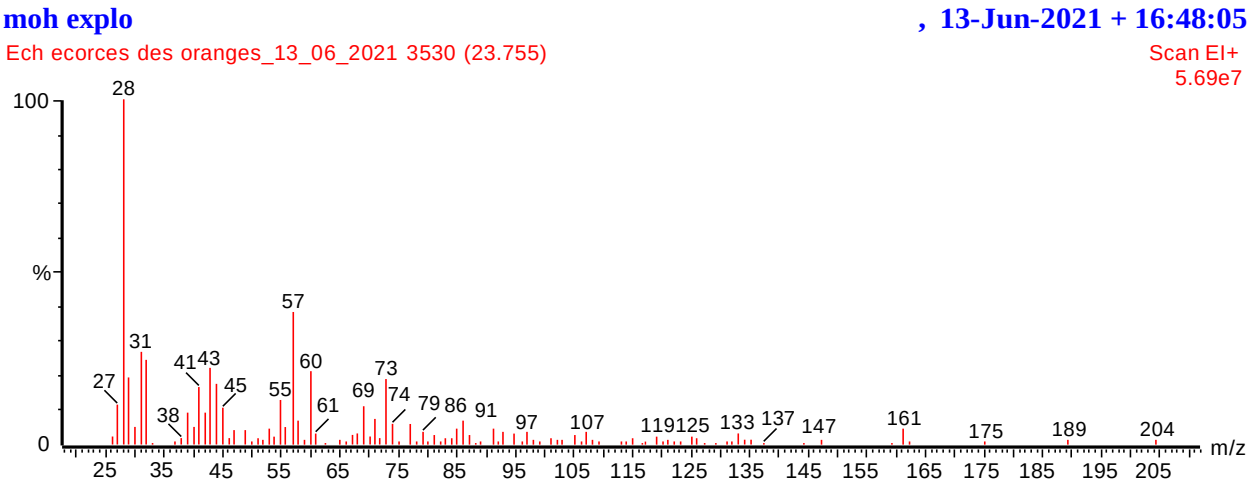


Figure 46 : Spectre masse de 5-Azido-2.3-epoxycyclopentan-1-ol dont le temps de rétention 23.75 mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de 5-Azido-2.3-epoxycyclopentan-1-ol dans le temps de rétention 23.75 mn.

f) N-HEXADECANOIC ACID : Temps de rétention t =36.28mn

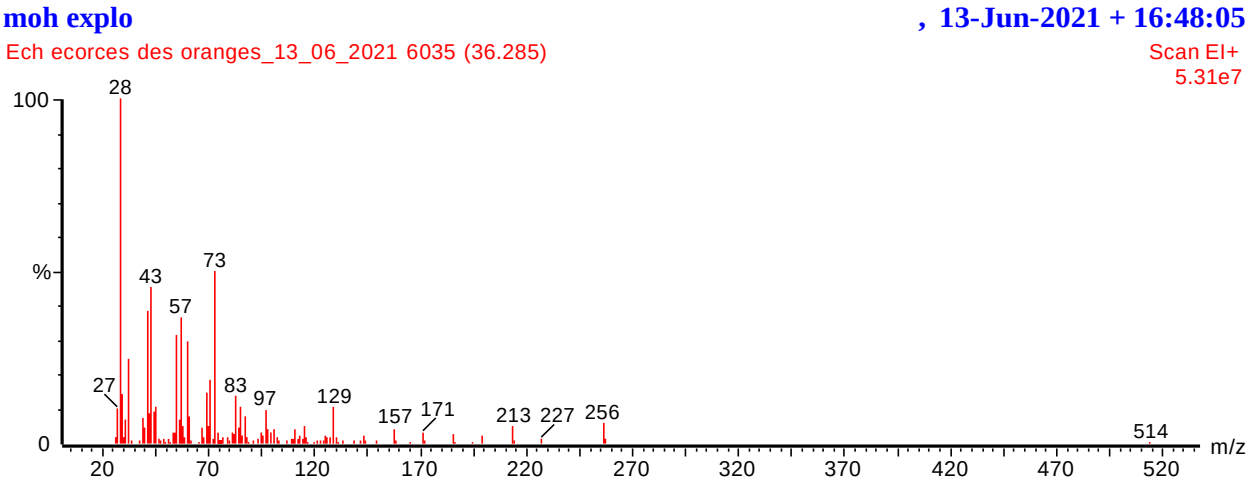


Figure 47 : Spectre masse de N-HEXADECANOIC ACID dont le temps de rétention 36.28mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de N-HEXADECANOIC ACID dans le temps de rétention 36.28 mn.

g) 9, 12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) : Temps de rétention t =40.30mn

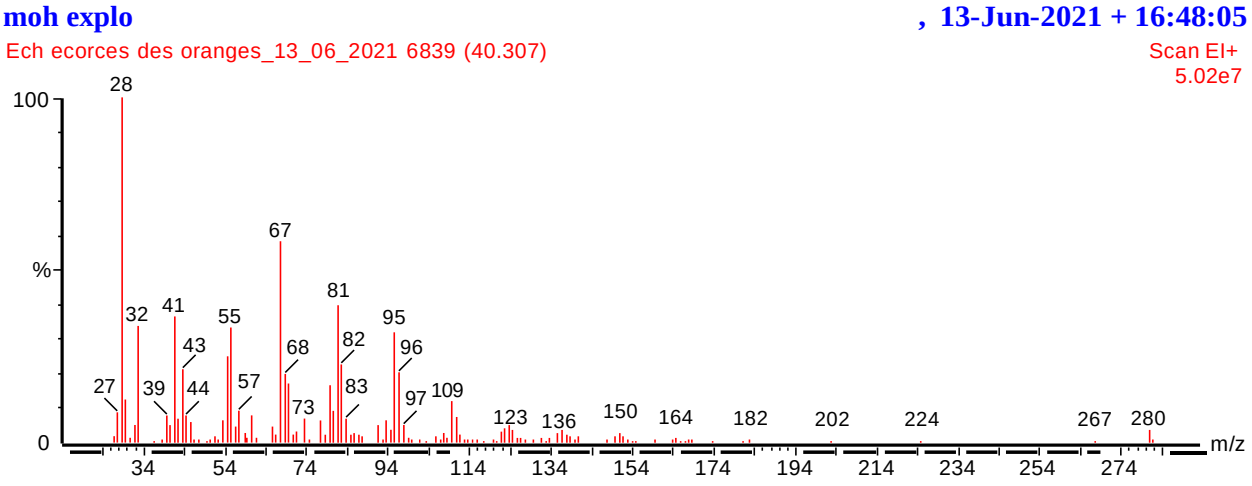


Figure 48 : Spectre masse de 9, 12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) dont le temps de rétention 40.36mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* contient de 9, 12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z) dans le temps de rétention 40.30 mn.

Enfin de notre analyse CG-MS pour l'extrait d'écorce de *Citrus sinensis* on peut détecter 9 spectres, et grâce à ces derniers et la recherche dans librairies spectrales (NIST, WILEY) on peut identifier 7 molécules.

Tableau 13 : Les molécules composant l'extrait d'écorce d'orange de (*Citrus sinensis)* obtenu par analyse CG-MS

Molecule	**Retention time / min**	**Molecular weight / g mol^{-1}**
D-Limonène	8.40	136
4H-Pyran-4-one,3-hydroxy2 methyl	10.33	126
4H –pyran-4-one, 2,3-dihydro- 3,5-dihydroxy-6-methyl	12.20	144
5-Hydroxymethyl Furfural	15.35	126
5-Azido-2.3-epoxycyclopentan-1-ol	23.75	141
N-HEXADECANOIC ACID	36.28	256
9, 12-OCTADECADIENOIC ACID (Z, Z)	40.30	280

- ***Thymus vulgaris***

Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *thymus vulgaris* par macération. Voir la Figure 49 :

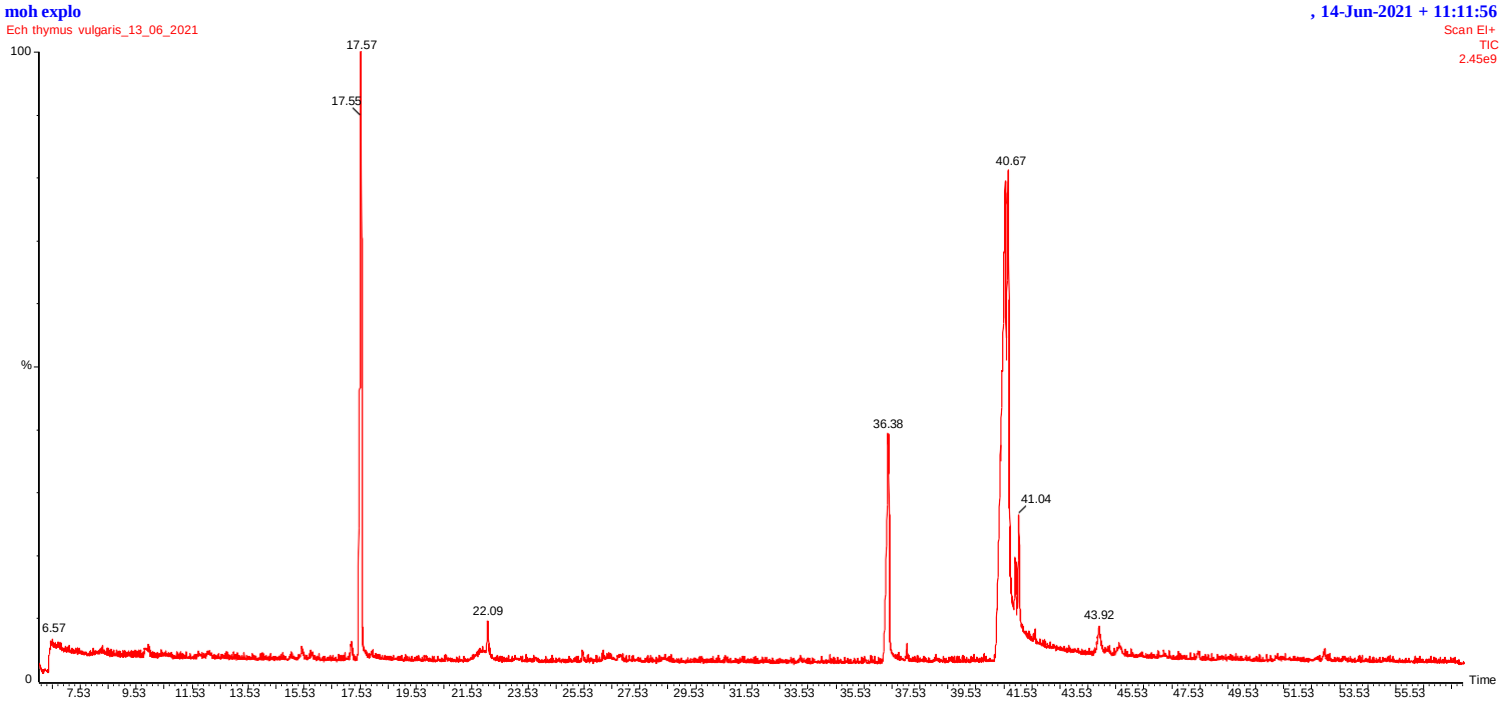


Figure 49 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *thymus vulgaris* par macération

a) THYMOL : Temps de rétention t =17.57mn

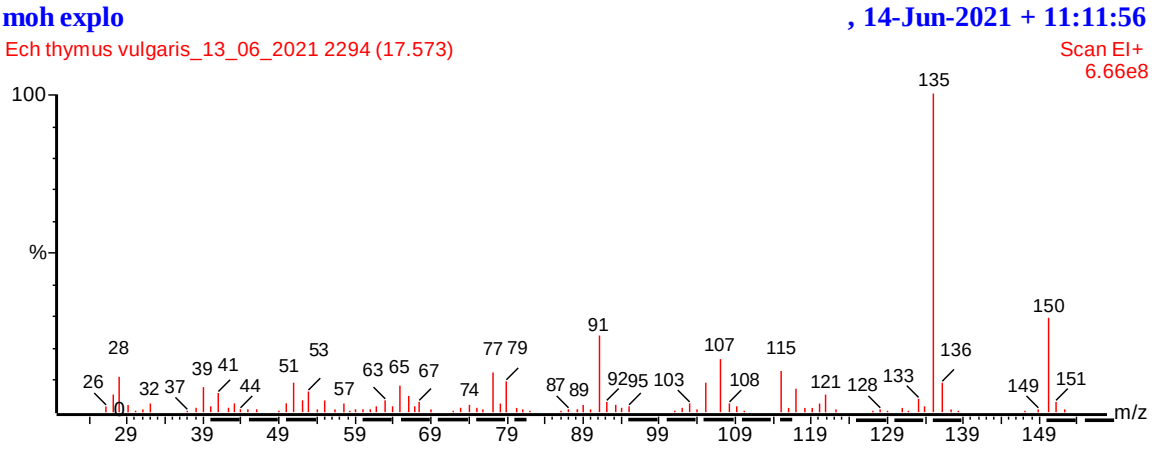


Figure 50 : Spectre masse de THYMOL dont le temps de rétention 17.57mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de THYMOL dans le temps de rétention 17.57 mn.

b) Carvacrol : Temps de rétention t =17.57mn

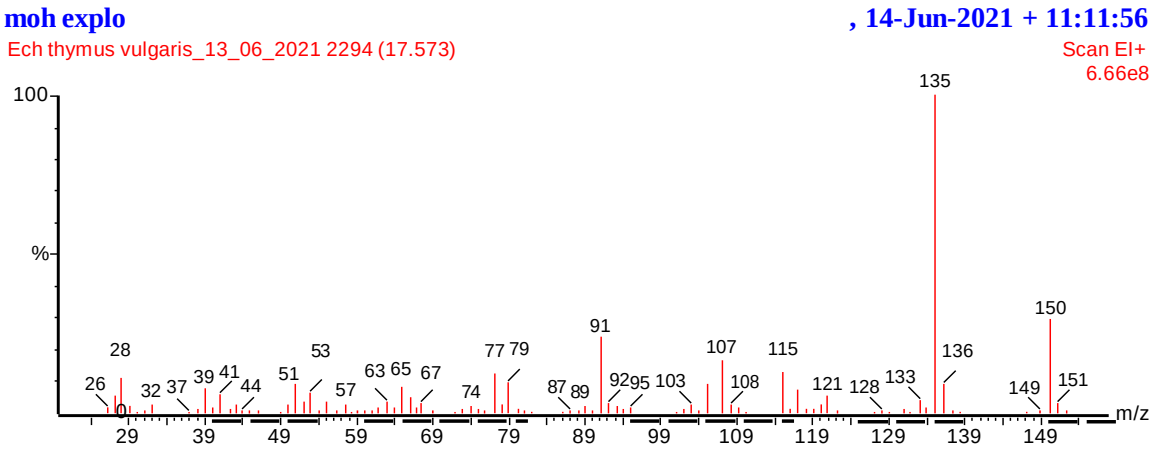


Figure 51 : Spectre masse de Carvacrol dont le temps de rétention 17.57mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de Carvacrol dans le temps de rétention 17.57 mn.

c) P-TERT -BUTYL CATECHOL : Temps de rétention t = 22.09mn

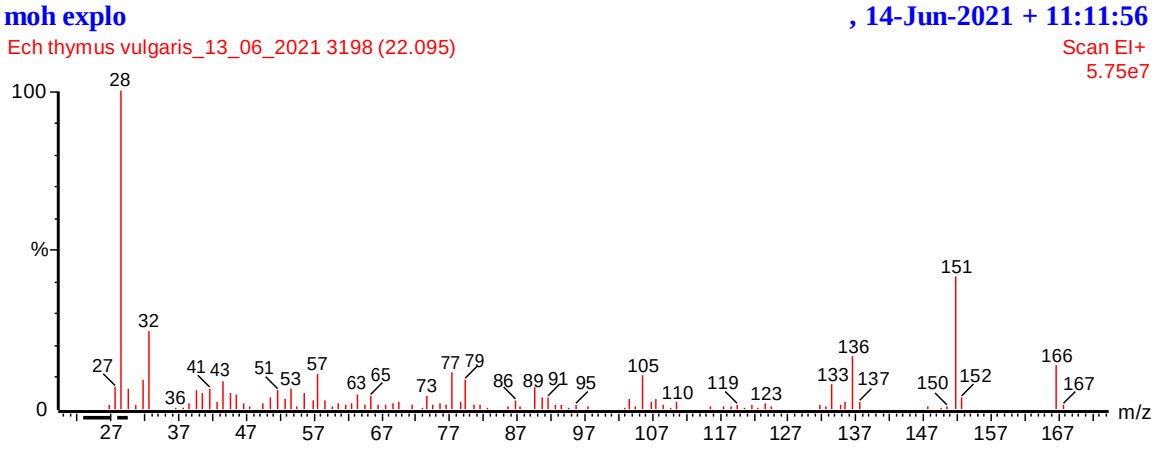


Figure 52 : Spectre masse de P-TERT -BUTYL CATECHOL dont le temps de rétention 22.09mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de P-TERT -BUTYL CATECHOL dans le temps de rétention 22.09 mn.

d) N-HEXADECANOIC ACID : Temps de rétention t =36.38mn

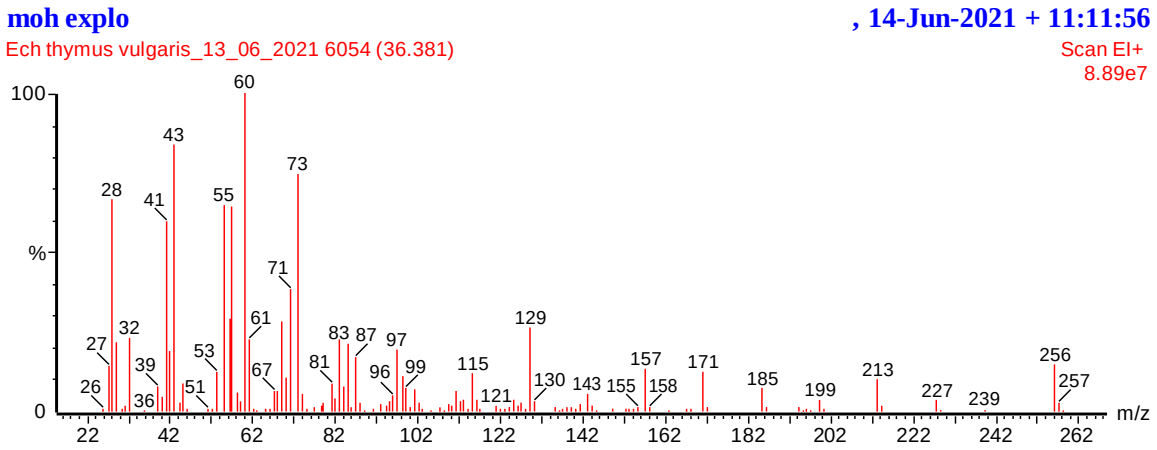


Figure 53 : Spectre masse de N-HEXADECANOIC ACID dont le temps de rétention 36.38mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de N-HEXADECANOIC ACID dans le temps de rétention 36.38mn.

e) 9, 12-OCT ADECADIENOIC ACID (Z, Z) : Temps de rétention t =40.47mn

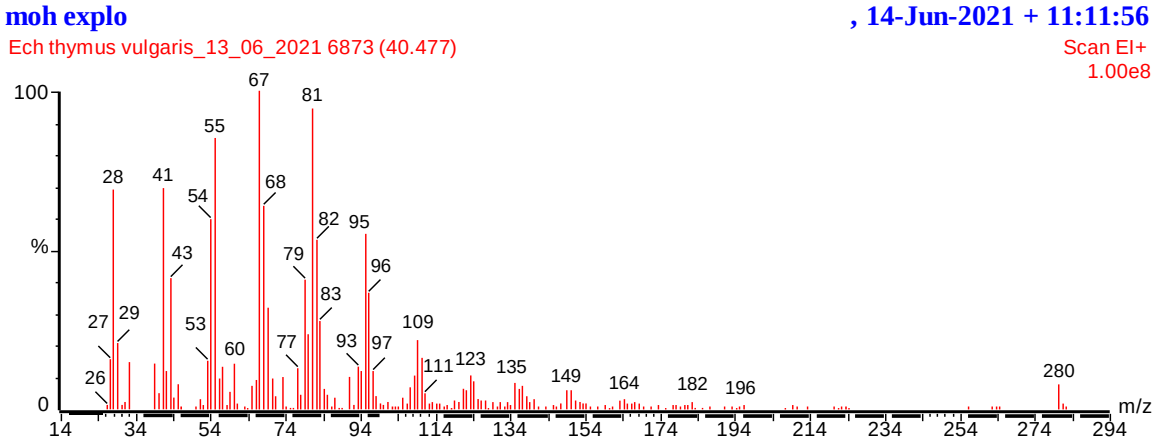


Figure 54 : Spectre masse de 9, 12-OCT ADECADIENOIC ACID (Z, Z) dont le temps de rétention 40.47mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de 9, 12-OCT ADECADIENOIC ACID (Z, Z) dans le temps de rétention 40.47mn.

f) 13 -OCT ADECENAL, (Z) : Temps de rétention t =40.67mn

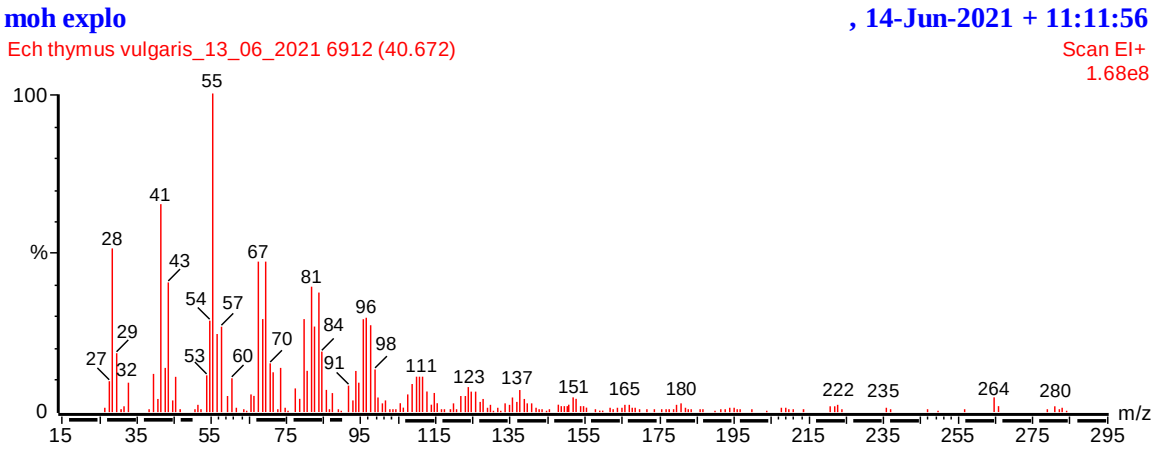


Figure 55 : Spectre masse de 13 -OCT ADECENAL, (Z) dont le temps de rétention 40.67mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient de 13 -OCT ADECENAL, (Z) dans le temps de rétention 40.67mn.

g) OLEIC ACID : Temps de rétention t =41.04mn

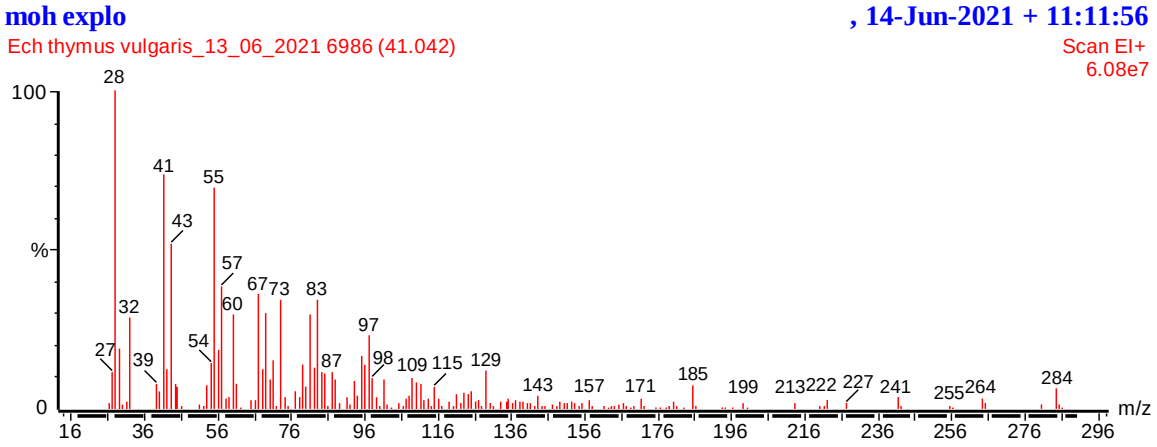


Figure 56 : Spectre masse d'OLEIC ACID dont le temps de rétention 41.04mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *Thymus vulgaris* contient d'OLEIC ACID dans le temps de rétention 41.04mn.

Enfin de notre analyse CG-MS pour l'extrait de *Thymus vulgaris* on peut détecter 8 spectres, et grâce à ces derniers et la recherche dans librairies spectrales (NIST, WILEY) on peut identifier 7 molécules.

Tableau 14 : Les molécules composant l'extrait d'écorce d'orange de (*Citrus sinensis)* obtenu par analyse CG-MS

Molecule	**Retention time / min**	**Molecular weight / g mol^{-1}**
THYMOL	17.57	150
CARVACROL	17.57	150
P-TERT -BUTYL CATECHOL	22.09	166
N-HEXADECANOIC ACID	36.38	256
9, 12-OCT ADECADIENOIC ACID (Z,Z)	40.47	280
13 -OCT ADECENAL, (Z)	40.76	280
OLEIC ACID	41.04	282

- ***Santolina chamaecyparissus***

Chromatogramme de l'extrait éthanolique de ***santolina chamaecyparissus*** par macération. Voir la Figure 57 :

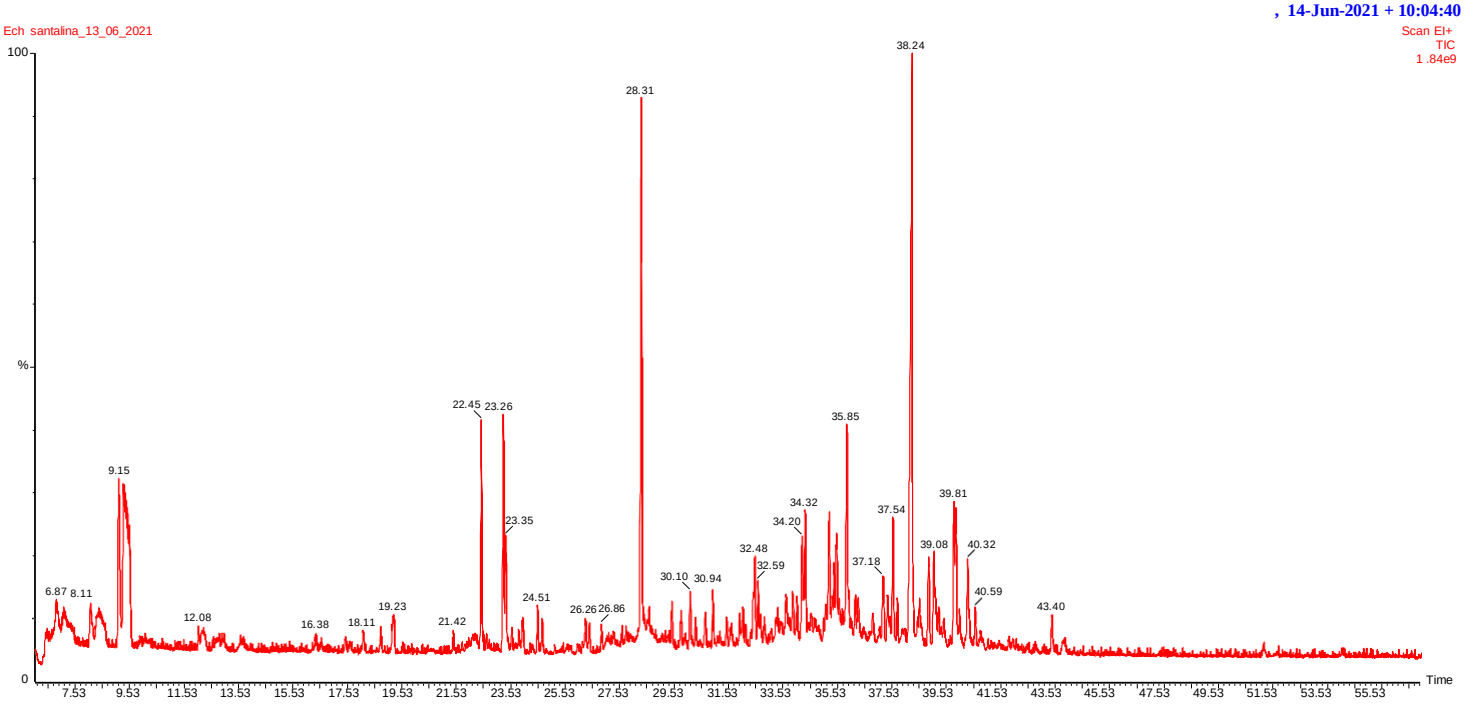


Figure 57 : Chromatogramme de l'extrait éthanolique de ***santolina chamaecyparissus*** par macération

a) 1,5-HEPTADIEN-4-ON, 3, 3, 6-TRIMETHYL : Temps de rétention t =22.45mn

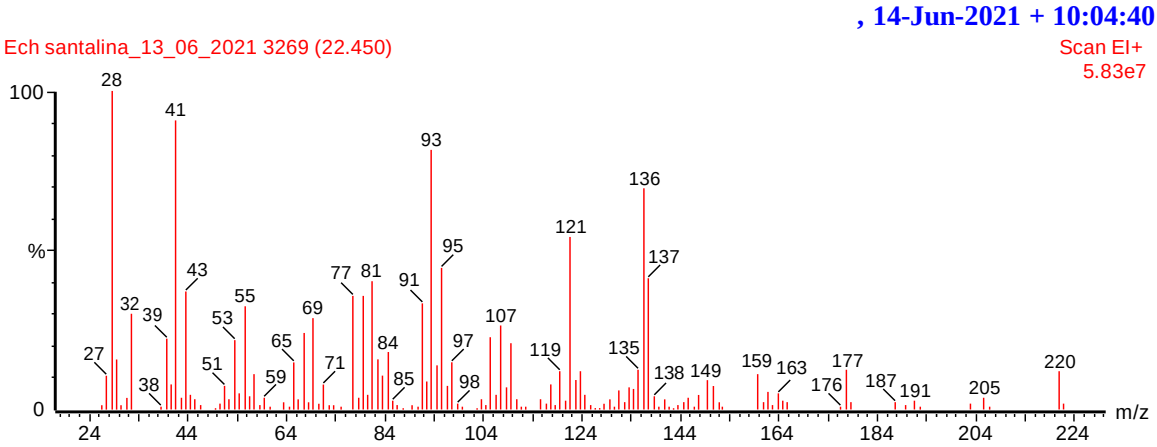


Figure 58 : Spectre masse de 1 ,5-HEPTADIEN-4-ONE, 3, 3,6-TRIMETHYL dont le temps de rétention 22.45mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de 1 ,5-HEPTADIEN-4-ONE, 3, 3,6-TRIMETHYL dans le temps de rétention 22.45mn.

b) CURCUMENE : Temps de rétention t =23.26mn

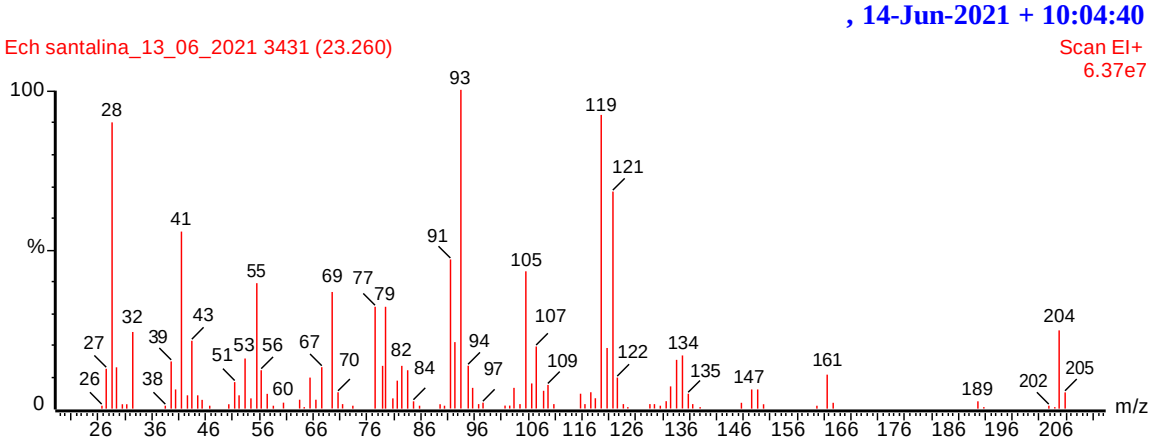


Figure 59 : Spectre masse de CURCUMENE dont le temps de rétention 23.26mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* de CURCUMENE dans le temps de rétention 23.26mn.

c) Bêta-copaene : Temps de rétention t =23.35mn

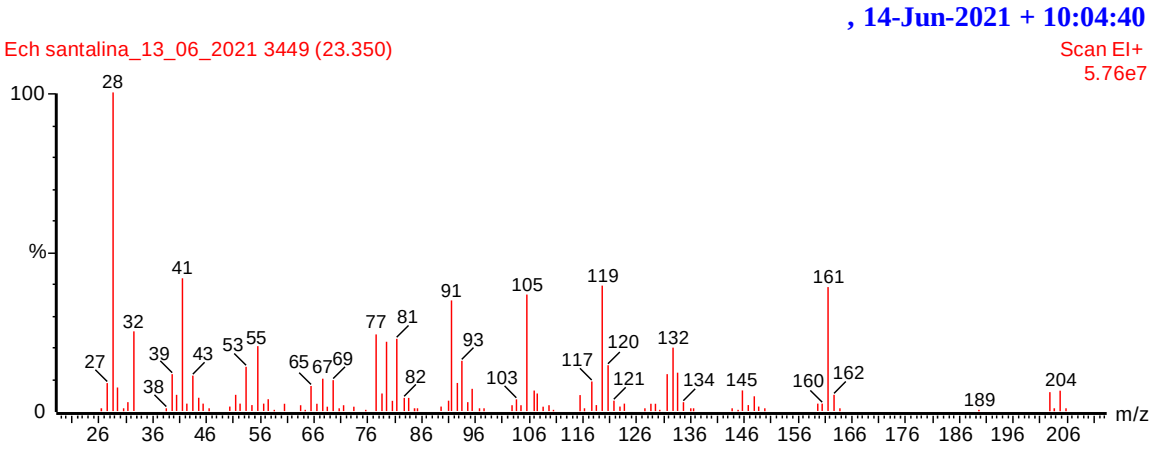


Figure 60 : Spectre masse de Beta-copaene dont le temps de rétention 23.35mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de Beta-copaene dans le temps de rétention 23.35mn.

d) 1 ,6-GERTMACRADIEN-5-OL : Temps de rétention t =24.51mn

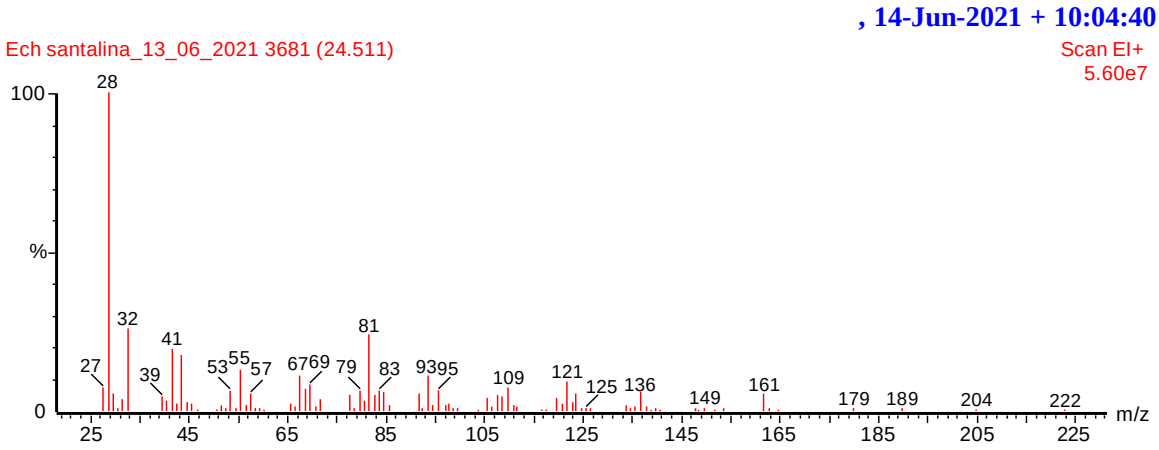


Figure 61 : Spectre masse de 1 ,6-GERTMACRADIEN-5-OL dont le temps de rétention 24.51mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de 1 ,6-GERTMACRADIEN-5-OL dans le temps de rétention 24.51mn.

e) Vulgarone A : Temps de rétention t =26.26mn

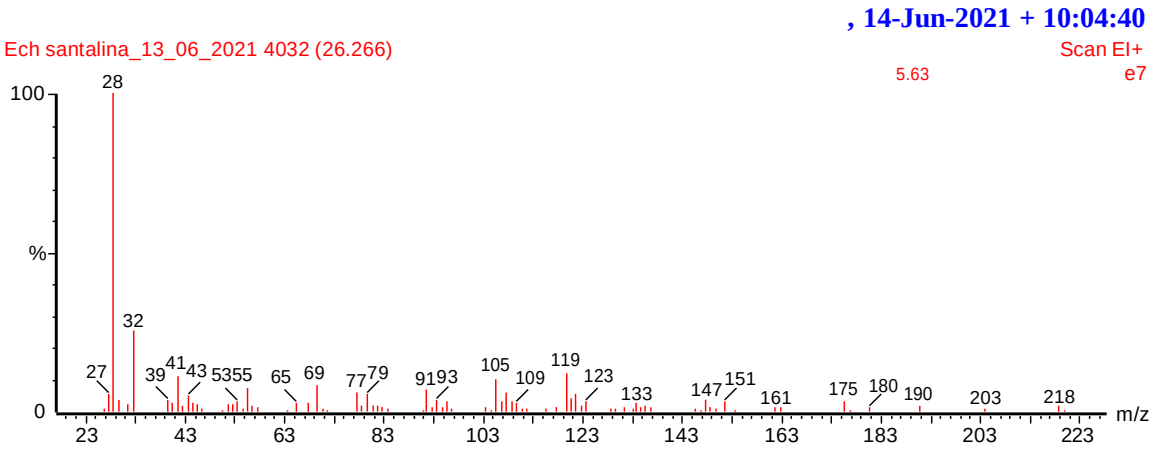


Figure 62 : Spectre masse de Vulgarone A dont le temps de rétention 26.26mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de Vulgarone A dans le temps de rétention 26.26mn.

f) LONGIVERBENONE : Temps de rétention t =28.31mn

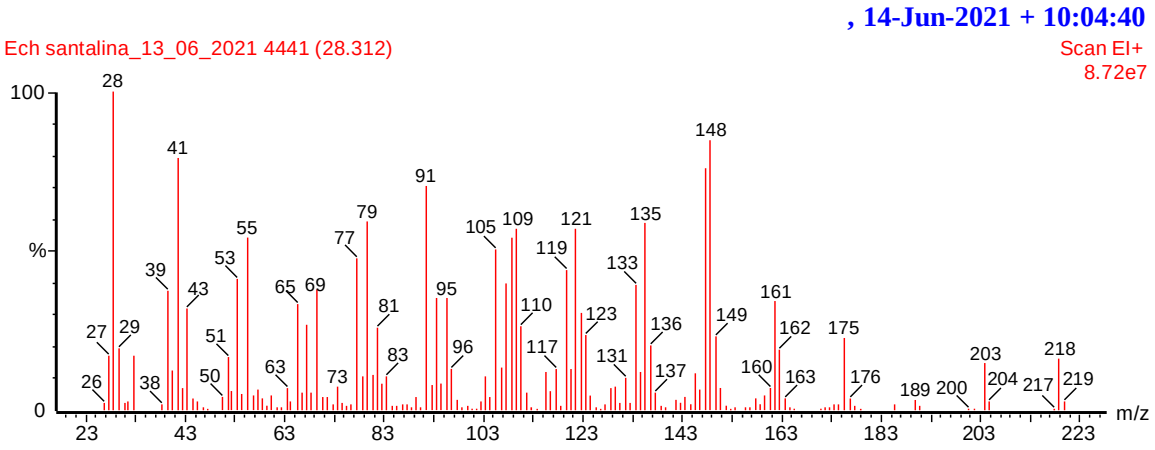


Figure 63 : Spectre masse de LONGIVERBENONE dont le temps de rétention 28.31mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de LONGIVERBENONE dans le temps de rétention 28.31mn.

g) Caryophyllene oxide : Temps de rétention t =29.43mn

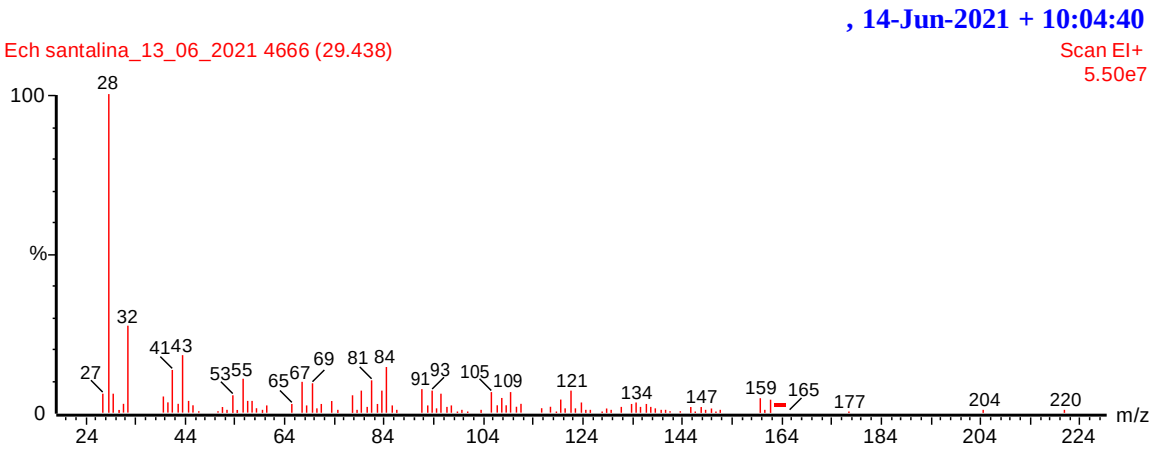


Figure 64 : Spectre masse de Caryophyllene oxide dont le temps de rétention 29.43mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de Caryophyllene oxide dans le temps de rétention 29.43mn.

h) Beta-Costal : Temps de rétention t =30.94mn

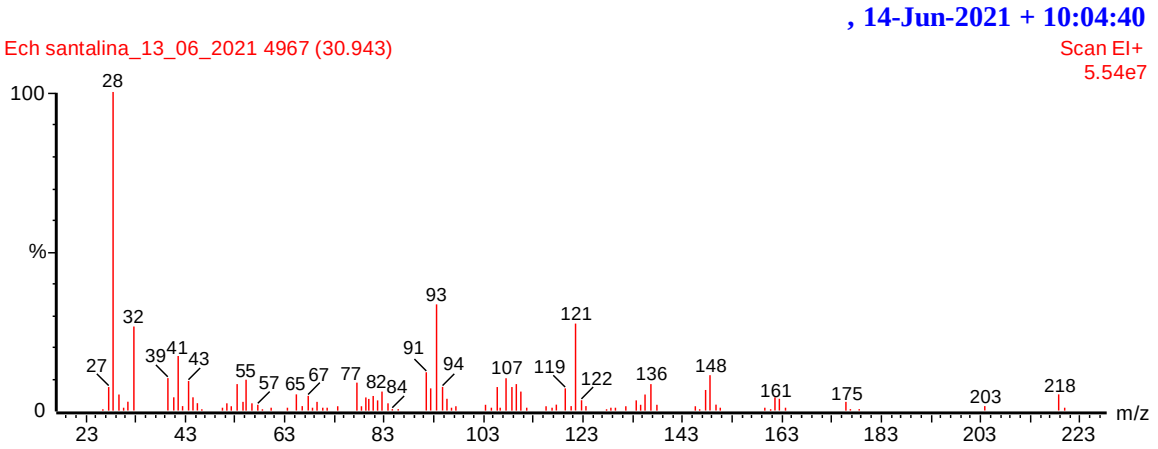


Figure 65 : Spectre masse de Beta-Costal dont le temps de rétention 30.94mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient le Beta-Costal dans le temps de rétention 30.94mn.

i) 1,6-Dioxaspiro [4.4] nona-2,8-diene, 7-(2,4-hexadiynylidene)-Temps de rétention t =32.48mn

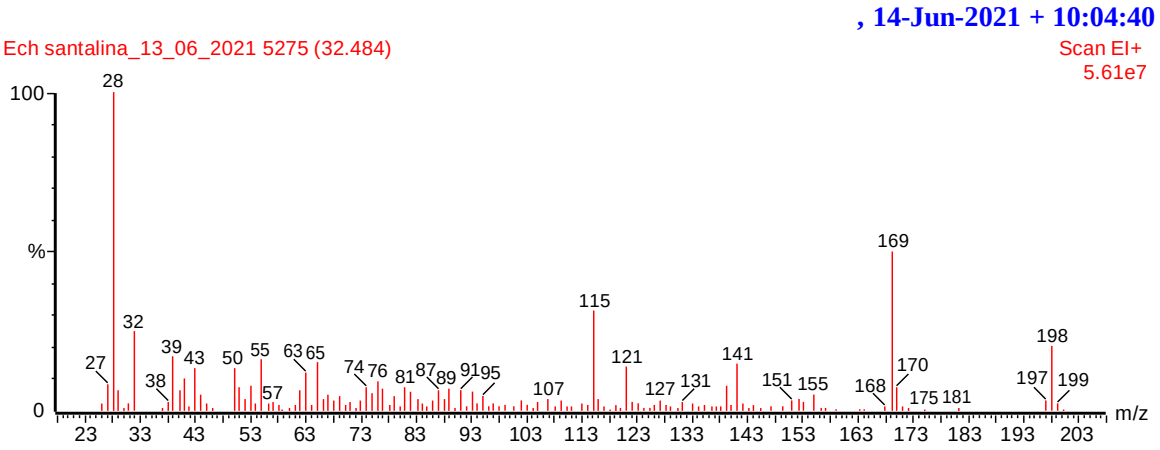


Figure 66 : Spectre masse de 1,6-Dioxaspiro [4.4] nona-2,8-diene, 7-(2,4-hexadiynylidene)- dont le temps de rétention 32.48mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de 1,6-Dioxaspiro [4.4] nona-2,8-diene, 7-(2,4-hexadiynylidene)- dans le temps de rétention 32.48mn.

j) Caryophyllene oxide : Temps de rétention t =34.20mn

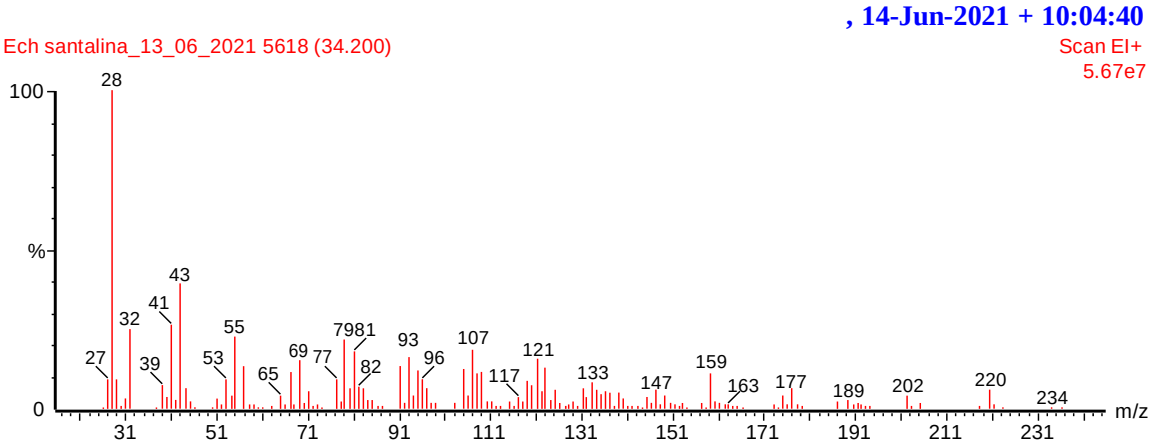


Figure 67 : Spectre masse de Caryophyllene oxide dont le temps de rétention 34.20mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de Caryophyllene oxide dans le temps de rétention 34.20mn.

k) Aromadendrene : Temps de rétention t =35.85mn

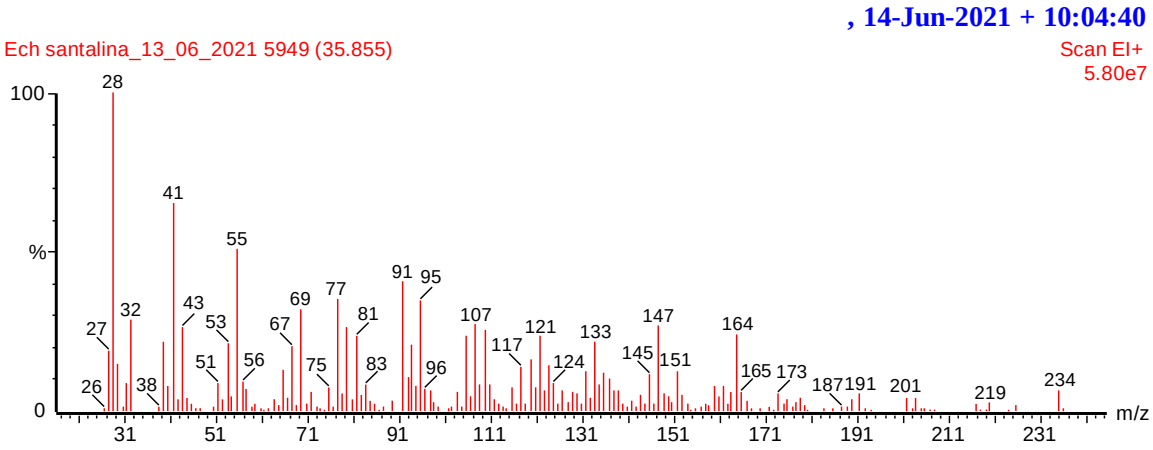


Figure 68 : Spectre masse d'Aromadendrene dont le temps de rétention 35.85mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient d'Aromadendrene dans le temps de rétention 35.85mn.

l) 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acétate : Temps de rétention t =37.54mn

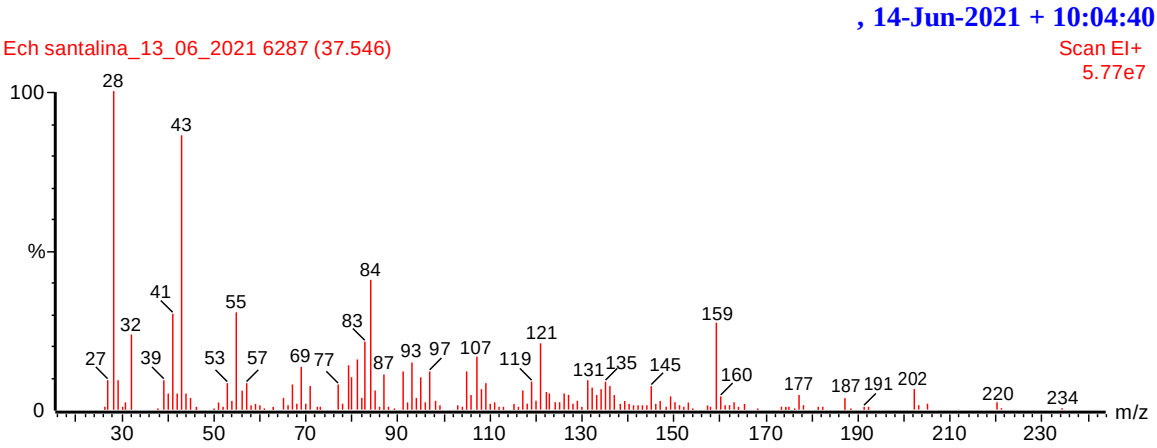


Figure 69 : Spectre masse de 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate dont le temps de rétention 37.54mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate dans le temps de rétention 37.54mn.

m) 1-Cyclopropyl-2-nonene-1-one : Temps de rétention t =38.24mn

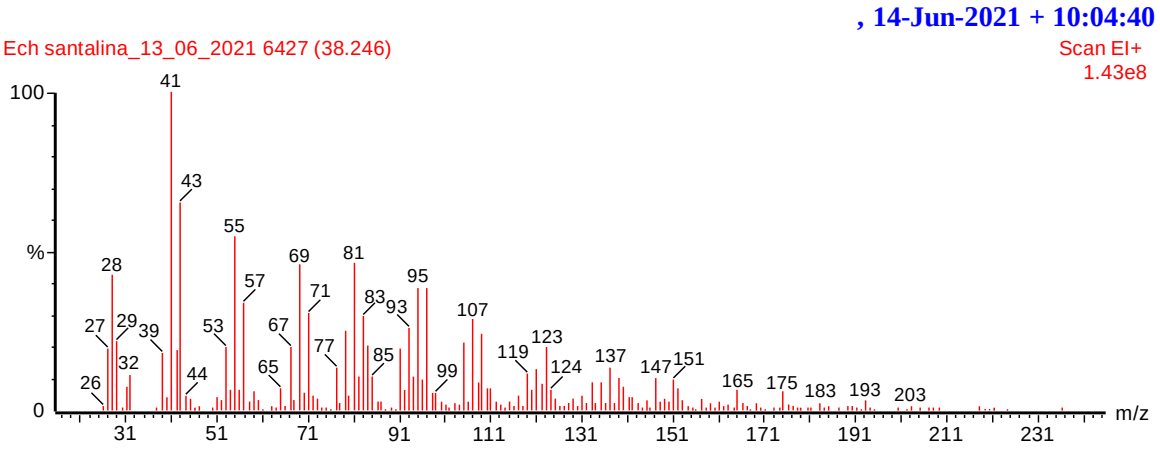


Figure 70 : Spectre masse de 1-Cyclopropyl-2-nonene-1-one dont le temps de rétention 38.24mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de 1-Cyclopropyl-2-nonene-1-one dans le temps de rétention 38.24mn.

n) Megastigma-5,7-diene-3, 4, 9-triol : Temps de rétention t =38.88mn

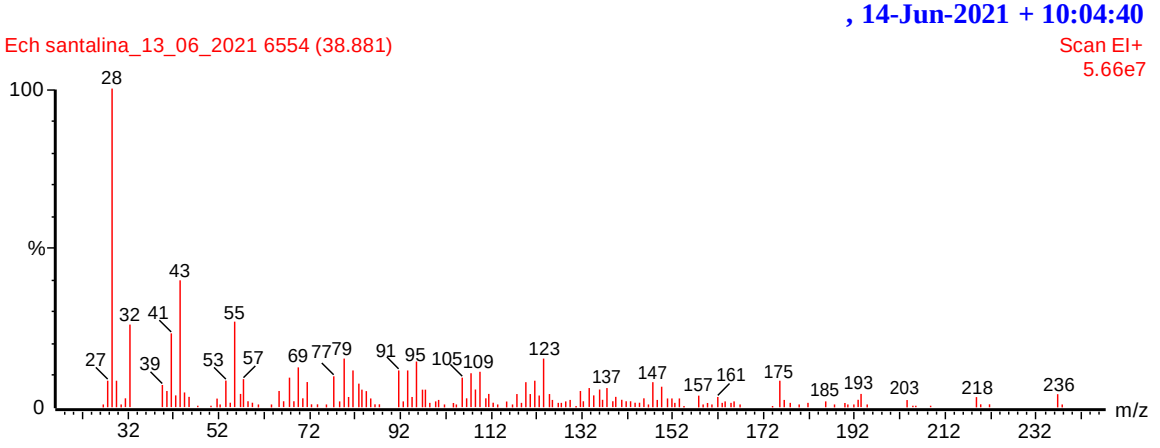


Figure 71 : Spectre masse de Megastigma-5,7-diene-3,4,9-triol dont le temps de rétention 38.88mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de Megastigma-5,7-diene-3,4,9-triol dans le temps de rétention 38.88mn.

n) **(2S, 6R')-2-(6-Methylnonyl) oxirane : Temps de rétention** t =40.32mn

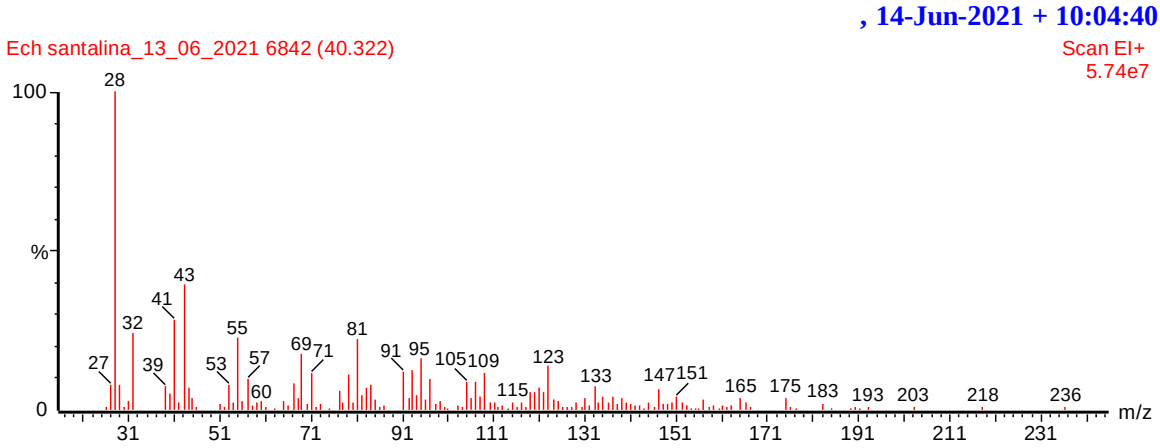


Figure 72 : Spectre masse de (2S,6R')-2-(6-Methylnonyl)oxirane dont le temps de rétention 40.32mn.

D'après les recherches bibliographiques, on note que l'extrait de *santolina chamaecyparissus* contient de (2S, 6R')-2-(6-Methylnonyl)oxirane dans le temps de rétention 40.32mn.

Enfin de notre analyse CG-MS pour l'extrait de *santolina chamaecyparissus* on peut détecter 21 spectres, et grâce à ces dernier et la recherche dans librairies spectrales (NIST, WILEY) on peut identifier 15 molécule .

Tableau 15 : Les molécules composant l'extrait *santolina chamaecyparissus* obtenu par analyse CG-MS

Molecule	**Retention time / min**	**Molecular weight / g mol^{-1}**
1 ,5-HEPTADIEN-4-ONE ,3,3,6-TRIMETHYL	22.45	152
CURCUMENE	23.26	204
Beta-copaene	23.35	204

1 ,6-GERTMACRADIEN-5-OL	24.51	222
Vulgarone A	26.26	2.18
LONGIVERBENONE	28.31	218
Caryophyllene oxide	29.43	220
Beta-Costal	30.94	218
1,6-Dioxaspiro [4.4] nona-2,8-diene, 7-(2,4-hexadiynylidene)-	32.48	198
Caryophyllene oxide	34.20	220
Aromadendrene	35.85	204
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	37.54	196
1-Cyclopropyl-2-nonene-1-one	38.24	180
Megastigma-5,7-diene-3,4,9-triol	38.88	226
(2S,6R')-2-(6-Methylnonyl) oxirane	40.32	184

Etude de l'activité antibactérienne des extraits

Antibiogramme

La mise en contact des différentes souches avec les antibiotiques a permis de réaliser un antibiogramme afin de déterminer le diamètre d'inhibition et par conséquent voire la sensibilité ou la résistance bactérienne vis-à-vis de ces derniers.

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange

(Citrus sinensis) et *Santolina chamaecyparissus* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris*, Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, AMC : Amoxicilline. (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

Huile essentielle / **Souches**	***Citrus sinensis***	***Thymus vulgaris***	***Santolina chamaecyparissus***	AMC
Staphylococcus aureus **ATCC 6538**	13	14	00	42
Pseudomonas aeruginosa **ATCC 9027**	00	10	00	32
Escherichia coli **ATCC 8739**	12	24	15	47

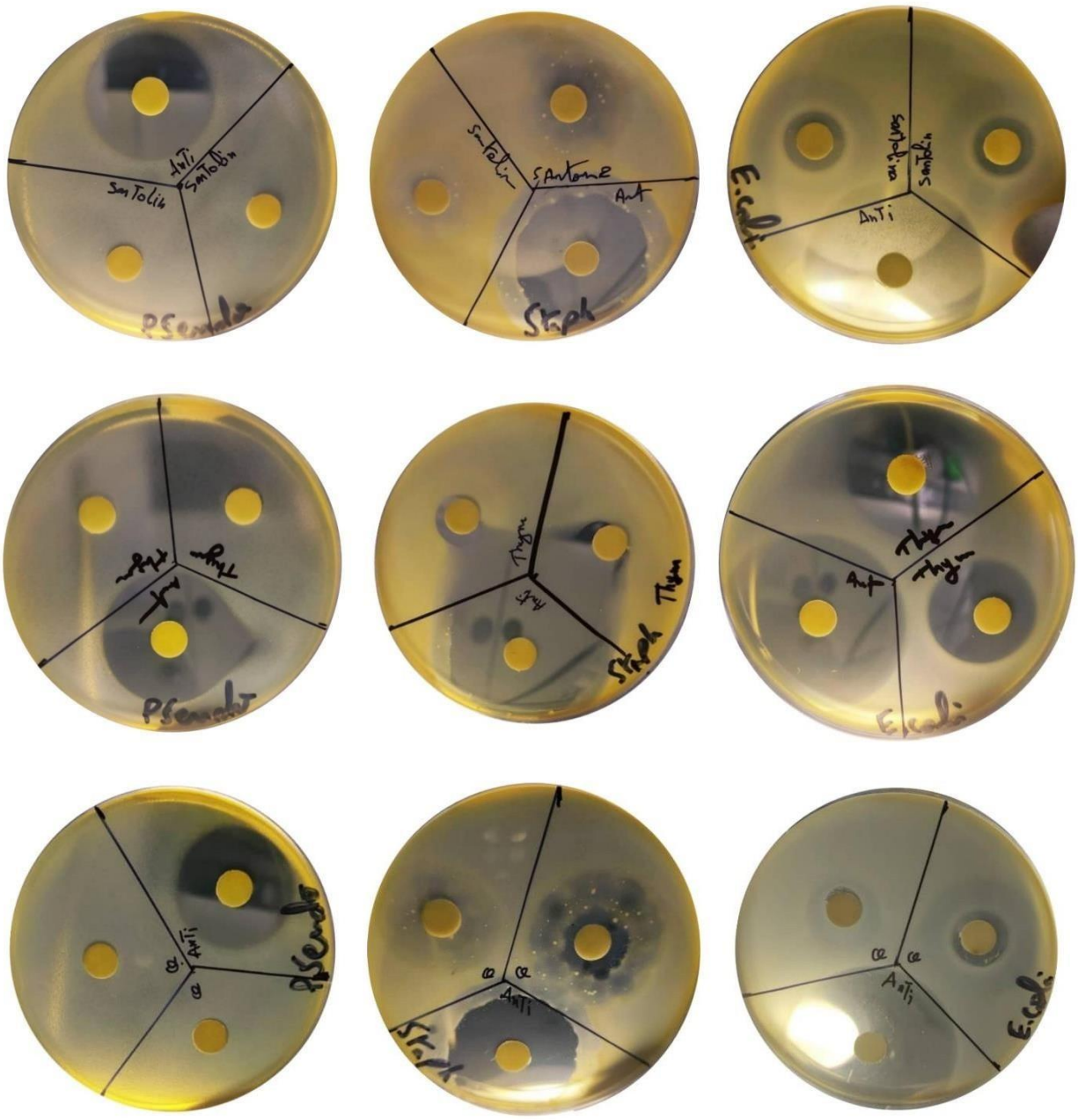


Figure 73 : Présente l'effet antimicrobien des huiles essentielle de *thymus vulgaris*, Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739.*

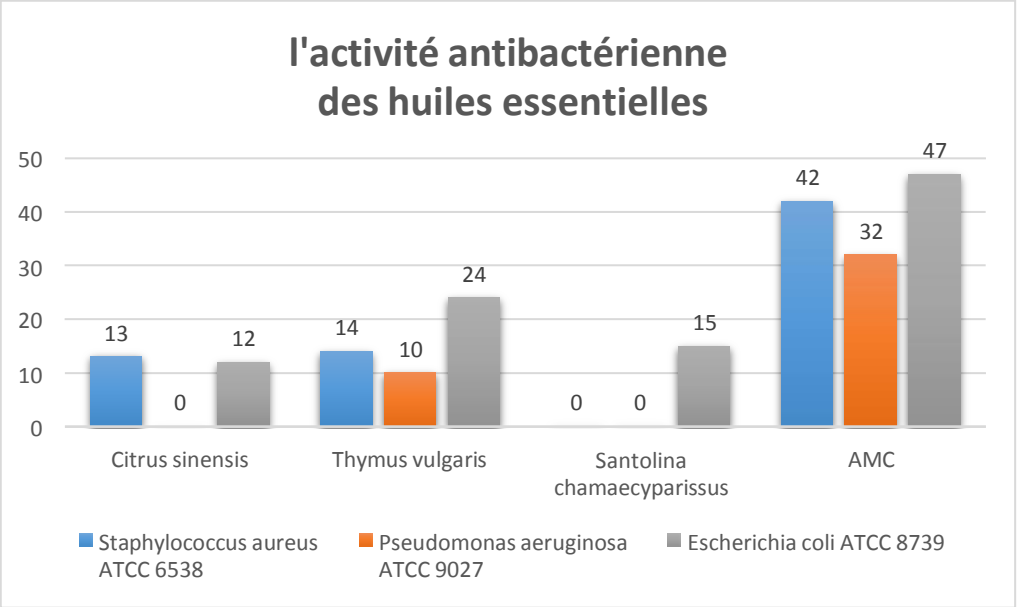


Figure 74 : Diagramme présent l'activité antibactérienne des huiles essentielles

D'après les **Figures 4 et 5** on constate que les zones d'inhibition des huiles essentielle de *thymus vulgaris,* écorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* sont importantes ce qui montre leur pouvoir antibactérien. L'huile essentielle pure du *Thymus vulgaris a* montré une forte activité envers les souches *Staphylococcus aureus ATCC 6538* et *Escherichia coli ATCC 8739* par rapport les autres huiles. Une très forte activité du *Thymus vulgaris* envers *Escherichia coli ATCC 8739* avec un diamètre d'inhibition de 24mm, tandis que l'activité est légèrement inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus ATCC 9027* dont le diamètre d'inhibition est de 14mm. Avec un diamètre d'inhibition de 10mm signalé comme un diamètre non inhibiteur envers *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.*

Ensuite l'huile essentielle pure écorce d'orange *(Citrus sinensis)* a montré une Modérément inhibitrice envers les souches *Staphylococcus aureus ATCC 6538* et *Escherichia coli ATCC 8739* avec des diamètres d'inhibition de 13mm et 12 mm respectivement, tandis que aucune activité envers *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.*

Enfin l'huile essentielle pure *Santolina chamaecyparissus* donne un est légèrement inhibiteur envers la souche *Escherichia coli ATCC 8739*

D'après nous résultats, Le meilleur effet l'activité antibactérienne des huiles essentielles a (*value* = 0,012611) obtenu par ANOVA.

Tableau 17 : Analyse statistique (ANOVA).

ANOVA

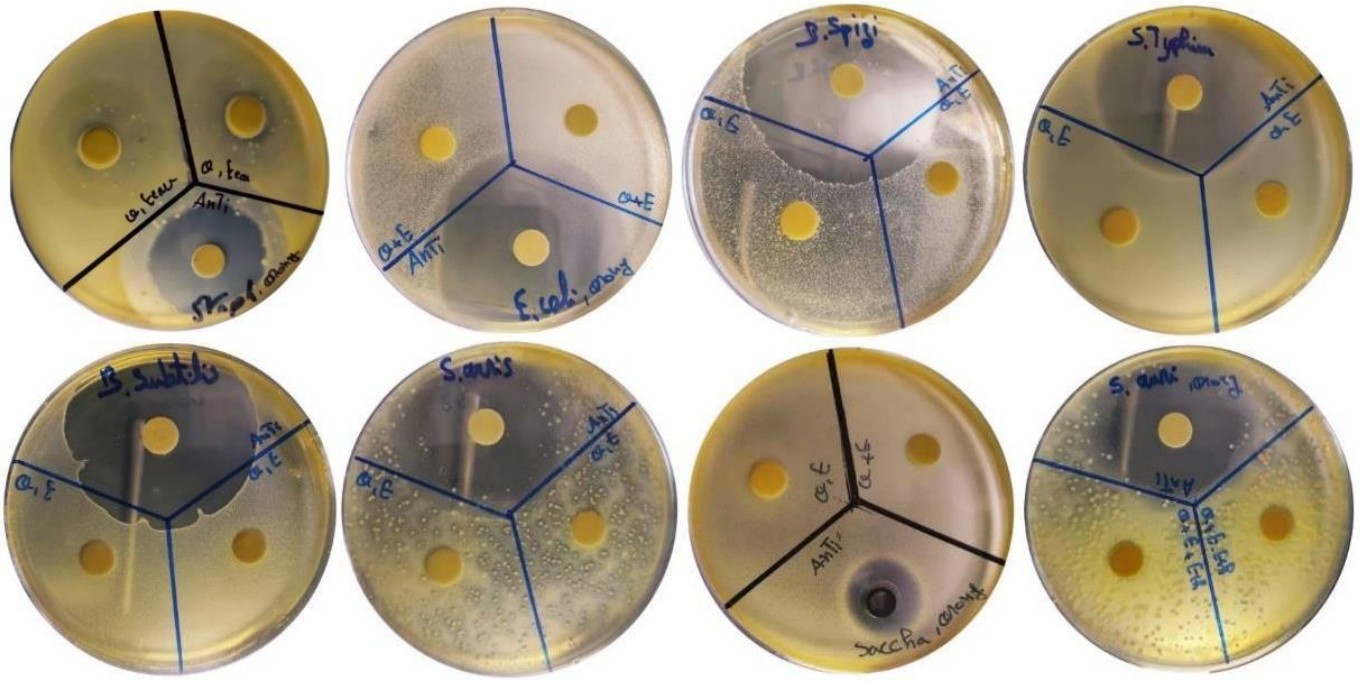
Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	1570,375	3	523,4583333	14,69356725	0,012611	6,591382
Within Groups	142,5	4	35,625			
Total	1712,875	7				

Tableau 18 : Activité antibactérienne des extraits de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, avec des antibiotique AMC, AMP, LEV, RIF, NYS (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

Extrait / Souches	**TE+ETH**	**OE + ETH**	**O+E**	**SE + ETH**	**SE + acétone**	**S+E**	**GEL 1**	**AMC**	**AMP**	**LEV**	**RIF**	**NYS**
***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**	11	00	00	23	00	23	25	35	38	30	30	
***Staphylococcus aureus* isolé**	-	-	-	23	00	23	00	35	-	-	-	-
***Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228**	41	34	34	20	17	42	00	58	-	-	-	-
***Salmonella typhimurium* ATCC 14028**	00	00	00	-	00	00	00	32	30	15	9	-
***Bacillus subtilis* ATCC6631**	18	00	00	23	00	21	00	49	50	38	23	-
***Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633**	26	13	00	20	00	34	00	55	55	35	23	-

***Escherichia coli* ATCC 8739**	00	00	00	00	00	16	00	54	55	35	9	-
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027**	00	00	00	00	00	00	00	30	33	33	00	-
***Candida albicans*ATCC 10231**	00	00	00	00	00	00	00	-	-	-	-	-
***Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763**	00	00	00	00	00	00	00	-	-	-	-	20

L'effet antibactérien des extraits d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque et sur cylindre. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18.



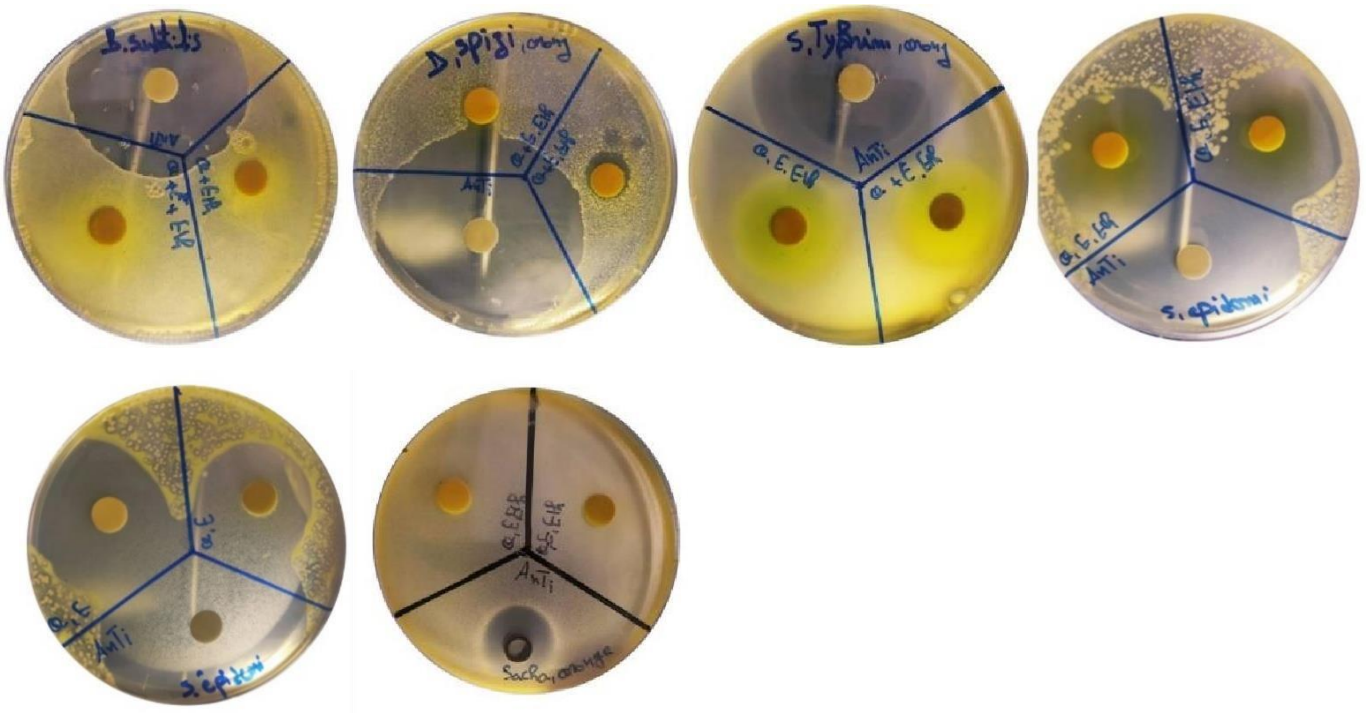


Figure 75 : Présente l'effet antimicrobien des extraits d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763.

La **figure 75** Présente l'effet antimicrobien des différents extraits de d'écorce d'orange l'espèce *Citrus sinensis* vis-à-vis les microorganismes testés, les meilleurs diamètres des zones d'inhibition sont compris 34mm avec *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ce diamètre considéré comme un diamètre très fortement inhibitrice. L'extrait d'écorce d'orange *(Citrus sinensis)* extraire à (70% Ethanol, 30% Eau) a montré une activité Légèrement inhibitrice avec *Bacillus subtilis* ATCC 6631. L'antibiotique a montré une forte activité envers toutes les souches.

L'effet antibactérien des extraits de *thymus vulgaris* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18.

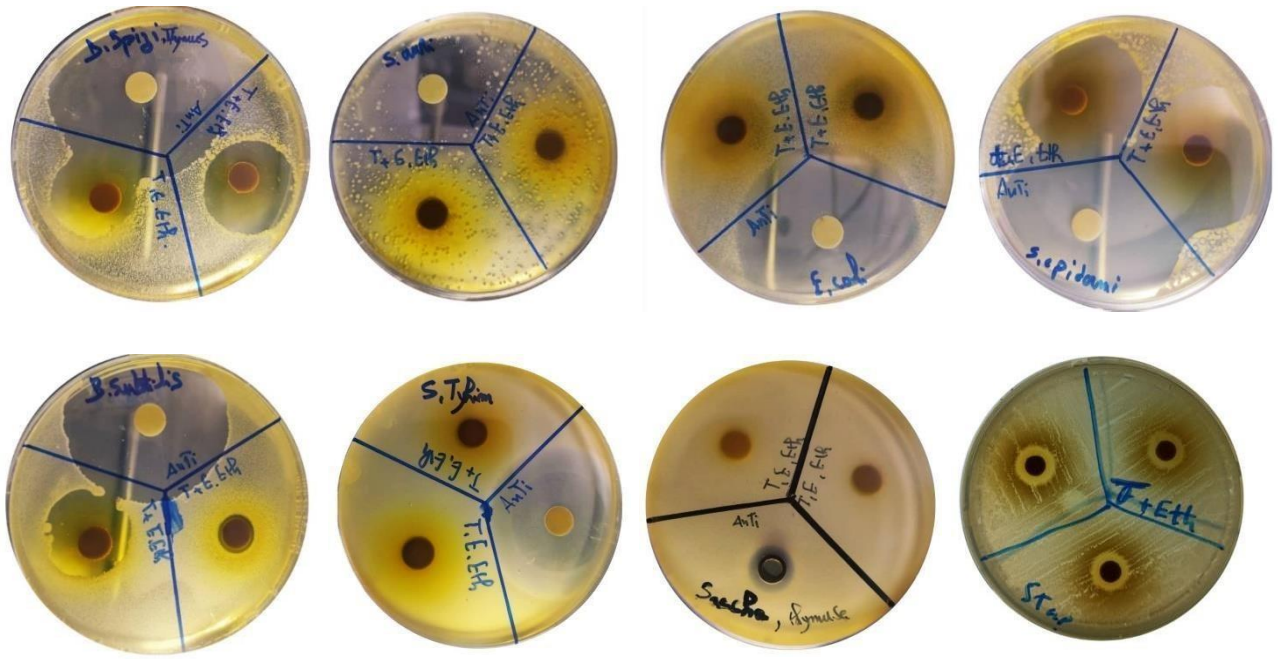


Figure 76 : Présente l'effet antimicrobien des extraits *Thymus vulgaris* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763.

La *Bacillus subtilis* ATCC6631 a résisté vis-à-vis l'extraits de *thymus vulgaris* cela est liée à sa grande capacité de développer une résistance envers nombreux agents antimicrobiens ce qui revient à la structure particulière de la membrane externe de ce genre, particulièrement imperméable aux molécules hydrophobes **(Nordmann P *et al* 2006).**

Par ailleurs, la paroi des bactéries Gram+ est riche en protéines tandis que chez les souches Gram– est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé Alors que les bactéries Gram+ sont moins protégées contre les agents antibactériens **Blackmore CG *et al* 2001.**

Le mode d'action des extraits de thym dépend en premier lieu à leurs compositions et la propriété hydrophobe de leurs constituants, ainsi que leurs teneurs élevés en phénols tell que le carvacrol et le thymol qui sont des composés phénoliques connus par leurs propriétés antimicrobiennes **(Fadli M *et al.* 2012).** Et d'après **dorman *et al* (2000)** le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l'α-terpinéol. **(Aznar, A *et al.* 2015).**

En effet plusieurs études ont estimé que l'action des extraits de thymus est due à la concentration élevée du thymol et α–terpinène, et malgré la petite concentration du carvacrol et bornéol dans la composition on peut les considérer comme des composés clés avec lequel Le thymol et le carvacrol sont les plus bactéricides **(Zohary *et al.* 2004).**

L'activité antifongique des huiles du Thym sont attribuées au Thymol et au carvacrol. Ils provoquent une dégénérescence des champignons (hyphes) qui semblent à vider leur contenu cytoplasmique **(Edris, 2007).** Tandis que le mécanisme de toxicité phénolique est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif et dégradent la membrane plasmique des levures **(Celimene *et al*. 1999).**

L'effet antibactérien des extraits *Santolina chamaecyparissus* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18.

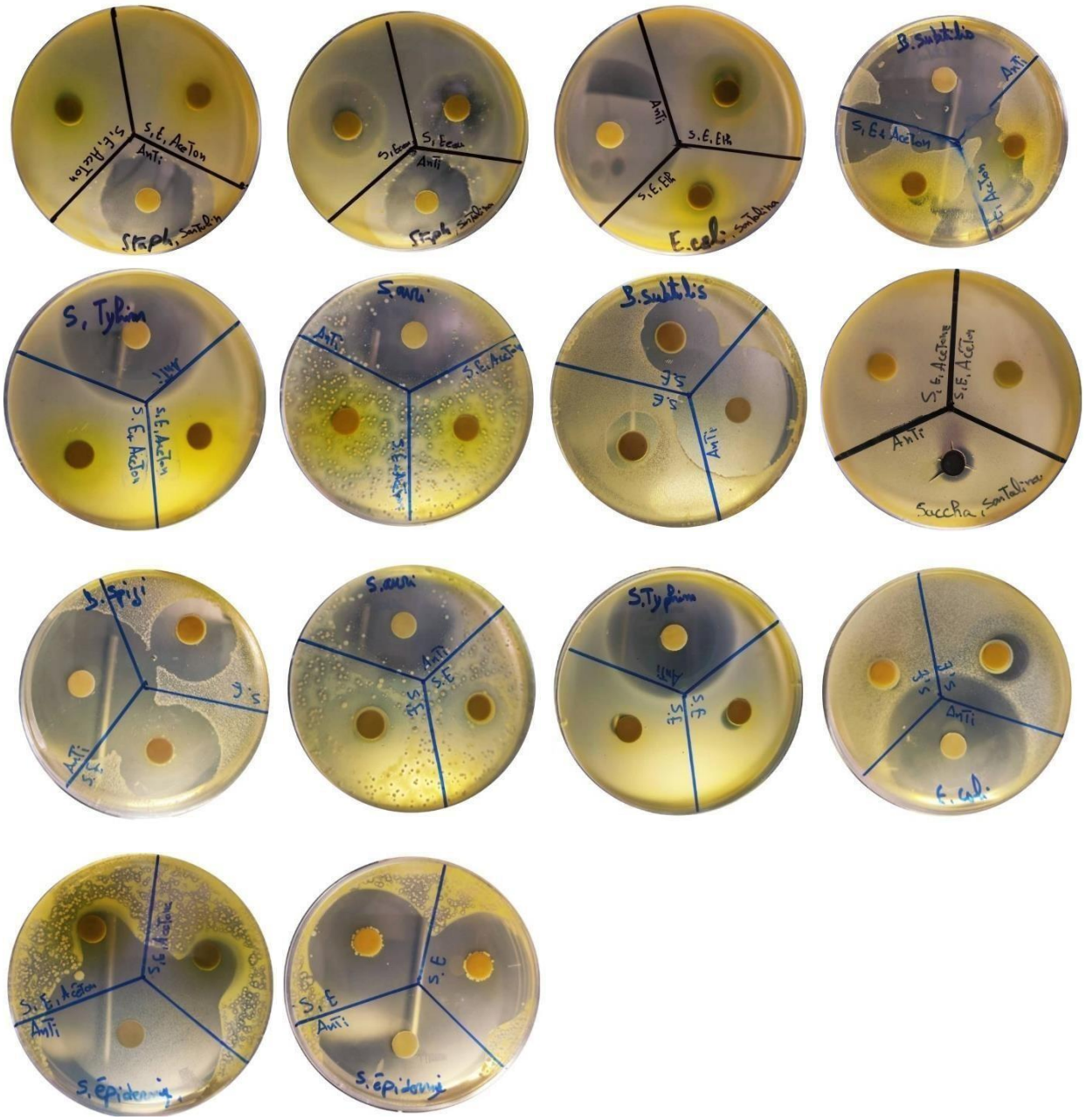


Figure 77 : Présente l'effet antimicrobien des extraits *Santolina chamacyparissus* et l'antibiotique AMC sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763.

L'effet antibactérien de notre gel **Orthymosan** est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 18.

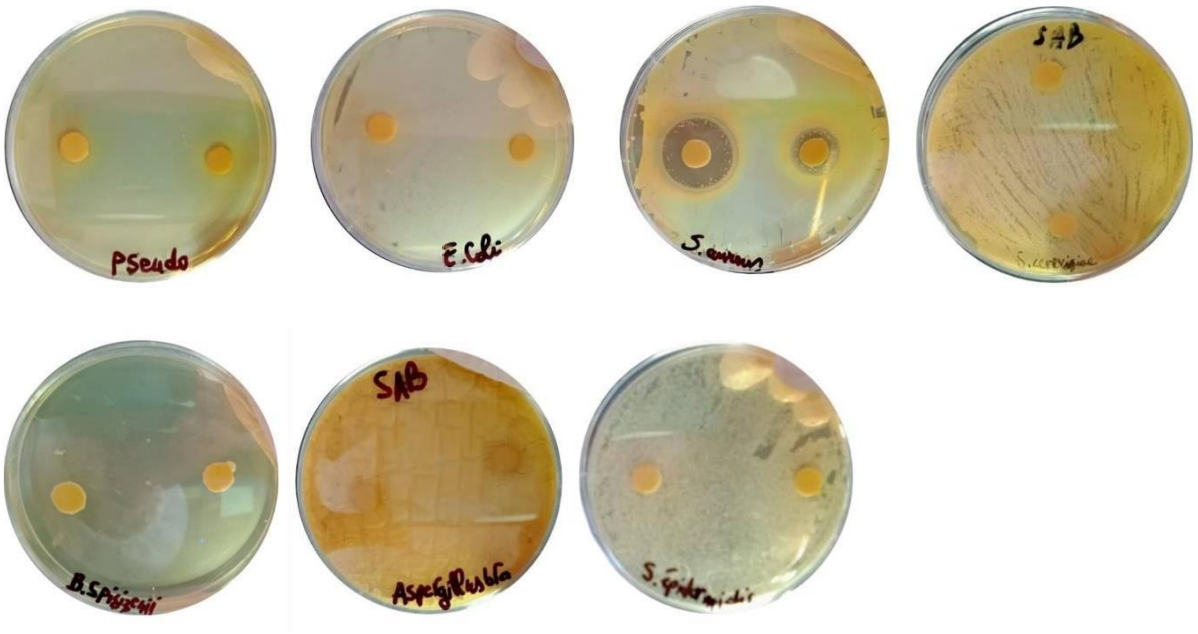


Figure 78 : Présente l'effet antimicrobien de notre gel Orthymosan sur les bactéries *: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* et *Escherichia coli ATCC 8739. Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus Spizizenii* ATTCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763.

Au regard des résultats présentés dans la figure 51, l'extrait aqueux c'est le meilleur extrait pour l'activité antibactérienne par rapport à l'extrait acétone + eau et éthanol + eau de la plante santolina à la concentration de 50 mg/ml, présente une activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des bactéries testées. L'analyse de ces résultats montre clairement un effet plus important de cet extrait sur les bactéries Gram positif. En effet, l'absence de zone d'inhibition dans les boîtes test ensemencées avec *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*, Salmonella typhimurium ATCC 14028 Candida albicans ATCC 10231, Saccharomyces cerevisiae ATCC19763. Ces résultats, traduisent clairement une plus grande sensibilité des bactéries Gram + a l'extrait applique. Des résultats similaires sont rapportés par **ORAK *et al* (2011)** ; **HAOUAT *et al* (2012).** D'une façon plus générale, plusieurs études font état d'une activité accrue des composés phénoliques sur les bactéries Gram positif comparativement aux bactéries Gram négatif **(TODA *et al*, 1989 ; IKIGAI *et al*, 1993 ; ARAKAWA *et al*, 2004).** La raison de ce contraste de sensibilité, est attribuée aux différences dans les constituants de la membrane cellulaire ainsi qu'à leur agencement. Il est admis que les bactéries Gram positif contiennent un peptidoglycan, qui est une barrière d'impermeabilite inefficace ce qui permet aux molécules d'atteindre leur cible **(SCHERRER et GERHARDT, 1971)**.

L'effet antibactérien des combinaisons des extraits de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange

(Citrus sinensis) et *Santolina chamaecyparissus* est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur disque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Activité antibactérienne des combinaisons des extraits de *thymus vulgaris,* Ecorce d'orange *(Citrus sinensis)* et *Santolina chamaecyparissus* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm, avec des antibiotique AMC, AMP, LEV, RIF, NYS (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

Mélange / Souches	1	2	3	4	5	6	AMX	AMP	LEV	RIF	NYS
Staphylococcus aureus ATCC 6538	00	00	00	00	00	00	35	38	30	30	
Salmonella typhimurium ATCC 14028	00	00	00	00	00	00	32	30	15	9	-
Bacillus subtilis ATCC6631	15	00	15	11	11	11	49	50	38	23	-
Bacillus Spizizenii ATTCC 6633	14	00	12	13	15	15	55	55	35	23	-
Escherichia coli ATCC 8739	00	00	00	00	00	00	54	55	35	9	-
Saccharomyces cerevisiae ATCC19763	00	00	00	00	12	00	-	-	-	-	20

Détermination du l'activité antioxydant

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits végétaux deux techniques ont été réalisées : On a utilisé la technique de **radical 2.2'-diphényle-1-picrylhdazyl (DPPH).**

Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits a été aussi estimé avec la méthode de DPPH. En effet, c'est celle qui est utilisée dans le monde entier **(Scherveret Godoy, 2009)** et la plus populaire pour le dépistage de l'activité anti-radicalaire d'un composé unique ou d'un mélange de composés. Cette méthode est considérée, d'un point de vue méthodologique,

comme l'une des plus faciles, plus précise et productive de l'activité antioxydante des jus des fruits, des extraits de plantes et des composés purs comme les flavonoïdes **(Pereira Nunes Et Al, 2012).**

Le radical DPPH est l'un des substrats le plus utilisé généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse **(Bozin Et Al., 2008).**

Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2, 2'- diphényl-1picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune en présence de capteurs de RLS, et se réduit en 2,2'-diphényle-1-icrydrazine **(Burits Et Bucar, 2000).**

Après 30 min d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différente concentration), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les trois extraits. Ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que l'échantillon a un effet Scavenger de radical DPPH.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH dans sa forme non radicalaire. À partir de ces courbes, nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur d'IC50 de chaque extrait.

Nous avons opté pour tester les différents extraits de l'écorce de *Citrus sinensis* , *Thymus vulgaris* et *Santolina chamaecyparissus* les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait d'après la courbe d'acide ascorbique, les résultats représentés dans nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons **(Ozturk Et Al, 2007 ; Su Et Al, 2008 ; Liuk Et Al,2009).**



Figure 79 : Résultats de DPPH d'extrait de *Thymus vulgaris* à différentes concentrations.

L'activité antioxydante des extraits peut être visualisée par le passage de la couleur violette DPPH+ à la couleur jaune DPPHH pour différentes concentrations d'extrait dans une solution de DPPH (**Figure 52**).

Les valeurs présentées selon les figures ; montrent le pouvoir réducteur des extraits a différentes concentrations.

- **AA % d'extrait de *citrus sinensis***

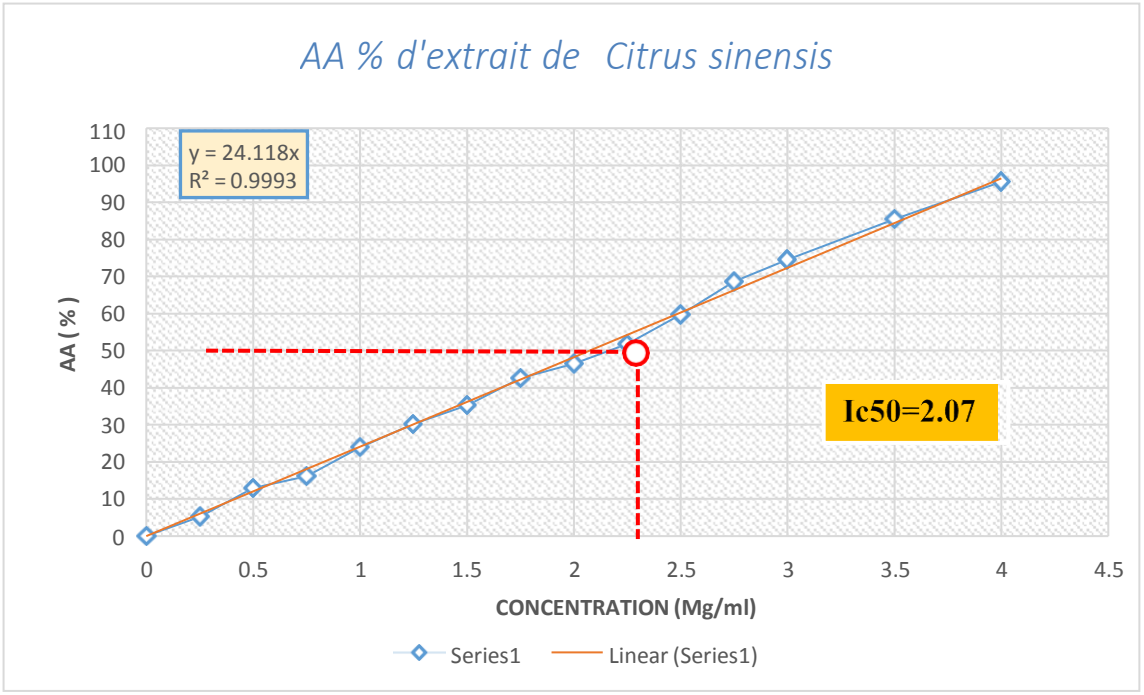


Figure 80 : Activité antiradicalaire d'extraits de l'écorce de citrus sinensis.

➢ **AA % d'extrait de *thymus vulgaris***

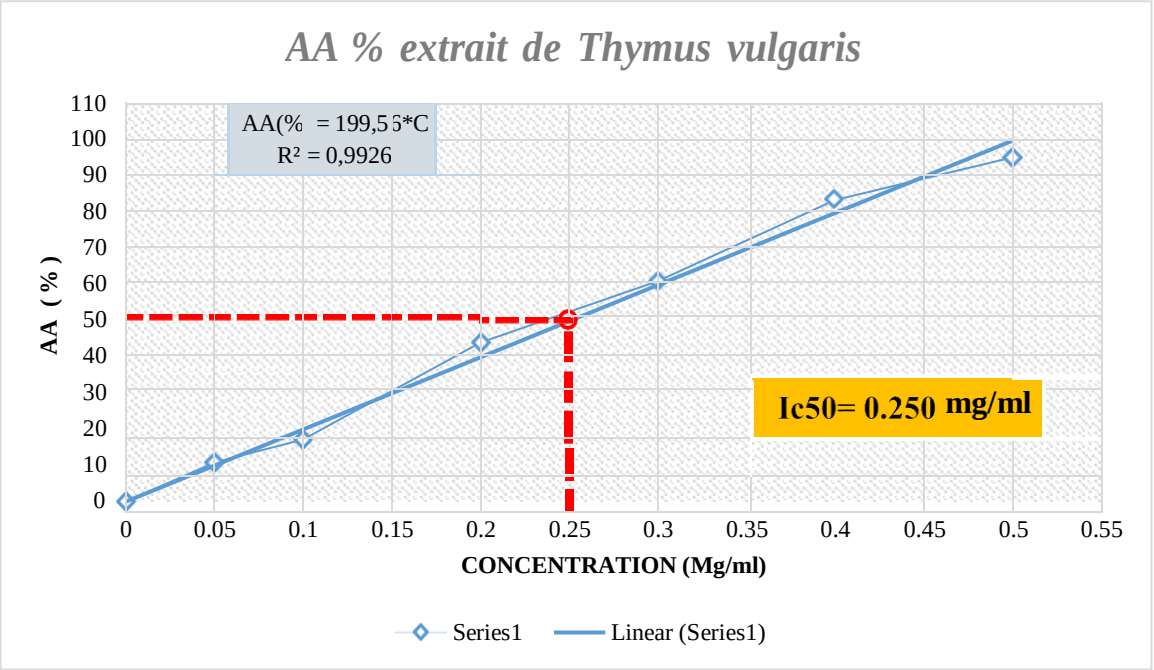


Figure 81 : activités anti radicalaire d'extraits de *thymus vulgaris*.

➢ **AA % d'extrait de santolina chamaecyparissus**

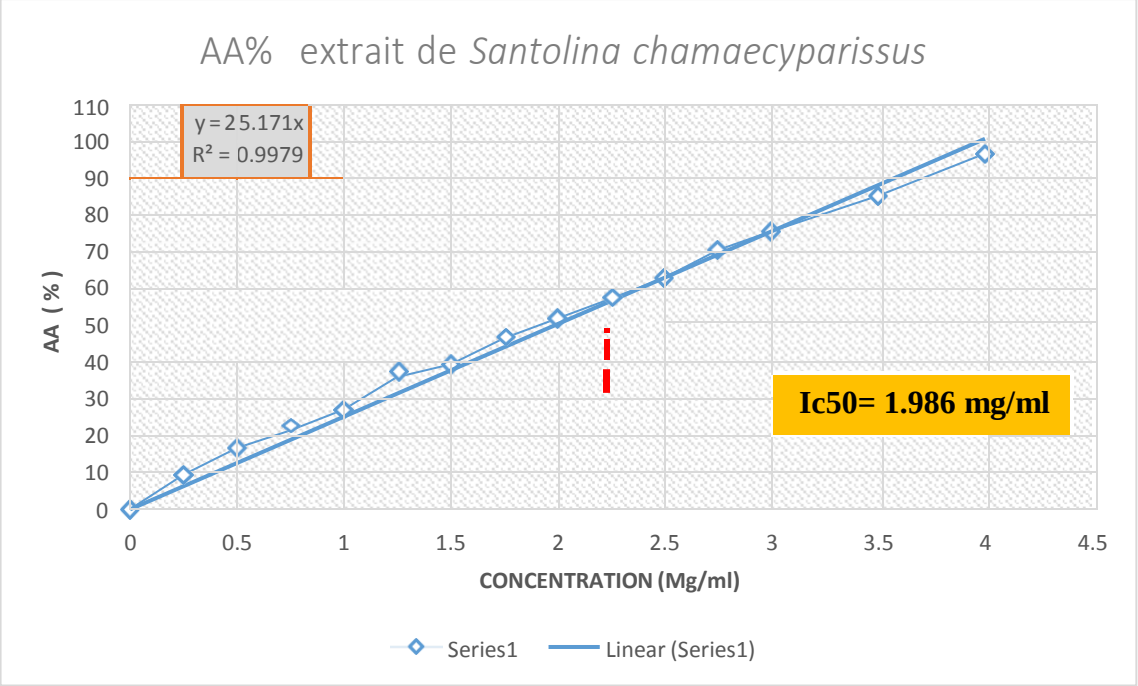


Figure 82 : Activités anti radicalaires d'extraits de santolina chamaecyparissus.

La **figure :** indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations des extraits testés. A la plus faible

concentration (0 mg/ml), l'extrait du *santolina chamae*cyparissus tandis qu'à la plus grande concentration (4mg/ml), Ceci montre que l'espèce *santolina chamae*cyparissus possède un potentiel antioxydant.

La **figure n :** indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations des extraits testés. A la plus faible concentration (0 mg/ml) PI=0 %, tandis qu'à la plus grande concentration (0.5 mg/ml) PI=95.14% Ceci montre que l'espèce *Thymus vulgaris* possède un grand potentiel antioxydant.

Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de concentration des extraits (DO a 517 nm) est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique.
Tous nos extraits présentent des activités antioxydant nettement inférieures à celle de la référence (Acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0,066 mg/ml notons que notre extrait présente une activité antioxydante acceptable.
L'activité antioxydante évaluée pour les différents extraits de citrus que le standard utilisé est exprimé en IC50 (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre (DPPH**), plus L'IC50 est faible plus l'extrait est doté d'un potentiel antioxydant puissant**. L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC50 est représenté dans le tableau ci -dessous (figure) :

Tableau 20 : l'IC50 de test DPPH pour nos extraits

L'espèce	IC50 mg/ml
Citrus sinensis	2.073
T. vulgaris	0,250
Santolina chamaecyparissus	1.986
Acide ascorbique	0.06

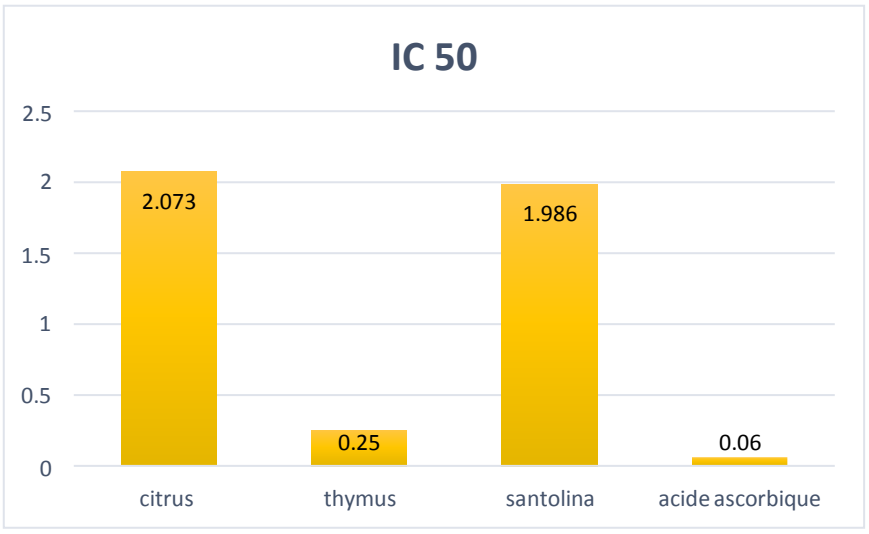


Figure 83 : Histogramme représente l'IC 50 de test antioxydant par DPPH

Selon ces résultats, il est à constater que quel que soit l'espèce, l'écorce d'orange est plus active que thymus et santolina ; toutefois, cette activité antioxydante est significativement importante par rapport aux standards utilisés (acide ascorbique) qui a donné une IC50 égale mg/ml.

La différence dans l'activité anti-radicalaire au DPPH entre les trois extraits analysés est probablement due à leur composition en différents composés phénoliques. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés, ces interactions peuvent exister dans un extrait pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits.

Nos résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui ont montré que l'écorces de citrus représentent la fraction la plus riche en polyphénols, laquelle a révélé un potentiel antioxydant puissant **(Bacco Et Al. 1998 ; Gorinstein Et Al. 2001).**



Figure 84 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

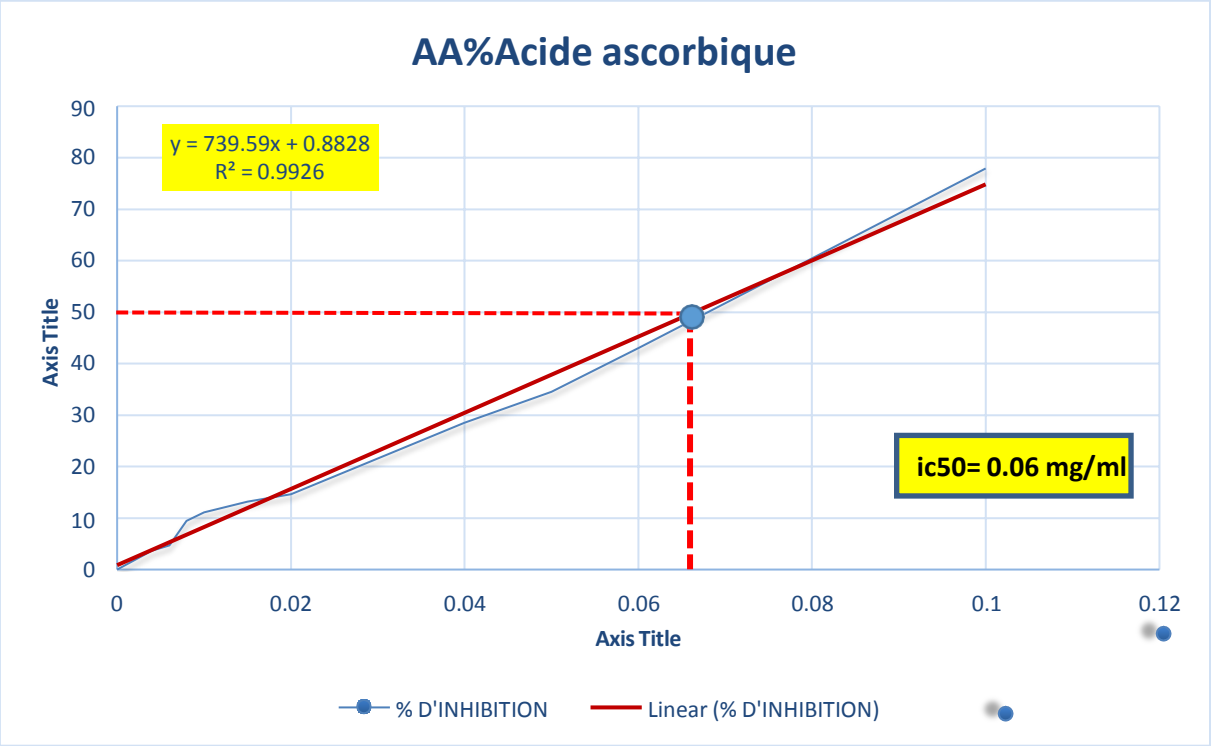


Figure 85 : Activité antioxydant de l'acide ascorbique

La figure 3 indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations des extraits testés. A la plus faible concentration (0mg/ml) l'extrait du *Citrus sinensis* tandis qu'à la plus grande concentration (4mg/ml). Ceci montre que l'espèce Citrus sinensis possède potentiel antioxydant.

IV.2 Résultats de la toxicité aigue

Sur deux lots de 6 souris, nous avons testé notre gel buvable à une seule dose (100%) pendent 15 jours, les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Résultats de la toxicité aigüe de notre gel buvable après 15 jours

Lot	Dose administrée	Nombre d'animaux par lot	Nombre de mortalité	% de mortalité
Lot 1 **Tamssonate plus**	100% gel	06	00	00%
Lot 2 **Orthymosane**	100 % gel	06	00	00%

Au cours de notre étude et selon les conditions expérimentales, aucun trouble de comportement n'a été observé, nous pouvons dire que les deux gels n'est pas toxique.

IV.3 Activité anti-inflammatoire

Tableau 22 : Lot I : mis en évidence de l'effet de l'extrait pure (contient 1ml de chaque extrait)

N ° de souris	Moyenne	Regulateur
Poids (g)	18	--
Épaisseur initiale à t_0	1,15333333	1
Après injection du carraghénine t_1	2,6	2,254335
Après 30 min à t_2	1,91333333	1,65896
Après 60 min à t_3	1,67666667	1,453757
Après90 min à t_4	1,52666667	1,323699
Après 120 min à t_5	1,42666667	1,236994
Après 150 min à t_6	1,27666667	1,106936
Après 180 min à t_7	1,2	1,040462

Tableau 23 : Lot II : Témoin positive (effet du médicament de référence le Diclofénac®)

N ° de souris	Moyenne	
Poids (g)	20	--
Épaisseur initiale à t_0	1,08333333	1
Après injection du carraghénine t_1	2,2	2,030769
Après 30 min à t_2	1,83666667	1,695385
Après 60 min à t_3	1,68	1,550769
Après90 min à t_4	1,54333333	1,424615
Après 120 min à t_5	1,39	1,283077
Après 150 min à t_6	1,24	1,144615
Après 180 min à t_7	1,11666667	1,030769

Tableau 24 : Lot III : mis en évidence de l'effet de l'extrait diluée (contient 0.5ml de chaque extrait + 3.5ml de l'eau distillé)

N ° de souris	Moyenne	
Poids (g)	19	--
Épaisseur initiale à t_0	1,15666667	1
Après injection du carraghénine t_1	2,12333333	1,835735
Après 30 min à t_2	1,89666667	1,639769
Après 60 min à t_3	1,79333333	1,550432
Après90 min à t_4	1,70333333	1,472622
Après 120 min à t_5	1,61333333	1,394813
Après 150 min à t_6	1,56333333	1,351585
Après 180 min à t_7	1,52	1,314121

Tableau 25 : Lot IV : mis en évidence de l'effet phlogogène de la carraghénine (administré par solution physiologique)

N ° de souris	Moyenne	
Poids (g)	18.66	--
Épaisseur initiale à t_0	1.14	1
Après injection du carraghénine t_1	2.09	1,830904
Après 30 min à t_2	1.83	1,603499
Après 60 min à t_3	1.69	1,521866
Après90 min à t_4	1.54	1,431487
Après 120 min à t_5	1.33	1,346939
Après 150 min à t_6	1,25666667	1,25656
Après 180 min à t_7	1,15333333	1,166181

Ci-dessous les 4 courbes dans un seul repère pour faciliter leur comparaison :

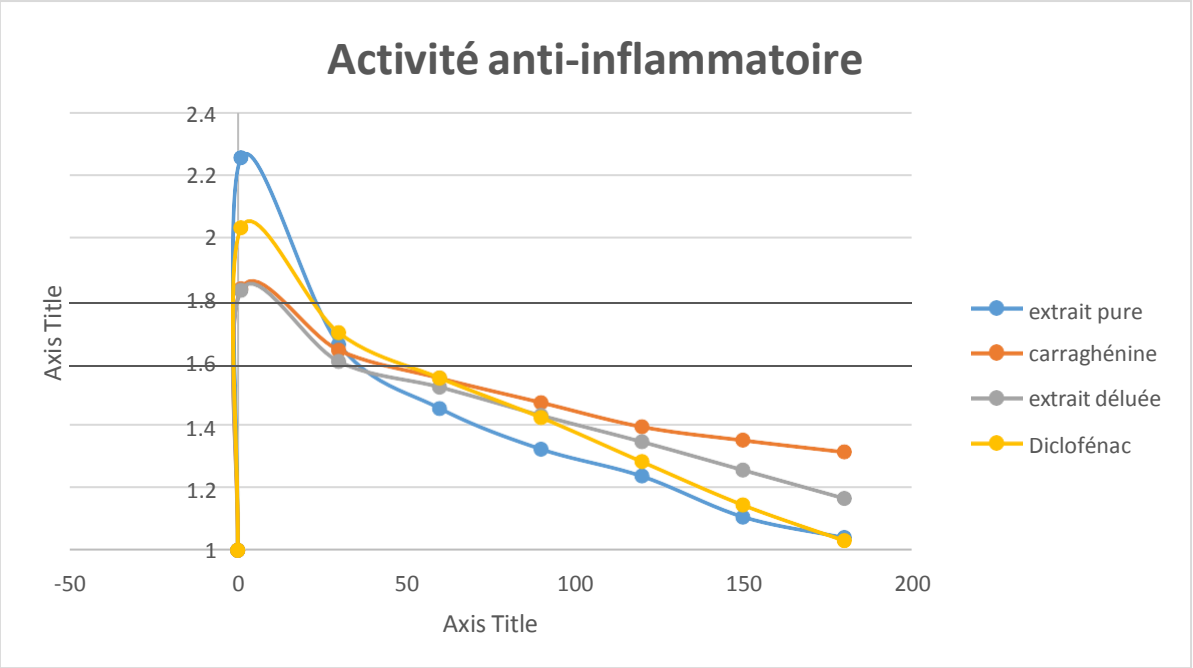


Figure 86 : Graphe qui montre l'évolution des épaisseurs des pattes, pour les 4

Lot I : on constate à travers la diminution de l'épaisseur des pattes, que l'inflammation a régressée sensiblement et pas de grande différence par rapport le Diclofénac®.

Lot II : la diminution de l'épaisseur des pattes par le Diclofénac® est meilleur (témoin positif).

Lot II : l'extrait dilué est moins sensible par rapport Lot I de l'extrait pur.

Lot VI : la légère régression est naturelle, toute inflammation est appelée à disparaître par une réaction de défense de l'organisme, la diminution de l'épaisseur des pattes est lente.

L'œdème plantaire est l'un des principaux facteurs utilisés pour l'évaluation du degré d'une inflammation aigue et de l'efficacité des nouveaux médicaments anti-inflammatoires **(Begum et Sadique, 1988)**. Son induction par injection de la carragénine est utilisé comme modèle expérimental standard **(Banerjee *et al.*, 2000)**. Ce phénomène se caractérise habituellement par une réponse biphasique. La première phase (1 - 2 heures) dépend de la libération de médiateurs chimiques tels que, l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. La deuxième phase (3 – 6 heures) est soutenue par la libération de prostaglandines, leucotriènes, lysozymes, protéases et oxyde nitrique (NO) **(DiRosa *et al.*, 1971 ; Olajide *et al.*, 1999 ; Posadas *et al.*, 2004)**. Les eicosanoïdes (leucotriènes et prostanoïdes) induisent la biosynthèse d'élastase, collagénase et d'autres composés. Ces enzymes décomposent les protéines structurales en peptides provoquant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la pression hydrostatique. Cela entraîne par conséquent, la formation d'un oedème et la migration des neutrophiles vers les tissus endommagés **(Havsteen, 2002)**. Ces derniers produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que l'anion superoxyde (O2˙-), le radical hydroxyle (OH˙) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) qui contribuent à la réponse inflammatoire en causant des dommages cellulaires **(Posadas *et al.*, 2004 ; Kumar et Kuttan, 2009)**.
D'autre part, les cyclooxygénases-2 (COX-2), enzymes inductibles par les cytokines (facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα) et interleukines IL-6 et IL-1β), sont présentes dans les cellules inflammatoires activées et sont connues pour jouer un rôle crucial dans l'inflammation en libérant le médiateur prostanoïde (prostaglandines et thromboxane) **(Nussler et Billiar, 1993 ; Nantel *et al.*, 1999)**. De même, l'inductible oxyde nitrique synthase (iNOS) génère de l'oxyde nitrique (NO) et est considéré comme ayant un rôle central dans les réponses inflammatoires **(Fialkow *et al.*, 2007)**. Il est reconnu que l'expression du iNOS et des COX-2 est maximale au cours de la deuxième phase (3 – 6 heures) de l'oedème plantaire **(Loram *et al.*, 2007 ; Eddouks *et al.*, 2012)**. Cette phase est sensible à la majorité des médicaments anti-inflammatoires cliniquement efficaces **(Vinegar *et al.*, 1969)**. Il a été démontré que l'inhibition de la production

du NO et des prostaglandines par suppression de l'expression du iNOS et des COX-2 était bénéfique dans le traitement des maladies inflammatoires **(Sawatzky *et al.*, 2005)**. A travers nos résultats, nous avons constaté que les huiles essentielles testées à différentes doses, et plus particulièrement celles de *citrus sinensis*, *T. vulgaris,et santolina chamaecyparissus* possédaient des effet anti-inflammatoires considérable, ce qui leur a permis, à partir de 4 heures, d'inhiber l'inflammation de façon hautement significative comparé au groupe témoin **.** Notre extrait aura empêché la libération des médiateurs pro-inflammatoires de la phase tardive (3 – 6 heures) en inhibant l'expression des principaux précurseurs (iNOS et COX-2) **(Vigo *et al.*, 2004)**. De plus, de part leurs propriétés antioxydantes, ces dernières auraient également pu agir en inhibant la production des espèces réactives oxygénées (ERO) responsables des lésions cellulaires **(Middleton *et al.*, 2000 ; Preethi *et al.*, 2012)**.

IV.4 Application à la formulation

- **Caractérisation physico-chimique**

Le tableau 26 résume les résultats du contrôle du pH et la viscosité :

Tableau 26 : Les résultats de contrôle du pH et la viscosité de formulation **« Orthymosan »**

Temp	Viscosité	pH
3ére Semaine		6 ,64
2éme Semaine		6 ,50
3éme Semaine		6 ,40
4éme Semaine		6 ,38
5éme Semaine		6 ,26
6éme Semaine		6 ,10

Nous remarquons que la teneur de pH du gel buvable Orthymosan obtenues après 45 jours de production est très acceptable.

- **Évaluation de la stabilité et vieillissement accéléré**

Après 45 jours, la stabilité de notre gel qui resté sous des conditions physiques rigoureuses est mesuré par l'observation à l'œil nue et n'y aucun changement de couleur.

IV.5 Evaluation du gel buvable par le suivi de paramètre immunologique et hématologique chez les lapins du laboratoire

IV.5.1 Test antigénique (Ag) pour la détection de covid-19 chez les lapins

Dans les trois tests sur les trois lapins on a obtenu :



Figure 87 : Résultat de Test antigénique (Ag) **(originale 2021)**

Les trois tests sont : NEGATIVE a des valeurs **0.16 ; 0.01 ; 0.04**

NEGATIF <1.0	POSITIF > 1.0

Positif > 1.0 : -présence de l'antigène du SARS-COV 2 sur prélèvement nasopharyngé.

Négatif <1.0 : -Absence actuellement d'antigène du SARS-COV 2

IV.5.2 Analyse médicale sur les lapins

- **Pour le Bilan FNS :**

Notre gel a induit une augmentation dans le nombre des globules blancs après une semaine de traitement notent que si valeur enregistrer ne dépassant pas la limite supérieure de la gamme hygiénique de lapins **[5-12]** ; dans une 1ere hypothèse que notre gel stimuler la réponse immunitaire et renforcer l'immunité par le récrément d'un nombre important de globule blancs

Pour le polynucléaire Neutrophiles : notre gel induit une augmentation de % de cette ligne leucocytaire considère comme une barrière importante dans la défense immunitaire contre la bactérie et les virus. **[35-55]**

Par contre les Eosinophiles : A été diminué de l'action de notre gel et sous qui est bénéfique et avantageux pour le bon fonctionnement de système immunitaire ; et pour les Lymphocyte et Basophiles et monocytes ont été gardé dans l'intervalle hygiénique **[0-5]**

- **Pour le bilan hépatique :**

L'analyse d'enzymes Transaminase (ASAT ; ALAT) : A montré que les trois lapins on des valeurs inférieures à la limite hygiénique ce qu'explique une faible activité enzymatique avant le traitement ; revalant une insuffisance hépatique chez nous lapins

Après le gavage dans notre gel **orthymosan** on constater que le paramètre hépatique regain l'intervalle hygiénique **ALAT L1 L2 [14-80] L3 [55-260] / ASAT**

[10-98] [14-113] ce qui explique l'action bénéfique de notre gel sur la fois voir le tableau 27

L'analyse de bilirubine : on constant que de paramètre est conserver dans la gamme hygiénique des lapins ce qui explique de notre gel n'influence sur ce paramètre <**20**

L'analyse de PAL (phosphate alcaline) : en remarque que notre gel a ramené la valeur (qu'ont été de sous de la limite hygiénique inferieur) dans l'intervalle hygiénique ; ce qu'explique un pouvoir correcteur induit par notre gèle contre le d'infection hépatique. **[10-96]**

L'analyse de GGT (gamma glutamyl-transféras) : on constater le même résultat bénéfique de notre gèle sur le paramètre GGT voir le tableau 27.

En conclusion : on peut dire que notre gel doté d'un pouvoir hépato correcteur et hépato protectrice primordial ; est cette concorde avec la publication spécialise **(Dalila Massoudi et All 2018).**

Tableau 27 : Présenté le bilan hépatique

Lapin	ASAT	ALAT	GGT	PAL	ASAT2	ALAT2	GGT2	PAL2
	Avant				Après			
Lapin 1	-2	-2	5	8	33	49	9	45
Lapin 2	7	15	9	104	32	60	9	68
Lapin 3	22	47	16	46	88	144	20	18

- **Globules Blanc [10-96]**

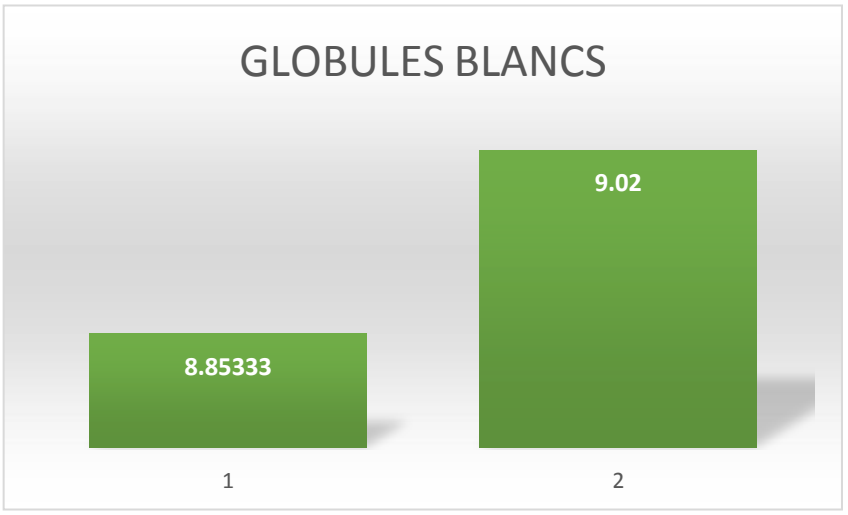


Figure 88 : Histogramme représenter les globules blancs des lapins avant (1) et après (2) le gavage.

- **Globules Rouge**

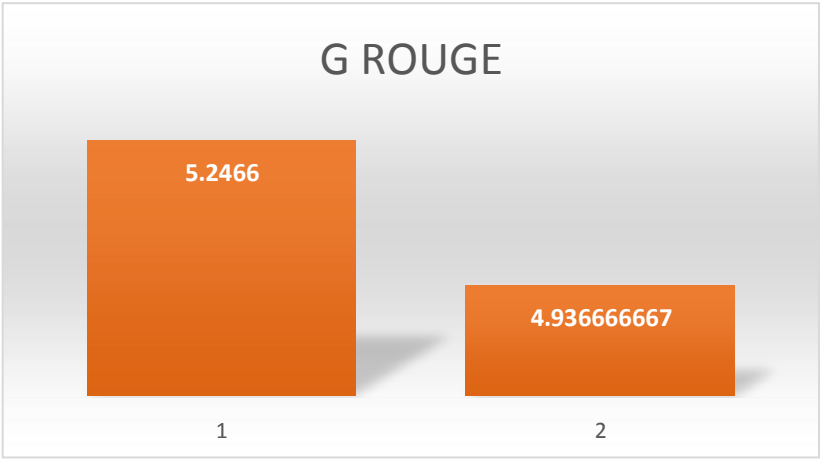


Figure 89 : Histogramme représenter les globules rouges des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[4-8]).**

- **PNN**

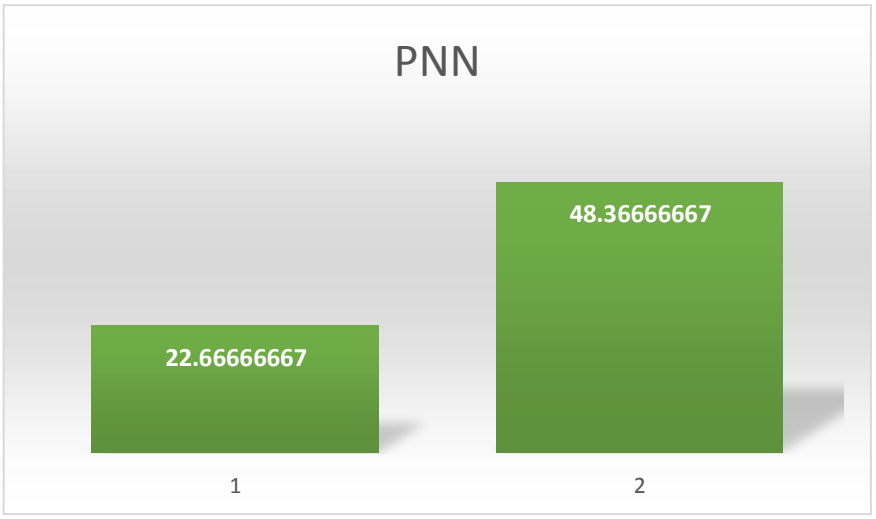


Figure 90 : Histogramme représenter les Neutrophiles des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[35-55]).**

- **EOSINOPHILE**

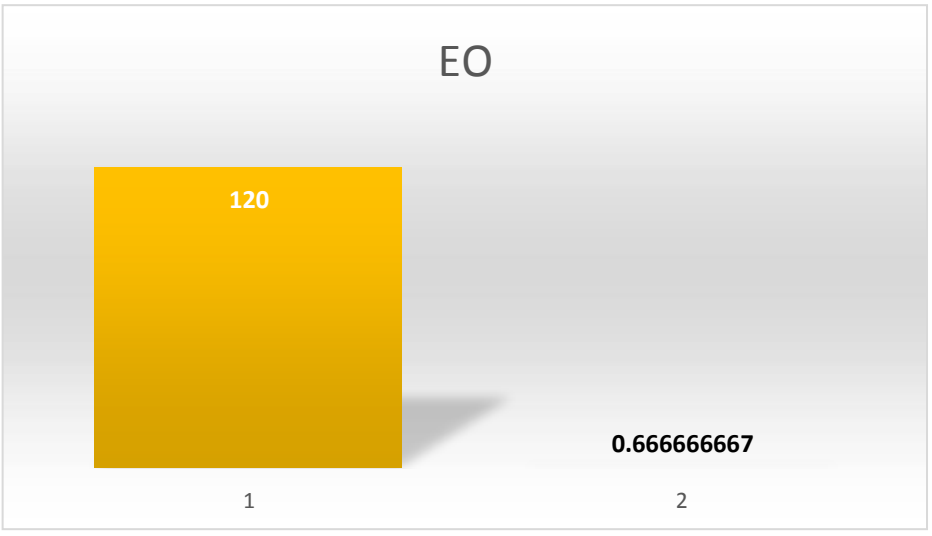


Figure 91 : Histogramme représenter les EOSINOPHILE des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[0-5]).**

- **PLAQUETTES** :



Figure 92 : Histogramme représenter les plaquettes des lapins avant (1) et après (2) le gavage (Norme normal **[290-650]).**

D'après ce résultat on peut recommander notre gel comme un traitement contre l'infection bactérien et viral ainsi que l'infection respiratoires causé par le covid 19 ; puisque les publication spécialisé prouve l'ingrédient forment notre gel ; prisent une barrière contre la pénétration le covid dans la cellule telle que le travail de **(Bellavite & Donzelli, 2020).**que à montrer que l'hespéridine ce lie légant du coronavirus et empêcher se dernier d'entre dans la cellule .**Voir la figure**

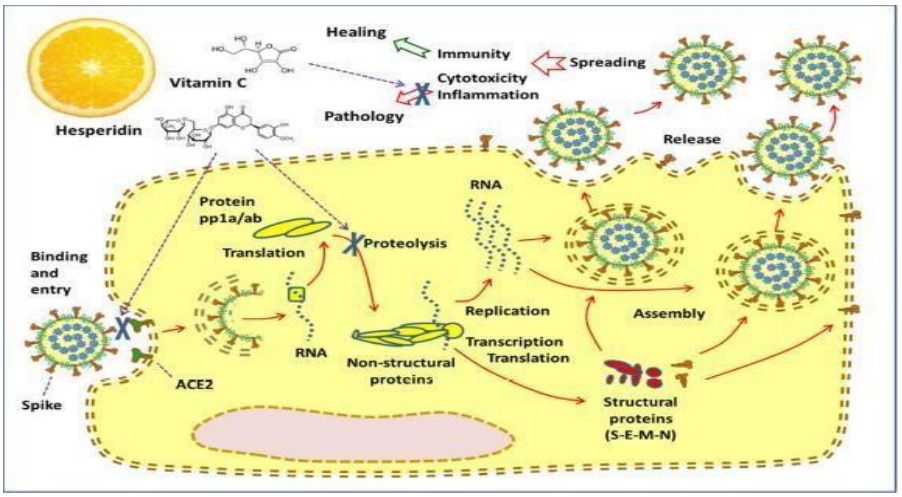


Figure 93 : Schéma représentant le pouvoir inhibiteur de l'hespéridines contre le coronavirus (SARS-CoV-2) covid-19 **(Bellavite & Donzelli, 2020).**

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressées à l'extraction et à la récupération des extraits de *Citrus sinensis, thymus vulgaris et santoilna chaemaparecessus* et de leurs associations par une macération, à déterminer leurs compositions chimiques, à l'étude de l'activité antibactérienne.

L'obtention des extraits par la macération en utilisant des solvants différents reste une méthode simple et efficace, et donne des rendements intéressants. Le calcul des rendements moyens des extraits proviennent des plantes nous a révélé des valeurs importantes pour *Citrus sinensis* par rapport *T.vulgaris.* Alors que le rendement des extraits d'une même plante varié selon la nature de solvant utilisé.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits ainsi que leurs mélanges a été déterminée sur 9 souches microbiennes selon la méthode de diffusion de disque et cylindre. Cette technique a montré que tous les extraits étudiés possèdent un effet inhibiteur contre certain souches testées. Ces souches ont présenté une sensibilité importante à l'action des extraits surtouts la souche de staphylococcus épidermidis entre Diamètre17-41mm.

D'après nos résultats, l'activité antimicrobienne a été modifié selon les solvants utilisés, l'éthanol s'est révélé être un bon solvant pour l'extraction des composés actifs antimicrobiens. Par conséquent, les extraits éthanoliques purs de *Curtis sinensis*, *thym vulgarise* et *santolina chaemaparecessus* ce de leur association ont été choisis car ces extraits possèdent la meilleure activité antimicrobienne.

Le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants.

Quant aux résultats enregistrés des tests de l'évaluation de l'effet anti inflammatoire des extraits éthanolique de Cirtus et thymus et santolina montre que les extraits ont un pouvoir énorme ce qui a été confirmé par la comparaison des résultats avec Déclofinac et ces extraits.

Perspectives

Grâce à cette thèse est possible de reconnaître que beaucoup de travail reste encore à faire et plusieurs parties ont besoin d'être étudié.

D’après nos résultats, l’association entre cutris, thym et santolina a montré une potentialisation de l’effet inhibiteur contre les souches testées. Donc il nécessite d’autres études pour voir l’effet de l’association d’autre plantes médicinales.

En se basant sur cette étude, et pour bien comprendre l'activité antimicrobienne de ces plantes, il est recommandé de déterminer le mode d’action pour chaque composant et les mécanismes de l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes et les champignons.

Et enfin, il faut déterminer des autres activités biologiques de *Curtis sinensis, thym vulgarise* et *santolina chaemaparecessus* et à l’exemple de l’activité anticancéreuse et antidiabétique.

Référence Bibliographique

Référence bibliographique

Abu-Darwish, M. S., Al-Ramamneh, E. A., Kyslychenko, V. S., & Karpiuk, U. V. (2012). The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak Region-South of Jordan. *Pak J Pharm Sci*, 25(1), 239-46.

Abuzer Ali Amena Ali Musarrat Husain Warsi Wasim Ahmad Abu tahir (2021), Chemical characterization, antidiabetic and anticancer activities of Santolina chamaecyparissus Saudi Journal of Biological Sciences

ADIKO Marcelline, BOUTTIER Sylvie, Okpekon Timothée Aboua, LAMBERT Sylvie, AKE-ASSI Laurent, KABLAN Brou Jérome et CHAMPY Pierre. Phytothérapie traditionnelle des conjonctivites en milieu urbain ivoirien : enquête sur les deux marchés aux plantes médicinales d'Abidjan. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 2014, vol 161, no 1, p33–45.

Ahsan H, Ali A and Ali R (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, **131,** 398-404.

Ahuja A, Bakshi S K, Sharma S K, Thappa R K, Agarwal S G, Kichlu S K, Paul R and Kaul M K (2005). Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour Fragrance Journal*, **20**, 403-406.

Akerreta S, Cavero R Y, López V and Calvo M I (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **3** (16), 1-18.

AL-SNAFI Ali Esmail. Antiparasitic effects of medicinal plants (part 1)- A review. IOSR Journal of Pharmacy, 2016, vol 6, no 10, p 51-66.

and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract. Food Chemistry. 106: 868-873.

applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109.

Barrero A F, Mar Herrador M, Quilez J F, Alvarez- Manzaneda R, Portal D, Gavin J A, Gravalos D G, Simmonds M S J and Blaney W M (1999). Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, **51**, 529-541.

BRUNETON, J.1993, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 915p

Cavero R.Y., Akerreta S., Calvo M.I. Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* **137**, 844-855 (2011)

CHIRANE Manel Soumia*1, BENCHABANE Otman2, BOUSBIA Nabil3 and ZENIA Safia1 (2019), ANTIOXYDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL AND ETHANOL EXTRACT OF SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS L.

Christensen L P (1992). Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry*, **31**, 7-49.

Da Silva J A T (2004). Mining the essential oils of the Anthemidea. *African Journal of Biotechnology*, **3** (12), 706-720.

Dalila Messaoudi Hamama Bouriche Ibrahim Demirtas Abderrahmane Senator (2018), Phytochemical Analysis and Hepatoprotective, Activity of Algerian Santolina chamaecyparissus L. Extracts 20 mars

Derbesy M, Touche J and Zola A (1989). The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essentiel Oil Research*, **1**, 269-275.

Eman Ramadan Elsharkawy (2014), Antitcancer effect and Seasonal variation in oil constituents of Santolina chamaecyparissus Ecology Department, Desert Research Center, 15753, Mathaf El-Mataria, Egypt Chemistry Department, Faculty of science, Northern Border University, ARAR, 054, North Region, Saudi Arabia 2014

Ferrari B, Tomi F and Casanova J (2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 445-449.

Ferrari B, Tomi F and Casanova J (2005). Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 445-449.

Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani, Z., & Malekpoor, F. (2015). An overview on genus Thymus. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)*, 6(2), 93-100.

Giner Pons R M and Rios Canavate J L (2000). *Santolina chamaecyparissus*: Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia*, **1**, 27-34.

Giner R M, Rios J L and Villar A (1988). CNS depressant effects, anti-inflammatory activity and anti- cholinergic actions of *Santolina chamaecyparissus* extracts. *Phytotherapy Research,* **12**, 37-41.

Giner R M, Rios J L and Villar A (1989). Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists. *Journal of Ethnopharmacology,* **27**, 1-6.

Grosso C, Cristina A, Burillo F J, Mainar A M , Urieta J S, Barroso J G, Coelho J A and Palavra A M F (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *Journal of Separation Science,* **32**, 3215-3222.

Hussein, H. J., Hadi, M. Y., & Hameed, I. H. (2018). Cytotoxic Activity of Thymus vulgaris: Antibacterial and Antifungal Activity. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(02), 166-169.

ISERIN Paul. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, Soins. 2eme edition, *Dorling Kindersiey Limited, Londres.* 2001.

JORITE sophia. La Phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel [en ligne]. 2015. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 2, U.F.R Des sciences pharmaceutiques.

Khafaji, S. S. O. (2018). Subject review: pharmacological application of thyme. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 6(9), 366-371.

Kohli Sara ; Meddahi Saliha. (2017) Formulation d'une crème à base de zingiber officinale. Mémoire de Master en génie des procédés pharmaceutique. Université de Chlef.

KUDJUED-BUNNETON J.-F et SAUVAIN M. Possibilités de valorisation économique de plantes médicinales et agronomiques en Guyane. *En : ORSTOM Centre de Cayenne BP.165-97 323 cayenne cedex*, 1989, p164.

Molyneux P, 2004, The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology,* ***26***(2), 211-219p.

Pala-Paul J, Perez-Alonso M J, Velasco-Negueruela A, Ramos-Vazquez P and Gomez-Contreras F and Sanz J (1999). Essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp.

rosmarinifolia: first isolation of capillene, a diacetylene derivative. *Flavour and Fragrance Journal*, **14**, 131-134.

Pokorny J. Yanishlieva N et Gordon M. H., 2001. Antioxidants in food: practical

Rasooli, I., & Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of Aspergillusparasiticus growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66(24), 2851-2856.

Roginsky V. et Lissi E., 2005. Review of methods to determine chain-breakingantioxidant activity in food. Food Chemistry, 92, 235-254.

RWANGABO Pierre claver. La médecine traditionnelle au Rwanda. KARTHALA Edition, 1993.

Sala A, Recio M C, Giner R M, Mdfiez S and Rios J (2000). Antiphosphoupase A2 and anti-Inflammatory activity of *Santolina Chamaecyparissus*. *Life and Sciences*, **66** (2), 35-40.

Samarth R.M; Panwar M; Soni A; Kumar M; et Kumar A. (2008) Evaluation of antioxidant

Sanz J F, Garcia-Sarrion A and Marco J A (1991), Germacrane derivatives from *Santolina chamaecyparissus. Phytochemistry***, 30**, 3339-3342.

SEBIH Fatiha. Pharmacognosie. 2019. Université des sciences et de la technologie d'Oran :

Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M. L., Lognay, G., & Heuskin, S. (2017). Chemical composition, acute toxicity, antimicrobial and anti-inflammatory activities of Thymus fontanesii essential oil from Algeria.*PhytoChem and BioSub Journal*, 11(1), 11.

Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Ciecwierz, J., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Medicinal Chemistry*, 7(6), 674-689.

Sobeh, M., Rezq, S., Cheurfa, M., Abdelfattah, M. A., Rashied, R. M., El-Shazly, A. M., ...& Mahmoud, M. F. (2020). Thymus algeriensis and Thymus fontanesii: Chemical Composition, In Vivo Antiinflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. *Biomolecules*, 10(4), 599.

Suresh B, Srirama S, Dhanaraja S A, Elangoa K and Chinnaswamy K (1997). Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology,* **55**(2), 151-159.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145.

Toudhert Faiza ; Abbani Soumia. (2017) Formulation d'un sirop contre la toux à base de Zingiber officinale. Mémoire de Master en génie des procédés pharmaceutique. Université De Chlef.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *Genève: Organisation mondiale de la Santé,* 2000.

Yousif, Z. K., Hussein, S. S. (2014). Antibacterial effect of crude herbal, aqueous extracts and oil of Thyme on Staphylococcus aureus in laboratory. *TiktitJoumal of Pure Science*, 19(1), 1813-1662. **(Jardiner avec Binette et Jardin 2020),** jardinage.lemonde.fr/dossier-2885-lapin-geant-flandres.html.

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F, 2006, Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa. Turk. J. Biol*, ***30***, 239-242p.

Aliouane Fatiha (2015), étude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange.

Amiot J. (2005) Thymus vulgaries, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l´écologie

BALLADIN D.A; HEADLEY, O. (1999). Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. *Renewable Energy***. 17**: 523-531.

BARRETT Stephen. Homeopathy: the ultimate fake. *Quackwatch*, 2016, vol 30, no 12, p 09.

Bruneton J, 1999, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p.

carvacrol Assimilating Microorganismes. Biotechnol. **39(**4), 314-345.

CHABRIER Jean-yves. Plantes médicinales et formes plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie [en ligne].2010. Thèse de doctorat. Université Henri Poincare – Nancy 1. Évolutive des composés secondaires. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d´Agronomie de*

GOETZ, P., GHEDIRA, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer Science & Business Media,* 394p

Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. *plqnt. Food chemistry.* **63** (3) : 373-383.

Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J., Paolini, J., & Chetouani, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of Thymus

broussonetii Boiss.and Thymus algeriensis Boiss.from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), 281-286.

Hamidi Fatima et Limam Fadhila (2018), étude phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron. applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109.

BRUNETON, J.1993, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 915p

Hashim S., Gamil M, 1988, Plants and herbs between the iraqi folk medicine and scientific research. *Baghdad, Dar revolution of Press and Publication*

Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R., 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. Glob. J. Pharmacol. 9 (3), 260–266.

http://www.quackwatch.com/01 Quackery Related Topics/homeo. Html

Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during vegetative cycle. J. *Pharmaceutical and Biomedicul Analysis* **29**: 691-700.

Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. *2ème Ed. Larousse. Londres* Pp : 143 et 225-226.

Johnson T, 1998, CRC ethnobotany desk reference. *CRC Press*, 1224p

Kaviya S., Santhanalakshmi J., Viswanathan B., Muthumary J., Srinivasan K (2011) ; Biosynthèse de nanoparticules d'argent en utilisant l'extrait de peau de Citrus sinensis et son activité antibactérienne. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.; 79 : 594-598. doi: 10.1016 / j.saa.2011.03.040. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] (51)

Kuete, V. (2013). Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry. Newnes.

Kulšic T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006) Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol*. **44** (4) : 485-492.

Mebarki Nedjoub. (2010), extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne.,universitè d'Ahmed Bougara Boumerdes ..

Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., & Messaoudi, Z. A. (2019). Antibacterial effects of Thymus algeriensis extracts on some pathogenic bacteria. *ActaScientiarum.Biological Sciences*, 41, e48548-e48548.

Molyneux P, 2004, The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology,* ***26***(2), 211-219p.

montpellier.

Morales, R. (2002) The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus

Namsa N.D., Tag H., Mandal M., Kalita P., Das A.K, 2009, An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit Community of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology, **125***, 234-245p

Nkouaya Mbanjo, E., Tchoumbougnang, M., Jazet Dongmo, P., Sameza, M., Amvam Zollo, P., Menut, C., 2007. Mosquito larvicidal activity of essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* grown in Cameroon.

OMS (2020), © Organisation mondiale de la Santé 2020,

Özcan M., Chalchat J.-C, 2004, Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulg. J. Plant. Physiol, **30***(4), 68-73p

Palmieri S., Pellegrini M., Ricci A., Compagnone D., Lo Sterzo C. (2020) Chemical Composition and Antioxidant Activity of Thyme, Hemp and Coriander Extracts: A Comparison Study of Maceration, Soxhlet, UAE and RSLDE Techniques. *Foods.* 9:1221. doi: 10.3390/foods9091221.

Pariente L. (2001) Dictionaire des sciences pharmacetique et biologique. *2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.

Pokorny J. Yanishlieva N et Gordon M. H., 2001. Antioxidants in food: practical

Polese J.-M, 2006, La culture des plantes aromatiques. *Edition Artemis*, 93p

Razzaghi-Abyaneh M., Rai M, 2013, Antifungal metabolites from plants. *Springer Science & Business Media*, 469p

Roginsky V. et Lissi E., 2005. Review of methods to determine chain-breakingantioxidant activity in food. Food Chemistry, 92, 235-254.

Santa Cirmi1, †, Nadia Ferlazzo1, †, Giovanni E. Lombardo2, Alessandro Maugeri1, Gioacchino Calapai3, Sebastiano Gangemi 4, 5 and Michele Navarra1 (2016), Chemopreventive Agents and Inhibitors of CancerHallmarks: MayCitrusOffer New Perspectives?, Published: 4 November 2016

Schmitz,P., 2015. *Thymus vulgaris*. Available from: http://ecoport.org/ep?Plant=2441&entityType=PLCR**&entityDisplayCategory=full Planta Med. 73 (9), P_329.

Schwammle B., Winkelhausen E., Kusmanova S., Steiner W., 2001. Isolation of **SOFOWORA Abayomi.** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala Editions, 2010.

Stahl-Biskup E., Sáez F, 2002, Thyme: The genus *Thymus*. *CRC Press*, 346p

Stahul Biskup E., Saez F. (2002) Thyme the genus thymus Taylor and Francis.331pp in Ghasemi Pirbalouti A., Rahimmalek M., Malekpoor F., Karim A. (2011). Variation in antimicrobial activity thymol and carvacrol content of wild population of thymus *daenensis subs pdaenensis* Celak. Plants Omics Journal., 4:209-214

Thymus. *Ed. Taylor & Francis, London*. pp. 1-43.

Tigrine (2016), Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe citrus limon et citrus sinensis.

Tisserand M, 2014, Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug. *Singing Dragon*, 192p

Tiwari M., Tandon V, 2004, Medicinal plants. *Vol 2, Gyan Publishing House*, 653p

Toudhert Faiza ; Abbani Soumia. (2017) Formulation d'un sirop contre la toux à base de Zingiber officinale. Mémoire de Master en génie des procédés pharmaceutique. Université De Chlef.

Université TOULOUSE III.

VIRIOT ANNE-CLAIRE. Un point sur la gemmothérapie en 2012. 2015. Thèse de doctorat. WHO/2019-nCoV/Antigen_Detection/2020.1

Zarzuelo A., Crespo E, 2002, The medicinal and non-medicinal uses of thyme. *In:* Thyme: The genus *Thymus* (coordonné par E Stahl-Biskup., F Sáez), pp 263-292. *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles, New York, Taylor and Francis*

Kohli Sara ; Meddahi Saliha. (2017) Formulation d'une crème à base de zingiber officinale. Mémoire de Master en génie des procédés pharmaceutique. Université de Chlef.

Samarth R.M; Panwar M; Soni A; Kumar M; et Kumar A. (2008) Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract. *Food Chemistry*. 106: 868-873.

Rtibi, Kais. (2019*)* The potential of *Thymus vulgaris* aqueous extract to protect against delayed gastric emptying and colonic constipation in rats. RSC Advances, 20593:9

Chouhan S., Sharma K., Guleria S (2017). Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. Medicines (Basel).;4:58. doi: 10.3390/medicines4030058.

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *3ème Ed Tec&Doc. Paris.*

Djeddi S., Djebil K., Hadjbourega G., Achour Z., Argyropoulou C., Skaltsa H (2012). Propriétés antimicrobiennes in vitro et composition chimique de l' huile essentielle de *Santolina chamaecyparissus* d'Algérie. *Nat. Prod. Commun.* 7 (7) : 937-940.

N**ouasri A., Dob T., Krimats S., Dahmane D., Toumi M., Lynda L., Chelgoume C., Racheme F *(*2015).** Composition chimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Santolina chamaecyparissus* L. d'Algérie. *J. Coastal Life Med.* ; 3 (3) : 220-227.

Suresh B., Kalyanaraman VR, Dhanasekaran S., Annadurai K., Dhanaraj SA, Balasubramanian S (1995). Évaluation de l'huile de santoline à la recherche de nouveaux médicaments contre la candidose. *Indien J. Pharmacol.* ; 27 (3) : 171-177.

Lopez V., Akerreta S., Casanova E., Garca-Mina JM, Cavero RY, Calvo MI (2008) Dépistage des plantes médicinales espagnoles pour leurs activités antioxydantes et antifongiques. *Pharmacie. Biol.* ; 46 (9) : 602-609.

Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A. C., & Matos, M. (2017). Thymus plants: a reviewmicropropagation, molecular and antifungal activity. *Active ingredients from aromatic and medicinal plants*, 107-126.

ŠegvićKlarić, M., Kosalec, I., Mastelić, J., Piecková, E., & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in applied microbiology*, 44(1), 36-42.

Bukvicki, D., Giweli, A., Stojkovic, D., Vujisic, L., Tesevic, V., Nikolic, M., & Marin, P. D. (2018). Cheese supplemented with Thymus algeriensis oil, a potential natural food preservative. *Journal of dairy science*, 101(5), 3859-3865.

Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan Thymus satureioïdes extracts. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(6), 2132-2139.

Van-Hung P., Chi PT, Phi NT (2013), Comparaison des activités antifongiques des huiles essentielles d'agrumes vietnamiennes. Nat. Prod. Res.; 27: 506–508. doi: 10.1080 / 14786419.2012.706293. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

ISERIN Paul. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, Soins. 2eme edition, *Dorling Kindersiey Limited, Londres.* 2001.

JORITE sophia. La Phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel [en ligne]. 2015. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 2, U.F.R Des sciences pharmaceutiques.

KUDJUED-BUNNETON J.-F et SAUVAIN M. Possibilités de valorisation économique de plantes médicinales et agronomiques en Guyane. *En : ORSTOM Centre de Cayenne BP.165-97 323 cayenne cedex*, 1989, p164.

RWANGABO Pierre claver. La médecine traditionnelle au Rwanda. KARTHALA Edition, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *Genève : Organisation mondiale de la Santé*, 2000.

SEBIH Fatiha. Pharmacognosie. 2019. Université des sciences et de la technologie d'Oran : « MOHAMED BOUDIAF ».

SOFOWORA Abayomi. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala Editions, 2010.

VIRIOT ANNE-CLAIRE. Un point sur la gemmothérapie en 2012. 2015. Thèse de doctorat. Université TOULOUSE III.

CHABRIER Jean-yves. Plantes médicinales et formes plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie [en ligne].2010. Thèse de doctorat. Université Henri Poincare – Nancy 1.

BARRETT Stephen. Homeopathy: the ultimate fake. *Quackwatch*, 2016, vol 30, no 12, p 09. *http://www.quackwatch.com/01 Quackery Related Topics/homeo. Html*

ADIKO Marcelline, BOUTTIER Sylvie, Okpekon Timothée Aboua, LAMBERT Sylvie, AKE-ASSI Laurent, KABLAN Brou Jérome et CHAMPY Pierre. Phytothérapie traditionnelle des conjonctivites en milieu urbain ivoirien : enquête sur les deux marchés aux plantes médicinales d'Abidjan. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 2014, vol 161, no 1, p33–45.

AL-SNAFI Ali Esmail. Antiparasitic effects of medicinal plants (part 1)- A review. IOSR Journal of Pharmacy, 2016, vol 6, no 10, p 51-66.

Amiot J. (2005) Thymus vulgaries, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l´écologie évolutive des composés secondaire. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d´Agronomie de*
montpellier.

Morales, R. (2002) The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. *Ed. Taylor & Francis, London*. pp. 1-43.

Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. *2ème Ed. Larousse. Londres* Pp : 143 et 225-226.

Pariente L. (2001) Dictionaire des sciences pharmacetique et biologique. *2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.

GOETZ, P., GHEDIRA, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer Science & Business Media*, 394p

Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R., 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. Glob. J. Pharmacol. 9 (3), 260–266.

Bruneton J, 1999, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p.

Stahul Biskup E., Saez F. (2002) Thyme the genus thymus Taylor and Francis.331pp in Ghasemi Pirbalouti A., Rahimmalek M ., Malekpoor F., Karim A. (2011). Variation in antimicrobial activity thymol and carvacrol content of wild population of thymus *daenensis subs pdaenensis* Celak. Plants Omics Journal., 4:209-214

Nkouaya Mbanjo, E., Tchoumbougnang, M., Jazet Dongmo, P., Sameza, M., Amvam Zollo, P., Menut, C., 2007. Mosquito larvicidal activity of essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* grown in Cameroon.

Schmitz,P., 2015. *Thymus vulgaris*. Available from: http://ecoport.org/ep?Plant=2441&entityType=PLCR**&entityDisplayCategory=full Planta Med. 73 (9), P_329.

Mebarki Nedjoub. (2010), extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne.,universitè d'Ahmed Bougara Boumerdes ..

Kuete, V. (2013). Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry. Newnes.

BALLADIN D.A; HEADLEY, O. (1999). Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. *Renewable Energy***. 17**: 523-531.

Kulšic T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006) Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol*. **44** (4): 485-492.

Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. *plqnt. Food chemistry.* **63** (3): 373-383.

Schwammle B., Winkelhausen E., Kusmanova S., Steiner W., 2001. Isolation of carvacrol Assimilating Microorganismes. Biotechnol. **39(**4), 314-345.

Polese J.-M, 2006, La culture des plantes aromatiques. *Edition Artemis*, 93p

Hashim S., Gamil M, 1988, Plants and herbs between the iraqi folk medicine and scientific research. *Baghdad, Dar revolution of Press and Publication*

Namsa N.D., Tag H., Mandal M., Kalita P., Das A.K, 2009, An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit Community of Arunachal Pradesh, India. *Journal of Ethnopharmacology*, ***125***, 234-245p

Özcan M., Chalchat J.-C, 2004, Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulg. J. Plant. Physiol*, ***30***(4), 68-73p

Tiwari M., Tandon V, 2004, Medicinal plants. *Vol **2**, Gyan Publishing House*, 653p

Zarzuelo A., Crespo E, 2002, The medicinal and non-medicinal uses of thyme. *In:* Thyme: The genus *Thymus* (coordonné par E Stahl-Biskup., F Sáez), pp 263-292. *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles, New York, Taylor and Francis*

Razzaghi-Abyaneh M., Rai M, 2013, Antifungal metabolites from plants. *Springer Science & Business Media*, 469p

Johnson T, 1998, CRC ethnobotany desk reference. *CRC Press*, 1224p

Stahl-Biskup E., Sáez F, 2002, Thyme: The genus *Thymus*. *CRC Press*, 346p

Tisserand M, 2014, Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug. *Singing Dragon*, 192p

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F, 2006, Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa. Turk. J. Biol*, ***30***, 239-242p.

Al-Tawaha, A., Al-Karaki, G., & Massadeh, A. (2014). Variation of chemical composition, antioxidant and total phenols of essential from thyme (Origanumsyriacum L.) grown under open field conditions and protected soilless condition. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 8(12), 20-26.

B. Reguig, Y.L., Interactions entre l'huile essentielle de Thymus capitatus, Mentha

Bouzouina, M., OudaAmari, N., Berkani, A., Lotmani, B., Hanafi, M., Lazizi, A. (2016). Total phenolics contents, flavonoïds contents, and fatty acids compositions in Thymelaeahirsuta L. Aerial Parts, Grown in Western Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 10(1), 16-22.

G.m.bilal, Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques, Thèse de doctorat. Université de Ouargla. 2015 ;

Miara, M. D., Bendif, H., Hammou, M. A., & Teixidor-Toneu, I. (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by nomadic peoples in the Algerian steppe. *Journal of ethnopharmacology*, 219, 248-256.

Omar, R. M., Galala, A. A., & Badria, F. (2019). Medicinal Plants: Dual source of enzymes and enzyme modulators. *Polymorphism*, 3.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosyreviews*, 6(11), 1.

piperita et Carthamus caeruleus, et de leur composants majoritaires: Effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante. Mémoire de Master, Université de Tlemcen, 2017 ;

Quezel, P., Santa, S. (1962-63). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S. p 786.

Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P., & Saulnier, D. (2017). Use of medicinal plants in aquaculture. *Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish*, 9, 223-261.

Van Wyk, B. E., & Wink, M. (2018). *Medicinal plants of the world*. CABI.

Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during vegetative cycle. J. *Pharmaceutical and Biomedicul Analysis* **29**: 691-700.

Palmieri S., Pellegrini M., Ricci A., Compagnone D., Lo Sterzo C. (2020) Chemical Composition and Antioxidant Activity of Thyme, Hemp and Coriander Extracts: A Comparison Study of Maceration, Soxhlet, UAE and RSLDE Techniques. *Foods.* 9:1221. doi: 10.3390/foods9091221.

Aliouane Fatiha (2015), étude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange.

Tigrine (2016), Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe citrus limon et citrus sinensis.

Hamidi Fatima et Limam Fadhila (2018), étude phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron.

Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J., Paolini, J., & Chetouani, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of Thymus broussonetii

Boiss.and Thymus algeriensis Boiss.from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), 281-286.

Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., & Messaoudi, Z. A. (2019). Antibacterial effects of Thymus algeriensis extracts on some pathogenic bacteria. *ActaScientiarum.Biological Sciences*, 41, e48548-e48548.

Green R.J. (2004). Antioxydant activity of peanut plant tissues. Master's Thesis. Department Of Food Science. Faculty of North Carolina State University (USA).

Knekt, P., Ritz, J., Pereira, M. A., O'Reilly, E. J., Augustsson, K., Fraser, G. E., Goldbourt, U., Heitmann, B. L., Hallmans, G., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W. C., Rimm, E. B., & Ascherio, A. (2004). Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: A pooled analysis of 9 cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(6), 1508–1520. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1508

Ponce, A. G., Fritz, R., Valle, C., & Roura, S. I. (2003). *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. *36*, 679–684. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4

Derelanko, M. J., & Rusch, G. M. (2008). *Oxime Silanes : Structure /*. 97–114. https://doi.org/10.1080/01480540701688766

Knekt, P., Ritz, J., Pereira, M. A., O'Reilly, E. J., Augustsson, K., Fraser, G. E., Goldbourt, U., Heitmann, B. L., Hallmans, G., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W. C., Rimm, E. B., & Ascherio, A. (2004). Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: A pooled analysis of 9 cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(6), 1508–1520. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1508

Ponce, A. G., Fritz, R., Valle, C., & Roura, S. I. (2003). *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. *36*, 679–684. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4

Derelanko, M. J., & Rusch, G. M. (2008). *Oxime Silanes : Structure /*. 97–114. https://doi.org/10.1080/01480540701688766

Knekt, P., Ritz, J., Pereira, M. A., O'Reilly, E. J., Augustsson, K., Fraser, G. E., Goldbourt, U., Heitmann, B. L., Hallmans, G., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W. C., Rimm, E. B., & Ascherio, A. (2004). Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: A pooled analysis of 9 cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(6), 1508–1520. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1508

Ponce, A. G., Fritz, R., Valle, C., & Roura, S. I. (2003). *Antimicrobial activity of essential*

oils on the native microflora of organic Swiss chard. *36*, 679–684. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4

Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Hassayoun, F., Cheraif, I., Khan, S., Jannet, H. Ben, Hammami, M., Aouni, M., & Harzallah-Skhiri, F. (2017). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of Santolina chamaecyparissus L., growing wild in Tunisia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(4), 875–882. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.03.005

Catella, C., Camero, M., Stella, M., Fracchiolla, G., Sblano, S., Tempesta, M., Martella, V., Buonavoglia, C., & Lanave, G. (2021). Research in Veterinary Science Virucidal and antiviral effects of Thymus vulgaris essential oil on feline coronavirus. *Research in Veterinary Science*, *137*(December 2020), 44–47. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.024

Cirmi, S., Ferlazzo, N., Lombardo, G. E., Maugeri, A., Calapai, G., Gangemi, S., & Navarra, M. (n.d.). *Chemopreventive Agents and Inhibitors of Cancer Hallmarks : May Citrus Offer New Perspectives ?* 1–38. https://doi.org/10.3390/nu8110698

Kubatka, P., Uramova, S., Kello, M., Kajo, K., Samec, M., Jasek, K., Vybohova, D., Liskova, A., Mojzis, J., Adamkov, M., Zubor, P., Smejkal, K., Svajdlenka, E., Solar, P., & Samuel, S. M. (2019). *Anticancer Activities of Thymus vulgaris L . in Experimental Breast Carcinoma In Vivo and In Vitro*.

Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Bouderhem, H., Tani, S., & Madani, K. (2017). *Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles*. 1–8. http://www.univ-chlef.dz/revuenatecFormeréviséeacceptéele:13/08/2017

ANNEXES

ANNEXE A :

1. Les milieux de culture utilisée :

Eau physiologique :

Chlorure de sodium 8.5g

Peptone 0.5g

Eau distillé ..... 1000 ml

PH 7

Gélose Muller Hinton :

Extraits de bœuf 2g

Hydrolysat de caséine ..... 17.5 g

Amidon mais 1.5g

Agar 17g

Eau distillé 1L

PH 7.5

Gélose Chapman :

Peptone ..... 10 g

Extrait de bœuf ..... 1 g

Chlorure de sodium ..... 75 g

Mannitol ..... 10 g

Rouge de phénol ..... 0.025 g

Agar ..... 15 g

Eau distillé 1L

PH 7.4

Gélose de SABOURAUD :

Peptone ..... 10 g

Dextrose ..... 20 g

Chloramphenicol ..... 0.5 g

Agar ..... 15 g

Eau distillé..... 1 L

PH..... 5.7

2. Définitions

Tween 80 Ou Polysorbate 80, Monolèate de sorbitane polyxyèthylène, le polysorbates 80 est un produit synthétique fabriqué à partir de sorbitol (E420), en effet est un tensioactif non ionique d'origine végétale utilisé comme un excellent solubilisant pour les huiles essentielles et a de bonnes fonctions en tant qu'agent mouillant, modificateur de viscosité, stabilisant et agent dispersant. Il est utilisé pour préparer une grande variété de produits dans les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, textile et métallurgique

3. Les antibiotiques

L'amoxicilline : C'est un antibiotique de la famille des bêta-lactamine, indiqué dans le traitement à des infections bactérienne à germe sensible, leur mécanisme d'action bactéricide en inhibant la transpeptidase, enzyme essentielle, présente sur la membrane cytoplasmique, qui commande la synthèse du peptidoglycane ou muréine, constituant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Diclofénac : Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dérivé de l'acide phénylacétique du groupe des acides arylcarboxyliques. Il possède les propriétés suivantes : activité antalgique, antipyrétique, anti-inflammatoire et inhibition de courte durée des fonctions plaquettaires

ANNEXE B :

Matériels et produits chimiques

1- Matériel du laboratoire

- Spectrophotomètre UV/visible type lambda 25 Perkin Elmer.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des milieux de culture.
- Autoclave pour la stérilisation des solutions et les milieux de cultures.
- Rotavapeur RE300 Cole-Parmer pour la séparation du solvant de l'extrait.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des milieux de culture.
- Filtres stériles (whatmanfilterpapers) à porosité de diamètre de 150mm utilisé pour la filtration de homogénat/filtrat et la solution.
- Disque imbibé Schleicher &SchuellØ 9 mm pour l'antibiogramme.
- Toutes les pesées sont effectuées à l'aide d'un Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg.
- Bain marie pour chauffer un récipient dans un bain d'eau en fonction de la température souhaitée
- Pour l'utilisation microbiologique on a utilisé Vortex de type VELP.
- Etuve utilisé pour l'incubation des microorganismes.
- Fisher-Lilly (Antibiotic Zone Reader) utilisé pour mesuré les zones d'inhibitions
- Verreries : ballons, fioles, entonnoirs, béchers, tube à essai, Pipettes, erlenmeyer, ampoule à décanter,
- Homogénéisateur de type (IKA T 25 ULTRA-TURRAX) pour homogénéiser les compositions dans la formulation du gel buvable.
- Viscosimètre de type BROOK FIELD pour mesurer la viscosité du gel.

2- Les produits chimiques et les solvants

•Ethanol 96%	•DPPH
•Acétone	•Twin 80
•Eau distillée	• Gomme xanthane
•Mueller Hinton	•Soja Agar
•Eau physiologique 0.9%	•NAOH

•Sulfate de magnésium (MgSO4) •Saccharose •Arome d'orange

• Benzoate Sodium • Para Hydroxybenzoate de Méthyl

• Acide ascorbique (vit C) • Huile végétale de menthe poivrée

• Glycérol • Gomme xanthane

ANNEXE C : séparation liquide-liquide

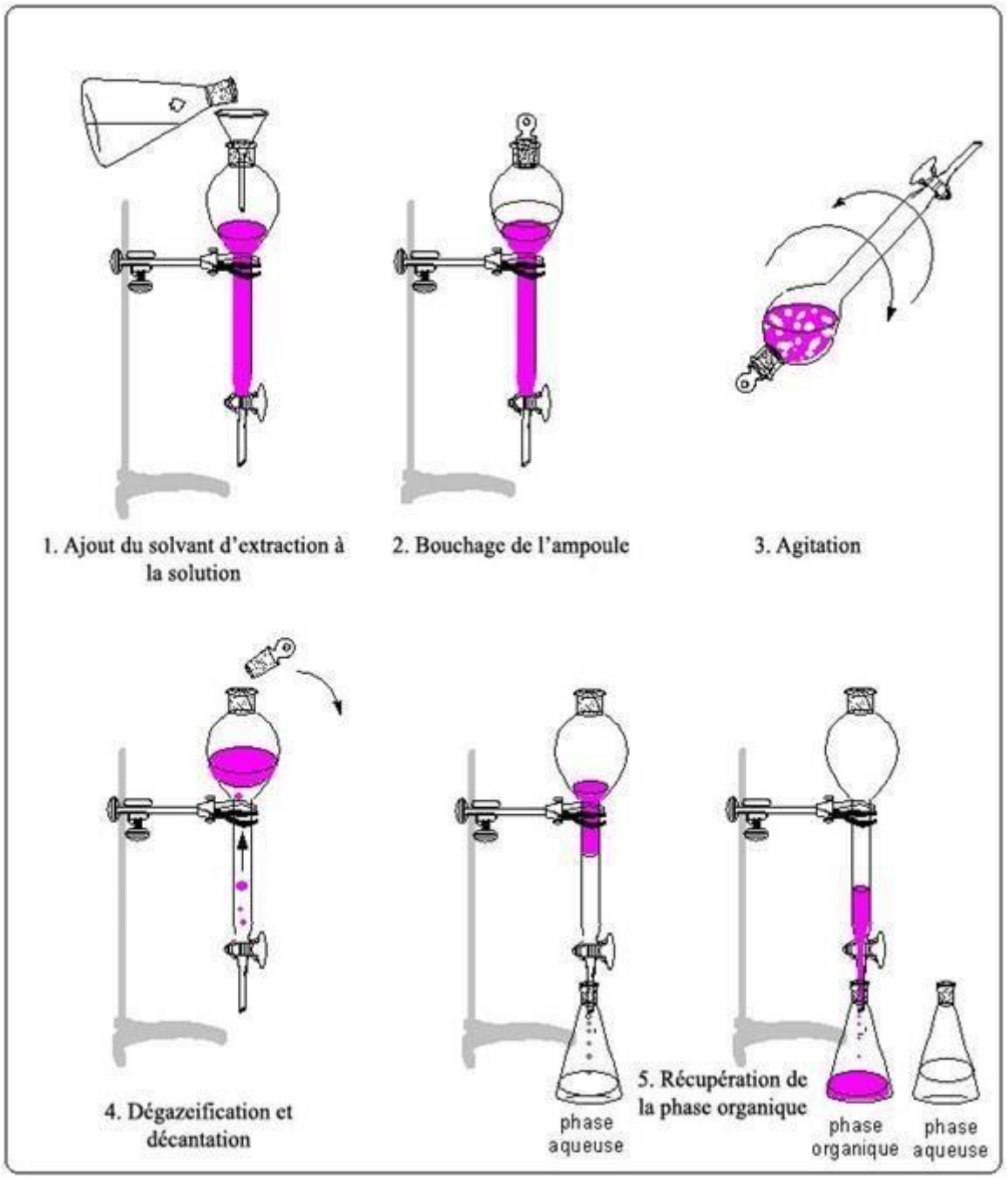


Figure : La décantation (séparation liquide-liquide)

ANNEXE D

Les spectres suivants non identifient

Santolina :

Temps de rétention t =23.97mn

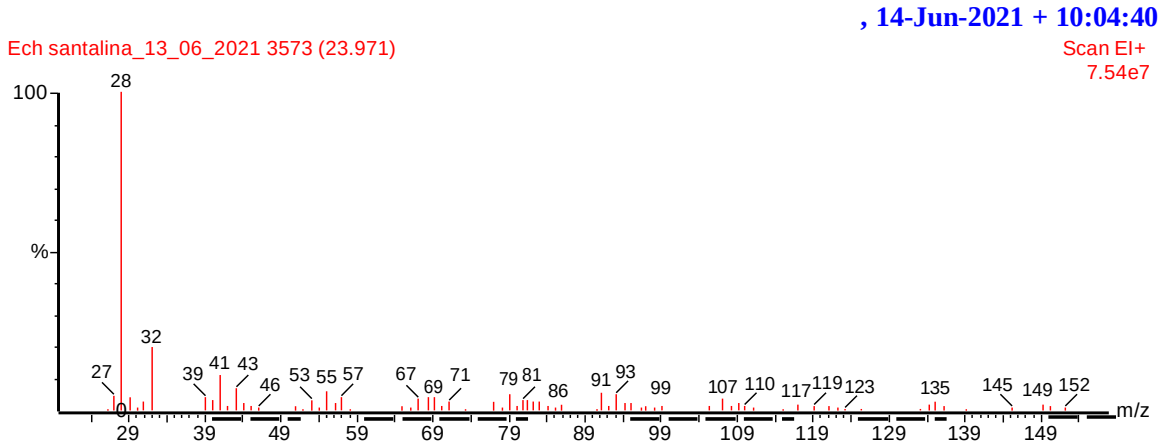


Fig.1 Spectre masse dont le temps de rétention 23.97mn.

Temps de rétention t =23.97mn

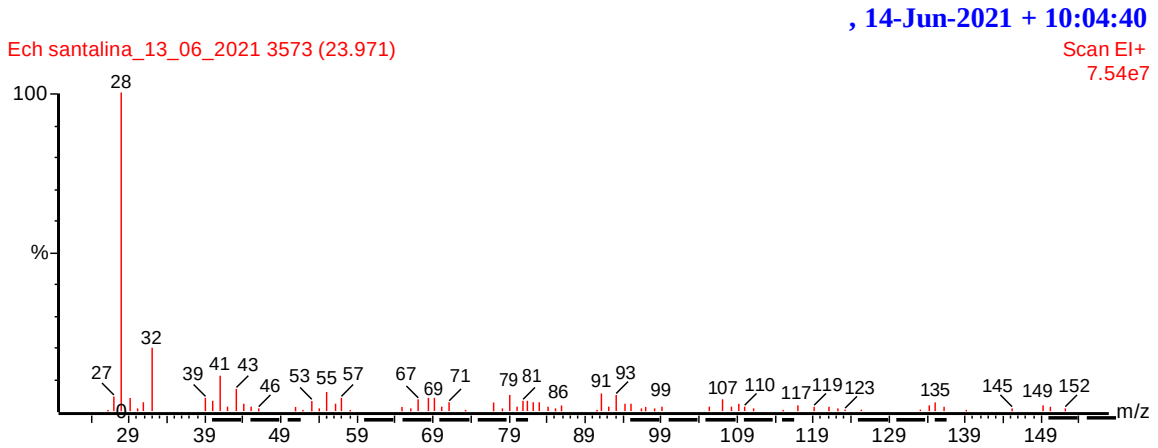


Fig.2 Spectre masse dont le temps de rétention 23.97mn.

a) Temps de rétention t =24.68mn

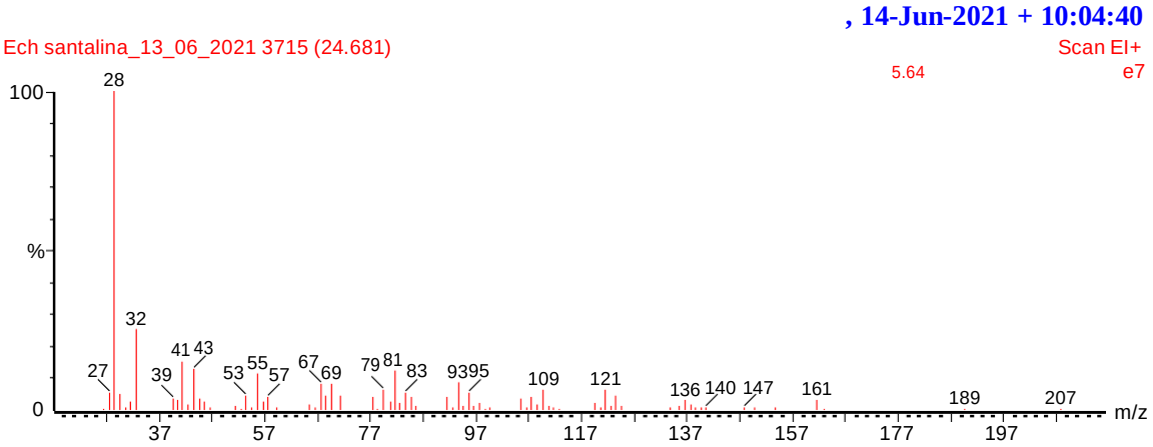


Fig.3 Spectre masse dont le temps de rétention 24.68mn.

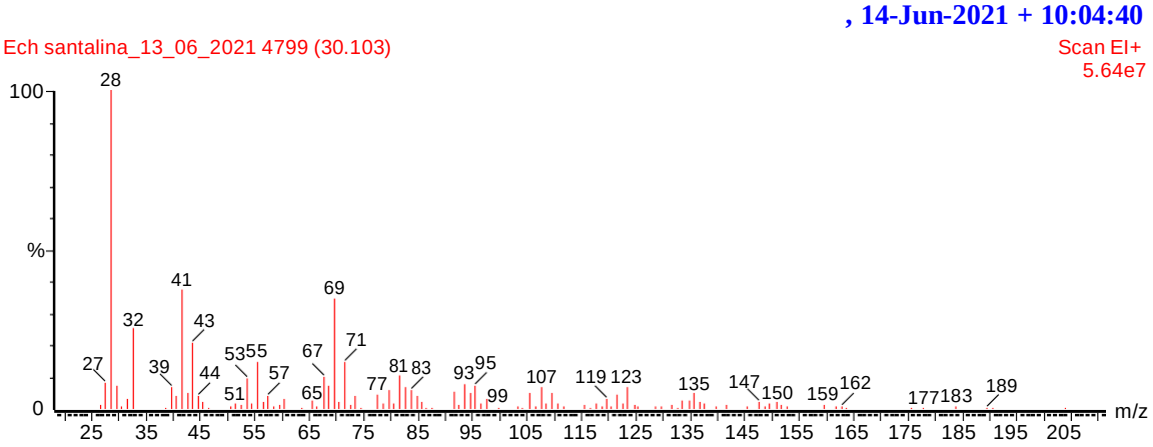


Fig.4 Spectre masse dont le temps de rétention 30.10mn.

Temps de rétention t =39.81mn

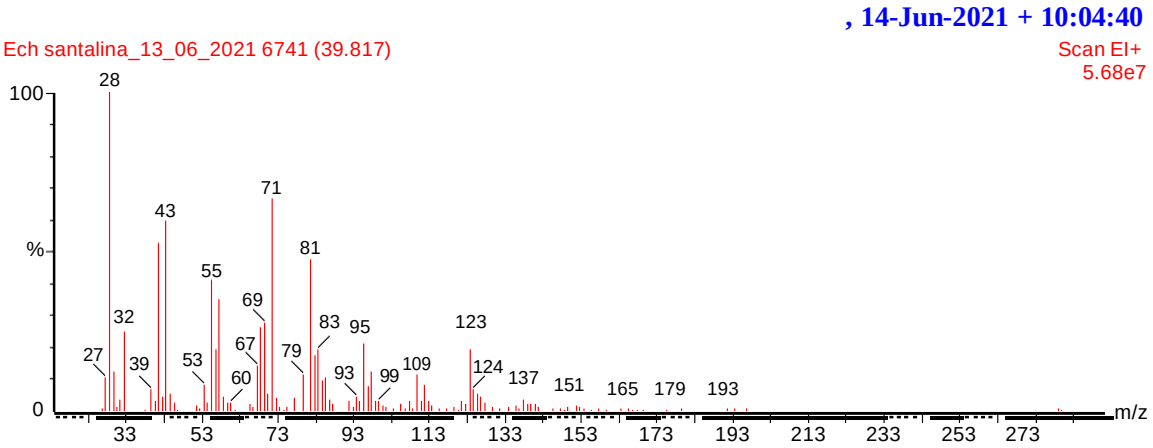


Fig.5 Spectre masse dont le temps de rétention 39.81mn.