

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

THESE de DOCTORAT de 3^{ème} cycle

Spécialité : Valorisation des substances naturelles

Intitulée

Etude ethnobotanique et évaluation des activités anti-oxydante et biologiques des extraits et des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Thymus serpyllum* de la région de Mascara

Présentée par : M^{me} MADOUNI Nariman

Le 18 /01 /2023

Devant le jury :

Président	Mr. Bachir Raho Ghalem	Professeur	Université M. S. de Mascara
Examineur	Mr. Kihal Mabrouk	Professeur	Université d'Oran 1
Examineur	Mr. Abbouni Bouziane	Professeur	Université U.D.L. de SBA
Examineur	Mr. Belkhodja Hamza	MCA	Université M. S. de Mascara
Examineur	M ^{me} . Maghraoui Nebia	MCA	Université M. S. de Mascara
Encadreur	Mr. Meddah Boumediene	Professeur	Université M. S. de Mascara

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon père qui nous a quittés en 2021, cet homme si humble et si grand en même temps. Ce père qui était là et dont la présence et les sacrifices m'ont été d'un grand réconfort. Paix à ton âme papa.

À ma chère maman, mon rayon de soleil, ma joie de vie. Je te remercie pour tous tes sacrifices et merveilleuses choses. Les citer, les mots sont peu. De tout mon cœur je te souhaite un bon rétablissement.

À mon cher époux, pour son soutien, ses sacrifices et ses encouragements.

À mes très chers frères Ilies et Oussama, ma tendre petite sœur Amina et mes adorables belle-sœurs Rania et Meriem.

À mes chers beaux parents Amar et Djohar

À mon cher oncle MADANI et tante DALLILA

À toute la famille MADOUNI, GAFFOUR et BENAIDJA

À mes amies Hanane, Firdaous, Sihem, Nour, Foufa et Fatima

Madouni Nariman

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je réserve cette page en signe de gratitude et de reconnaissance

*En tout premier lieu, à notre **Dieu, le tout puissant et clément**, je dis merci de m'avoir donné le courage et la patience afin de finir ce projet de thèse.*

*Mes plus respectueux remerciements s'adressent à mon directeur de thèse Professeur **MEDDAH BOUMEDIENE**. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour son grand aide, son suivi, sa patience, sa rigueur et la confiance qu'il m'a accordé pour finir mon modeste travail.*

Mes remerciements sont aussi destinés à :

- Pr. **BACHIR RAHO GHALEM** Président de jury*
- Pr. **KIHAL MABROUK** Examineur- Université Oran 1.*
- Pr. **ABBOUNI BOUZIANE** Examineur-Université de Sidi Bel-Abbes.*
- Dr. **BELKHODJA HAMZA** Examineur- Université Mustapha Stambouli*
- Dr. **MAGHRAOUI NEBIA** Examineur- Université Mustapha Stambouli*

D'avoir accepté de participer au jury et de contribuer par leurs précieuses remarques et suggestions afin d'améliorer la qualité de ce modeste travail.

*Je tiens aussi à exprimer mes vifs remerciements à **Pr. YAVUZ SELIM CAKMAK**, professeur du Département de Biotechnologie et Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences et de l'Art, Université Aksaray,*

Turquie et Dr CHAWKI BENSOUICI, responsable du laboratoire de biochimie au Centre de Recherche en Biotechnologie CRBT Constantine de m'avoir accepté au sein de leurs laboratoires afin de réaliser des parties expérimentales de ma these de recherche

Mes chaleureux remerciements vont aussi a Pr. Toumi Fouzia de m'avoir aidé dans la réalisation de la partie In vivo au niveau de l'animalerie de l'université UDL SBA.

Mes vifs remerciements s'adressent au personnel des laboratoires de la faculté SNV de l'université Mustapha Stambouli, Mascara et la faculté SNV de l'université Djillali Liabes, SBA pour leur présence et grande aide.

Je remercie aussi mes amies Nour, Foufa, Hanane, Siham et Ferdous pour leur présence dans ma vie et leurs encouragements

En derniers lieux, j'adresse de chaleureux remerciement a toute ma famille qui ma longuement soutenue par son amour et ses encouragements.

Je dis merci à tous ceux qui ont contribué de pré ou de loin dans la réalisation de ce projet.

Madouni Nariman

Merci 

Table des matières

Table des matières	i
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xx
Introduction générale	1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : L'Ethnobotanique

I.1. Introduction	4
I.2 Définition de l'ethnobotanique	4
I.3. Intérêt et objectifs de l'ethnobotanique	4
I.4. Sources et moyens de travail	5
I.5. Les questions clés en recherche ethnobotanique	6
I.6. Principe et protocole d'une enquête ethnobotanique	6
I.7. L'Ethnopharmacologie	7
I.7.1. Objectifs de l'ethnopharmacologie	7
I.7.2. Phytothérapie	8

Chapitre II : Les plantes aromatiques et médicinales

II.1. Généralités sur les plantes médicinales	9
II.2. La famille des lamiacées	9
II.2.1. Le genre Thymus	10
II.2.1.1. Généralités	10
II.2.1.2. Description botanique et taxonomie	10
II.2.3. Habitat	13
II.2.4. Répartition géographique	13
II.2.5. Composition chimique	13
II.2.6 . Usages	14

Chapitre III : Les molécules bioactives des plantes médicinales

III.1. Généralités	15
III.2. Classification des métabolites secondaires	15
III.2. 1 Composés phénoliques	15
III. 2. 1. 1 Définition	15
III. 2. 1. 2 Biosynthèse des composés phénoliques	16

III. 2. 1. 3. Classification des composés phénoliques	17
III. 2. 1. 4 Méthodes d'extraction des polyphénols	19
III. 2. 1. 5 Dosage et identification des composés phénoliques	20
III. 2. 2 Les huiles essentielles	22
III. 2. 2. 1 Définition	22
III. 2. 2. 2 Localisation	22
III. 2. 2. 3 Composition chimique	23
III. 2. 2. 4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	26
III. 2. 2. 5 Méthodes d'Identification des huiles essentielles	28
III. 2. 3 Les alcaloïdes	28
III. 2. 3. 1 Définition	28
III. 2. 3. 2 Biosynthèse des alcaloïdes	29
III. 2. 3. 3 Structures et classification des alcaloïdes	29

Chapitre IV : Activités biologiques

IV.1 Stress oxydatif et antioxydants	30
IV. 1. 1 Introduction	30
IV.1. 2 Définition du stress oxydatif	30
IV.1. 3 Les radicaux libres	30
IV. 1. 4 Effets du stress oxydatif sur l'organisme	32
IV. 1. 5 Pathologies associées	33
IV. 1. 6 Les antioxydants	35
IV. 1. 6. 1 Définition	35
IV. 1. 6. 2 Sources d'antioxydants	35
IV. 2 Inflammation et anti-inflammatoires	38
IV. 2. 1 Généralités	38
IV. 2. 2 Types d'inflammation	39
IV. 2. 3 Les cellules et médiateurs de l'inflammation	40
IV. 2. 4 Les anti-inflammatoires	41
IV.3. Douleur et analgésiques	45
IV. 3. 1 Définition de la douleur	45
IV. 3. 2 Types de douleurs	45
IV. 3. 3 Mécanismes de la douleur	48

IV. 3. 4 Les traitements analgésiques	48
IV. 3. 4. 1 Analgésiques périphériques	48
IV. 3. 4. 2 Analgésiques centraux	49
IV. 3. 4. 3 Analgésiques de sources végétales	49

Partie expérimentale

- Matériels et méthodes -

I Objectifs	50
II Enquête ethnobotanique	52
II. 1 Méthodologie	52
II. 2 Expression des résultats	52
II. 2. 1 Valeur d'usage UV	52
II. 2. 2 Niveau de fidélité FL	53
III. Matériel	53
III.1 Matériel végétal	53
III. 1. 1 Situation géographique du site de récolte	54
III. 2 Matériel animal	55
IV. Extraction des principes bioactifs et étude phytochimique	56
IV.1 Les huiles essentielles	56
IV. 1. 1 Extraction des huiles essentielles	56
IV. 1. 2 Rendements des huiles essentielles	56
IV. 1. 3 Analyses physico-chimiques	57
IV. 1. 4 Caractérisation chromatographique	57
IV.2 Les composés phénoliques	58
IV. 2. 1 Extraction des composés phénoliques	58
IV. 2. 2 Les rendements des extraits phénoliques	59
IV. 2. 3 Dosages des composés phénoliques	60
IV. 2. 3. 1 Dosage des phénols totaux	60
IV. 2. 3. 2 Dosage des flavonoïdes	61
IV. 2. 3. 3 Dosage des tanins	61
IV. 2. 4 Analyse chromatographique : HPLC/DAD	62
V. Activités biologiques	63
V. 1 Activités in vitro	63
V. 1. 1 Activités antioxydantes	63

V. 1. 1. 1	Méthode de piégeage du radical libre DPPH	63
V. 1. 1. 2	Activité anti-radicalaire du Galvinoxyl (GOR)	64
V. 1. 1. 3	Test du pouvoir réducteur des ions de fer Fe ³⁺	65
V. 1. 1. 4	Evaluation de l'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	65
V. 1. 1. 5	Test Phenanthroline	66
V. 1. 2	Activité photo-protectrice	66
V.2	Activités biologiques <i>in vivo</i>	67
V. 2. 1	Test de toxicité	68
V. 2. 2	Activité anti-inflammatoire (modèle d'œdème induit par la carraghénine)	69
V. 2. 3	Activité analgésique : model plaque chauffante (Hot plate)	71
VI.	Analyses statistiques	71

-Résultats et discussion-

I.	Enquête ethnobotanique	73
I.1	Partie de l'informateur	73
I. 1. 1	Selon l'âge	73
I. 1. 2	Selon le sexe	74
I. 1. 3	Selon le niveau académique	75
I.2.	Partie de la plante	76
I. 2. 1	Usage de la plante	76
I. 2. 2	Parties utilisés de la plante	76
I. 2. 3	Mode de préparation	77
I. 2. 4	Maladies traités	78
II.	Etudes phytochimiques	80
II. 1	Extraction des huiles essentielles	80
II. 1. 1	Rendements et caractéristique organoleptiques	80
II. 1. 2	Analyses physico-chimiques des huiles essentielles	81
II. 1. 3	Composition chimique des huiles essentielles	82
II. 2	Extraction des polyphénols	86
II. 2. 1	Les rendements d'extraction des polyphénols	86
II. 2. 2	Dosage des composés phénoliques	87
II. 2. 3	Analyse chromatographique des extraits par HPLC/DAD	90

III. Activités biologiques	92
III.1 Activités <i>In vitro</i>	92
III. 1. 1 Activités anti-oxydantes	92
III. 1. 1. 1 Activité anti-radicalaire au DPPH	92
III. 1. 1. 2 Test du pouvoir de piégeage du radical galvinoxyl GOR	94
III. 1. 1. 3 Test du pouvoir antioxydant par réduction du cuivre CUPRAC	96
III. 1. 1. 4 Test du pouvoir réducteur du fer ferrique Introduction générale	98
III. 1. 1. 5 Test de l'activité antioxydante par la méthode phénanthroline	99
III. 1. 2 Activité photoprotectrice	101
III.2 Activités <i>In vivo</i>	103
III. 2. 1 Etude de la toxicité aigue	103
III. 2. 2 Activité anti-inflammatoire	105
III. 2. 3 Evaluation de l'activité analgésique	112
III. 2. 3. 1 Test de la plaque chauffante	112
Conclusion et perspectives	116
Références bibliographiques	118
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1: Systématique de <i>T. vulgaris</i>	11
Tableau 2: Systématique de <i>T. serpyllum</i>	12
Tableau 3: Caractéristiques géographique du site de collecte des deux espèces étudiées ...	55
Tableau 4: Nombre de mortalités des souris de l'étape 1 et les doses correspondantes pour l'étape 2	68
Tableau 5: Niveaux de fidélités FL des deux espèces étudiées	79
Tableau 6: Rendements et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles	80
Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles	81
Tableau 8: Composition chimique de huile essentielle de <i>T. serpyllum</i>	82
Tableau 9: Composition chimique de huile essentielle de <i>T. vulgaris</i>	84
Tableau 10: Rendements et caractéristiques des extraits phénoliques	86
Tableau 11: Identification chromatographique des extraits phénoliques HPLC	90
Tableau 12: Activité antiradicalaire des extraits phénoliques et des huiles essentielles	94
Tableau 13: Résultats du test de toxicité Lorke (Première étape)	103
Tableau 14: Résultats du test de toxicité Lorke (deuxième étape)	104

Liste des figures

Figure 1 : <i>Thymus vulgaris</i> a) Touffe, b) Fleurs, c) Tige et feuilles	11
Figure 2 : <i>Thymus serpyllum</i>	12
Figure 3 : Schéma représentatif de biosynthèse des composés phénoliques	16
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes	18
Figure 5 : Unité Isoprène	23
Figure 6 : Classification des terpènes selon le nombre d'unités isoprène.....	24
Figure 7: Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène	31
Figure 8: Mécanismes des antioxydants	37
Figure 9: Complexe fer- polyphenol (Gallol R= OH, Catéchols R= H)	38
Figure10: Schéma représentatif de la biotransformation des l'acide arachidonique sous action de la cyclooxygénase le.....	41
Figure 11: Mode d'action des anti-inflammatoires	43
Figure 12: Schéma représentatif de la douleur nociceptive	46
Figure 13: Schéma représentatif de la douleur inflammatoire	47
Figure 14: Schéma récapitulatif de la méthodologie générale	51
Figure 15: Identification botanique de <i>Thymus serpyllum</i>	54
Figure 16: Identification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	54
Figure17: Carte géographique du site de collecte de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i>	55
Figure 18: Photo de montage d'hydrodistillation type Clevenger	56

Figure 19: Extraction des composés phénoliques par l'éthanol	59
Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	60
Figure 21: Courbe d'étalonnage de la quercétine	61
Figure 22: Courbe d'étalonnage de la catéchine	62
Figure 23: Réaction de DPPH avec un antioxydant naturel	63
Figure 24: Test CUPRAC(réduction du complexe Cu^{2+} -NC)	65
Figure 25: Administration des extraits par gavage	67
Figure 26: a) Forme de la patte après injection de carraghénine ; b) mesure du diamètre d'oedeme	70
Figure 27: Photo de l'activité analgésique sur plaque chauffante	71
Figure 28: Répartition des usages des plantes selon l'âge	73
Figure 29: Répartition de l'usage de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> selon le sexe	74
Figure 30: Répartition d'usage de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> selon le niveau académique	75
Figure 31: Répartition d'usage des plantes sélectionnées a) <i>T. serpyllum</i> ; b) <i>T. vulgaris</i>	76
Figure 32: Répartition des parties utilisées a) <i>T. serpyllum</i> ; b) <i>T. vulgaris</i>	77
Figure 33: Répartition du mode de préparation a) <i>T. serpyllum</i> ; b) <i>T. vulgaris</i>	78
Figure 34: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. serpyllum</i>	83
Figure 35: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i>	85
Figure 36: Taux de phénols totaux dans les extraits de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i>	87
Figure 37: Taux de flavonoïdes des différents extraits de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i>	88
Figure 38: Taux de tanins condensés des différents extraits de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i>	89
Figure 39: Les valeurs IC_{50} des extraits de <i>T. serpyllum</i> et de <i>T. vulgaris</i> (Test DPPH)	92

Figure 40: Les valeurs IC ₅₀ des huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test DPPH).....	93
Figure 41: Les valeurs IC ₅₀ des extraits de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test GOR).....	94
Figure 42: Les valeurs IC ₅₀ des huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test GOR).....	95
Figure 43: Valeurs A _{0.5} des différents extraits phénoliques de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test CUPRAC).....	96
Figure 44: Les valeurs A _{0.5} des huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test CUPRAC).....	97
Figure 45: Les valeurs A _{0.5} des extraits de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test pouvoir reducteur)	98
Figure 46: Les valeurs A _{0.5} des huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test pouvoir reducteur)	99
Figure 47: Valeurs A _{0.5} des différents extraits phénoliques de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test phénanthroline)	100
Figure 48: Valeurs A _{0.5} des huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i> (Test phénanthroline)	101
Figure 49: Valeurs du facteur de protection solaire SFP des différents extraits et huiles essentielles de <i>T. serpyllum</i> et <i>T. vulgaris</i>	102
Figure 50: L'évolution de la taille d'œdème (en mm) en fonction du temps sous l'effet des différents extraits de <i>T. serpyllum</i>	106
Figure 51: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle de <i>T. serpyllum</i>	107
Figure 52: L'évolution de la taille d'œdème (en mm) en fonction du temps sous l'effet des différents extraits de <i>T. vulgaris</i>	108
Figure 53: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i>	109

Figure 54: Temps de latence enregistrés des souris traités par les extraits et l'huile essentielle de *T. serpyllum*113

Figure 55: Temps de latence enregistrés des souris traités par les extraits et l'huile essentielle de *T. vulgaris*113

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation.

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

AqTS : Extrait Aqueux (infusé) *T. serpyllum* ,

Aq TV : Extrait Aqueux (infusé) *T. vulgaris*

COX : Cyclooxygénase.

DL50 : Dose Létale 50

DMSO: DiMethyl Sulfoxyde.

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyle.

ERO : Espèce réactive oxygénée

ERN : Espèce Réactive azotée

ET TS : Extrait ethanolique *T. serpyllum*

ET TV : Extrait ethanolique *T. vulgaris*,

FCR : Folin-Ciocalteu

FID : Détecteur par Ionisation de Flamme

FL: Fidelity level.

GSH-Px : Glutathione peroxydase

HE: Huile essentielle

HM: Hydrocarbures Monoterpenique

HS: Hydrocarbure sesquiterpénique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 %

IL: Interleukine.

IR : Indice de Rétention

mg E AG/g : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme.

mg E CA/g : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme.

mg E Q/g : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme.

MO: Monotèrpenes oxygénés

NO: Monoxyde d'Azote.

OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economiques.

OMS: Organisation Mondiale de Santé.

PG : Prostaglandine.

PGH₂ : Prostaglandine H₂

Phpr: Phenylpropanoïdes.

PN : Polynucléaires

SM : Spectrométrie de Masse

SO: Sesquiterpènes oxygénés

SOD : Superoxyde-dismutase

TNF: Facteur de nécrose tumorale

Tr min: Temps de rétention en minutes

UV: Ultra Violet

(UV): Use value.

Résumé

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de molécules bioactives, très diverses et qui jouent un rôle important dans le développement permanent de l'industrie pharmaceutique. Ce présent travail a pour but de valoriser le *Thymus serpyllum* et le *Thymus vulgaris* par l'étude des propriétés biologiques de leurs molécules bioactives par un ensemble de tests *in vitro* et *in vivo*. Ces deux espèces de thym sont très marquées par leur grande utilisation par la population locale de la région de Mascara.

L'extraction des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* a permis l'obtention de rendements de 5.66% et 0.48% respectivement. L'analyse chromatographique GC/MS révèle que l'huile essentielle de *T. serpyllum* est chémotype à carvacrol où elle est représentée par le carvacrol comme composé majeur à (66%). Cependant pour le *T. vulgaris*, le composé majeur est le linalool à un pourcentage de (64.2%).

Le dosage des composés phénoliques a permis de révéler des taux très importants en phénols totaux, flavonoïdes et tanins. L'identification des extraits phénoliques par HPLC/DAD a montré la richesse des extraits éthanoliques de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* en acide benzoïque avec des taux de 22.89 mg/g et 2.45 mg/g d'extrait respectivement. Cependant l'acide rosmarinique et l'acide benzoïque ont été détectés comme composés majeurs dans les extraits aqueux de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* respectivement avec des taux de 17.25 mg/g et 30.45 mg/g d'extrait.

Les résultats des tests biologiques *in vitro* ont révélés, d'importantes activités antioxydantes des extraits phénoliques particulièrement, les extraits éthanoliques par rapport aux huiles essentielles par les méthodes DPPH, GOR, CUPRAC et le pouvoir réducteur. Cependant l'huile essentielle de *T. serpyllum* a montrée une activité antioxydante supérieur par rapport aux extraits par la méthode phénanthroline. Concernant le facteur de protection solaire SFP, les résultats ont dévoilés des valeurs très importantes pour les extraits phénoliques (facteur supérieur à 38) tandis que de faibles valeurs pour les huiles essentielles.

Les tests d'activités biologiques *in vivo* ont révélés une absence de toxicité pour les différents extraits des plantes sélectionnées avec des DL₅₀ supérieurs à 5000 mg/kg. L'activité anti-inflammatoire a révélé un pourcentage d'inhibition de l'inflammation très proche du traitement de référence (Indométacine) de l'ordre de 91.56% et 80.23% pour les extraits aqueux de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* respectivement. Les tests d'activité analgésique (antinociceptive) ont montrés un grand pouvoir anti-douleur pour les extraits éthanoliques et les huiles essentielles des deux espèces étudiées et qui ont largement dépassés l'analgésique de référence (Ibuprofène).

Mots clés : *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, extraits, huiles essentielles, antioxydante, activités biologiques, Mascara.

Abstract

This work aims to enhance *Thymus serpyllum* and *Thymus vulgaris* by studying the biological properties of their bioactive molecules with a series of *in vitro* and *in vivo* tests. These two species of thyme are very marked by their great use by the local population of Mascara region.

The extraction of essential oils from *T. serpyllum* and *T. vulgaris* resulted in yields of 5.66% and 0.48% respectively. GC/MS chromatographic analysis reveals that the essential oil of *T. serpyllum* is a carvacrol chemotype where it is represented by carvacrol as the major compound at (66%). However for *T. vulgaris*, the major compound of this essential oil is linalool at a percentage of (64.2%).

The determination of phenolic compounds revealed very high levels of total phenols, flavonoids and tannins. Identification of phenolic extracts by HPLC/DAD showed the richness of the ethanolic extracts of *T. vulgaris* and *T. serpyllum* in benzoic acid with levels of 22.89 mg/g and 2.45 mg/g extract respectively. However for aqueous extracts rosmarinic acid was detected as a major compound in *T. serpyllum* at a rate of 17.25 mg/g extract while for *T. vulgaris* was benzoic acid with a rate of 30.45 mg/g extract. The results of the *in vitro* biological tests revealed the important antioxidant activities of the phenolic extracts especially, the ethanolic extracts compared to the essential oils by the methods of anti-radical activity DPPH method, GOR, CUPRAC and reducing power. However the essential oil of *T. serpyllum* showed a higher antioxidant activity compared to the extracts by the phenanthroline method. Concerning the SFP (Sun Protection Factor), the results revealed very important values for phenolic extracts (factor greater than 38) while low values for essential oils. The *in vivo* biological activity tests revealed a lack of toxicity for the different extracts of the selected plants with LD₅₀ values greater than 5000 mg/kg. The anti-inflammatory activity showed a percentage inhibition of inflammation very close to the reference treatment (Indomethacin) with a percentage of 91.56% and 80.23% for aqueous extracts of *T. vulgaris* and *T. serpyllum* respectively. The analgesic activity tests revealed a great painkiller power for the ethanolic extracts and essential oils of the two species studied and that have even far exceeded the reference analgesic (Ibuprofen).

Keywords: *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, extracts, essential oils, antioxidant, biological activities, Mascara.

ملخص

تعد النباتات الطبية مصدرًا لا ينضب لجزيئات متنوعة جدًا نشطة بيولوجيًا و التي تلعب دورًا مهمًا في التطوير المستمر في مجال صناعة الأدوية. يهدف هذا العمل إلى تعزيز قيمة *T. serpyllum* و *T. vulgaris* من خلال تقييم الخصائص البيولوجية. لجزيئاتهم النشطة بيولوجيا من خلال سلسلة من التجارب المخبرية. يتميز هذان النوعان من الزعتر باستخدامهما الكبير من قبل السكان المحليين في منطقة معسكر.

أدى استخراج الزيوت الأساسية من *T. serpyllum* و *T. vulgaris* إلى عائدات بنسبة 5.66% و 0.48% على التوالي. يكشف التحليل الكروماتوغرافي GC/MS أن الزيت الأساسي لـ *T. serpyllum* هو نمط كيميائي كارفاكول حيث يتم تمثيله بواسطة كارفاكول كمركب رئيسي عند (66%). أما بالنسبة لـ *T. vulgaris*، فإن المركب الرئيسي لهذا الزيت هو لينالول بنسبة (64.2%).

كشفت تحديد المركبات الفينولية عن مستويات عالية جدًا من إجمالي الفينولات الكلية، الفلافونويدات والتانينات. أظهر تحديد المستخلصات الفينولية بواسطة HPLC/DAD ثراء المستخلصات الإيثانولية بحمض البنزويك من *T. vulgaris* و *T. serpyllum* بمستويات 22.89 مجم/مجم و 2.45 مجم/مجم مستخلص على التوالي. كما تم تسجيل حمض روزمارينيك كمركب رئيسي في *T. serpyllum* بمعدل 17.25 ملغم/غرام من المستخلص المائي بينما بالنسبة لـ *T. vulgaris* كان حمض البنزويك بمعدل 30.45 ملغم/غرام من المستخلص.

كشفت نتائج الاختبارات البيولوجية في المختبر عن أنشطة مهمة مضادة للأكسدة لمستخلصات الفينوليك بشكل خاص، مستخلصات الإيثانوليك مقارنة بالزيوت الأساسية بطرق النشاط المضاد للجذور الحرة DPPH، طريقة GOR، CUPRAC والطاقة الارجاعية. ومع ذلك، أظهر الزيت العطري لـ *T. serpyllum* نشاطًا أعلى مقارنة بالمستخلصات بواسطة طريقة الفينانثرولين. فيما يتعلق بعامل الحماية من أشعة الشمس SFP، كشفت النتائج عن قيم مهمة جدًا للمستخلصات الفينولية (عامل أكبر من 38) بينما قيم منخفضة للزيوت الأساسية.

كشفت اختبارات النشاط البيولوجي في الجسم الحي عن نقص في السمية لمختلف المستخلصات من النباتات المختارة ذات الجرعة المميتة DL_{50} التي تزيد قيمتها عن 5000 ملغ/كغ. أظهر النشاط المضاد للالتهابات تشبيهاً مؤبياً للالتهاب قريباً جداً من العلاج المرجعي (الإندوميثاسين) في حدود (91.56%) و (80.23%) للمستخلصات المائية من *T. vulgaris* و *T. serpyllum* على التوالي. كما كشفت اختبارات النشاط المسكن للألم عن قوة مسكنات كبيرة للمستخلصات الإيثانولية والزيوت الأساسية للنوعين المدروسين والتي تجاوزت بكثير المسكنات المرجعية (الإيبوبروفين).

الكلمات المفتاحية: *Thymus vulgaris*، *Thymus serpyllum*، المستخلصات، الزيوت الأساسية، مضادات الأكسدة، الأنشطة البيولوجية، معسكر.

Introduction générale

Les produits naturels issus des plantes médicinales sont actuellement en demande et leur acceptation par la population sans cesse augmente. Ces plantes représentent un réservoir de biomolécules qui peuvent être utilisés dans le domaine pharmacologique afin de développer de nouveaux médicaments. La toxicité et les effets indésirables des médicaments conventionnels et allopathiques représentent des facteurs importants dans l'augmentation de la demande de médicaments traditionnels à base de plantes médicinales afin de réduire l'utilisation de produits chimiques en thérapeutique (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018)

En Algérie, la phytothérapie fait partie intégrante de la culture locale de la population qui détient un savoir important acquis empiriquement d'une génération à l'autre (Djahafi *et al.*, 2021). En effet, l'Algérie se caractérise par une flore très riche et très diversifiée en raison de sa situation géographique, ses conditions climatiques et sa topographie. Cette grande diversité est aperçue avec un climat méditerranéen dans le nord, les montagnes de l'Atlas au centre et le désert du Sahara au sud (Azzi *et al.*, 2012).

La diversité des taxons végétaux représente une source importante dans la recherche ciblée des composés biologiques en fonction des usages traditionnels (Taïbi *et al.*, 2020). La famille des lamiacées intègre une variété de plantes avec des applications biologiques et médicales. Les plus connus sont le thym, romarin, la lavande, menthe, origan, basilic, sauge, sarriette et mélisse. Les plantes de cette famille sont bien connues pour leurs propriétés thérapeutiques (Bekut *et al.*, 2018).

Parmi les plantes les plus populaires de la famille des lamiacées sont les espèces du genre *Thymus*. Ce dernier est très complexe du point de vue taxonomique et systématique, démontrant un polymorphisme significatif dans les caractéristiques morphologiques et dans la composition des huiles extraites de ces plantes aromatiques. Le *Thymus vulgaris* est un sous-arbrisseau à fleurs violettes ou roses avec de petites feuilles oblongues-lancéolées gris-vert fortement aromatiques (Hosseinzadeh *et al.*, 2015). Il existe six chimiotypes connus d'huiles essentielles de *T. vulgaris* : carvacrol, thymol, geraniol, linalool, α -terpèneol et thujanol. (Thompson *et al.*, 2003).

Le *Thymus serpyllum* est un arbuste vivace avec de longues tiges, des feuilles ovales et des fleurs situées au sommet des tiges. Cette espèce de thym est utilisée dans la préparation de sirops, infusions, décoctions et des remèdes à base d'huiles essentielles (Jarić *et al.*, 2015).

Le *T. vulgaris* et *T. serpyllum* contribuent à plusieurs bienfaits potentiels pour par leurs pouvoirs anti-inflammatoires, anticancer, antidiabétiques, antiprolifératifs, antimicrobiens et antioxydant (Kindl *et al.*, 2015; Khouya *et al.*, 2015).

L'exploitation des richesses en plantes aromatiques et médicinales en Algérie est indispensable. De ce fait notre étude s'est intéressée à la valorisation de ces deux espèces de thym poussant à l'état spontanée dans la région de Mascara. L'objectif de l'étude était d'abord de réaliser une étude ethnobotanique sur les deux espèces de thym cités auparavant et qui pourrait fournir des informations sur leurs utilisations ethno-médicales dans la région de Mascara. Ensuite une investigation phytochimique et une étude analytique des différents extraits. Enfin une étude réalisée sur les activités biologiques des composés extraits de ces deux espèces de thym.

Notre thèse est structurée en deux parties distinguées :

✓ La première partie est consacrée à une étude bibliographique comportant quatre chapitres. Le premier chapitre aborde l'ethnobotanique, le deuxième est consacré à une monographie des plantes concernées. Le troisième chapitre s'intéresse aux molécules bioactives des plantes médicinales et enfin le quatrième est consacré aux stress oxydatif et activités biologiques (activités antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique).

✓ La deuxième partie concerne l'étude expérimentale qui comporte :

1. Une étude ethnobotanique sur les plantes sélectionnées.
2. Extraction des composés phénoliques par deux types de solvants ainsi que les huiles essentielles par hydro-distillation type Clevenger.

3. Une caractérisation phytochimique et chromatographique des différents extraits phénoliques et des huiles essentielles dans le but d'identifier les molécules bioactives.

4. Réalisation des tests d'activités biologiques *in vitro* par cinq méthodes d'activités antioxydante, et le test du facteur de protection solaire SFP. Les tests *in vivo* se focalisent sur les tests de toxicité aigue, étude de l'activité anti-inflammatoire et l'activité analgésique des différents extraits et huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*.

✓ Cette étude est clôturée par une conclusion générale.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Ethnobotanique

I.1.Introduction

Les connaissances autochtones et l'ethnoscience doivent être intégrées aux approches biotechnologiques afin de fournir une validation scientifique des produits finaux et de parvenir à une gestion durable des ressources naturelles.

La bio-prospection fondée sur une ethnobotanique pour la recherche sur les plantes médicinales pourrait mener à la production et au développement des produits de santé tels que les phytomédicaments, et les compléments alimentaires. Les plantes candidates sont déterminées conformément à des études de terrain. En fait, l'ethnobotanique ne se concentre pas seulement sur les plantes médicinales mais aussi sur d'autres produits naturels, y compris les plantes oléagineuses et plantes ornementales (Eldeen *et al.*, 2016).

I.2.Définition de l'ethnobotanique

L'ethnobotanique en tant que discipline est actuellement orientée vers l'exploration de nouvelles ressources végétales, la collecte de matériel génétique, la découverte de médicaments et développement de produits (Bennett, 2002).

L'ethnobotanique est la science qui étudie l'interaction de l'homme avec les plantes, et qui a été utilisée pour la première fois par John Harshberger en 1895. Il l'a défini comme l'utilisation des plantes par les peuples autochtones. La sélection ethnobotanique représente un moyen d'identification des plantes qui peuvent contenir de composés pertinents pour l'exploitation. Son point de vue pratique est la question : « A quoi sert cette plante ? », aujourd'hui, la question est souvent plus limitée : « A quoi sert cette plante- pour nous ? ».

I. 3. Intérêt et objectifs de l'ethnobotanique

L'étude ethnobotanique représente l'élément essentiel dans le passage de la connaissance traditionnelle des plantes vers les processus de leur valorisation. C'est une étude qui fournit des éléments nécessaires pour comprendre comment les ancêtres ont insérés les plantes de leur milieu naturel dans le traitement médicamenteux et participe aussi à la gestion durable des diversités floristiques locales (Albuquerque, 2009).

Les études ethnobotaniques peuvent être classées en fonction des objectifs tracés comme suit :

- Etude du savoir traditionnel des végétaux.
- Evaluation quantitative de l'utilisation et l'exploitation des ressources végétales.
- Evaluation des apports des plantes en termes financiers et de subsistances.
- Elaboration et développement de projets afin d'optimiser les apports locaux de plantes utilisés par les populations (Albuquerque, 2009).

I. 4. Sources et moyens de travail

L'ethnobotanique est à l'intersection des domaines de l'ethnologie, botanique, l'agronomie et la génétique. Divers chercheurs ont adopté différentes méthodes, approches et priorités dans leur travail. Selon Portères, (1961) les sources de données ethnobotaniques sont comme suit :

- Le travail parmi les autochtones actuels ou les sociétés primitifs et enregistrement de leurs traditions et légendes sur les plantes.
- Sources bibliographiques par examen de la littérature rapportés par les historiens, les archéologues, agronomes et sur l'ethnologie, la médecine traditionnelle, et autres données à intérêt ethnobotanique.
- Données archéologiques avec examen minutieux des collections dans les musées, des herbiers et des collections de références avec prises de notes sur l'utilisation ou l'interdiction d'usage des plantes.
- Enquêtes ethnobotaniques élaborés avec les ethnies présentes dans la région étudiée, avec recherche de documents qui peuvent contenir les usages, noms vernaculaires, modes d'emploi, origines et effets thérapeutiques.
- Réalisation des inventaires des jardins, plantations, champs avec collecte de bouture et, de graines et de plants. La constitution de jardins de rassemblement des végétaux permet de faciliter les travaux d'ordre génétique, et écologique.

I. 5. Les questions clés en recherche ethnobotanique

Le point de départ de toute recherche scientifique est représenté par les questions de recherche. Selon Houéhanou *et al.*, (2016), les questions sont représentées comme suit :

- Quels sont les utilités alimentaires et non alimentaires de plantes étudiées pour la population concernée ?
- Que connaît la population sur les plantes et sur leur écologie dans le milieu enquêté ?
- Quelles plantes utilisés pour le traitement d'une pathologie mentionnée par la population concerné ?
- Quels sont les paramètres sociaux (sexe, niveau culturel, âge) qui peuvent influencer l'usage ou le savoir des plantes ?
- Quelles sont les méthodes d'échantillonnage efficaces pour la détermination de l'importance des plantes pour les communautés étudiées ?
- Est-ce que le savoir des peuples sur l'utilité des plantes représente réellement les usages des populations locales étudiées ?
- Comment le savoir des populations et l'importance des plantes peuvent être utilisés comme indice de biodiversité et peuvent permettre ainsi la prédiction de la disponibilité des plantes étudiées ?

I. 6. Principe et protocole d'une enquête ethnobotanique

Au cours de l'enquête ethnobotanique, la collection des informations concernant les plantes nécessite le rapprochement vers la population de la zone à étudier en suivant les étapes suivantes :

- Sélectionner la zone d'étude.
- S'adresser à la population locale et même des spécialistes et leur expliquer les objectifs afin de collecter le maximum d'informations. Ces spécialistes peuvent inclure des botanistes, des herboristes, des sages femmes, des experts en remèdes traditionnels (réduction et consolidations des os fracturés) (Heinrich, 2013).

- Effectuer un entretien avec la population par l'utilisation d'un questionnaire. Ce dernier comporte une partie informateur représenté par un ensemble d'individus choisis de façon aléatoire avec mention des informations (l'âge, sexe, fonction, niveau culturel, etc.) et la partie plante où sont mentionnés les questions concernant la connaissance de la plante, son mode de préparation et de conservation, les méthodes d'utilisation ainsi que les pathologies traités par cette plante en question (Juhé-Beaulaton, 2020).
- Une fois les informations enregistrées, le matériel végétal est recueilli et identifié par un taxonomiste, l'espèce devrait être identifiée avec son nom latin taxonomique valide. Les spécimens doivent être déposés dans un herbier international accessible afin de fournir une documentation botanique complète (Martin, 1995 ; Benett et Balick, 2014).

I. 7. L'Ethnopharmacologie

L'ethnopharmacologie est une approche multidisciplinaire dans la découverte des médicaments basée sur la botanique, la chimie et la pharmacologie impliquant, l'observation, la description et l'étude de l'activité biologique des remèdes traditionnels. Le terme ethnopharmacologie a été utilisé pour la première fois en 1967 par Efron *et al* qui l'ont utilisé dans le titre d'un livre sur les Hallucinogènes. Ce terme a été proposé beaucoup plus tard que le terme ethnobotanique.

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique étudient la relation entre les humains et les plantes dans toute sa complexité (Heinrich, 2014). Les études ethno-pharmacologiques sont menées sur des parties de la plante (feuilles, tiges, graines, fruits, écorces, racines ou même la plante entière) pour son utilisation dans la médication.

I. 7. 1. Objectifs de l'ethnopharmacologie

En ethnopharmacologie, l'objectif important est le développement de préparations améliorées destinées à l'utilisation. Il est essentiel d'obtenir des informations sur les composés bioactifs, leurs effets synergiques ou antagonistes, le profil toxicologique et les préparations galéniques. Ainsi l'ethnopharmacologie permet de valider les préparations traditionnelles (Heinrich et Gibbons, 2001).

I. 7. 2. Phytothérapie

Toutes les sociétés humaines ont développés leurs propres concepts médicaux qui sont profondément enracinés dans leurs connaissances, compétences et pratiques. Etant donné que les plantes médicinales sont largement utilisées en médecine traditionnelle depuis la préhistoire, l'ethnopharmacologie traite principalement avec l'ethnobotanique et la phytothérapie (Löhnert *et al.*, 2014).

La phytothérapie, qui vient du grec « Phytos » plante et « therapeuo », qui signifie traitement, est le terme utilisé pour décrire la thérapie par les plantes médicinales (Jorite, 2015). Elle est définie comme l'utilisation de formes pharmaceutiques normalisées (comprimés, capsules, pommades, teintures,... etc.) préparées à base de plantes ayant une efficacité médicale scientifiquement prouvée dans la protection et le traitement des maladies, ou de produits naturels contenant les parties efficaces obtenus selon différents procédés. Les composants les plus importants et les plus désirables des médicaments à base de plantes sont les substances biologiquement actives qu'elles contiennent (polyphénols, tanins, composés terpéniques, etc). L'efficacité de la phytothérapie dépend principalement de leur nature et de leur concentration dans diverses parties de la plante. En outre, la phytothérapie s'intéresse à la recherche de nouveaux médicaments et à la découverte de nouvelles applications thérapeutiques de plantes médicinales déjà connues (Barnes *et al.*, 2007; Sezgin, 2020).

Chapitre II

Monographie des plantes étudiées

II. 1. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales ont formés la base de la médecine traditionnelle transmise de génération en génération et continuent de fournir à l'humanité de nouveaux remèdes. C'est aussi un fait que la plupart de toutes les ordonnances médicales sont des formulations à base de substances dérivées de plantes ou d'analogues synthétiques d'origine végétale. A l'heure actuelle, les études cliniques, pharmaceutiques et chimiques de ces traitements traditionnels sont à la base de nombreux médicaments tels que l'aspirine (écorce de saule), la morphine (*Pavot a opium*), la quinine (*Chinchona*) et pilocarpine (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

Une plante médicinale se définit comme étant une plante qui contient dans un ou plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique. Cependant les plantes aromatiques et médicinales peuvent être définies comme étant des plantes utilisées non seulement à des fins thérapeutiques mais aussi comme condiments et en cosmétologie (Schippmann *et al.*, 2002).

L'Algérie de par sa position géographique et sa diversité des conditions climatiques, se caractérise par une flore très diversifiée en plantes aromatiques et médicinales représentée par 3183 espèces végétales qui sont pour la plus part spontanées (Djahafi *et al.*, 2021). Plusieurs espèces de ces plantes aromatiques et médicinales appartiennent à la famille des lamiacées et font l'objet d'études biologiques fondées sur des traitements traditionnels afin de cibler le dépistage de nouveaux composés bioactifs.

II. 2. La famille des lamiacées

L'une des plus importantes familles des plantes aromatiques et médicinales est la famille des lamiacées (*Labiatae*), également connue sous le nom de famille de la menthe. Elle est d'une grande diversité avec une distribution cosmopolite comptant 236 genres et 7136 espèces. Les genres qui comptent plus de 250 espèces sont représentés principalement par *Slavia*, *Scutellaria*, *Plectranthus*, *Stachys*, *Thymus*, *Hyptis* et *Nepeta* (Trivellini *et al.*, 2016).

La plupart des espèces sont arbustives ou herbacées, et sont facilement reconnaissables aux tiges quadrangulaires et feuilles opposées deux à deux. Les fleurs sont zygomorphes avec cinq pétales unis et cinq sépales unis, généralement bisexuelles et verticillaires. Les espèces appartenant à cette famille sont généralement aromatiques et produisent des huiles essentielles. De par leur richesse en substances bioactives, elles sont utilisées comme aromatisant culinaires (épices) mais aussi par l'industrie pharmaceutique, cosmétique, alimentaire et production de pesticides (Carović-Stanko *et al.*, 2016). Le genre *Thymus* faisant l'objectif de notre étude est très répandu dans l'air méditerranéen et possède plusieurs domaines d'utilisation en médecine traditionnelle régionale.

II. 2. 1. Le genre *Thymus*

II. 2. 1. 1. Généralités

Le genre *Thymus*, décrit par Carl Linnaeus (Lin, 1753), est l'un des genres les plus importants dans la famille de lamiacées, en raison de son grand nombre d'espèces, et de son intérêt sur le plan économique et commerciale. Selon la classification proposée par (Jalas, 1971), le genre est subdivisé en huit sections dont cinq d'entre elles (Micantes, Mastichina, Piperella, Pseudothymbra et Teucrioides) sont endémiques à la méditerranée occidentale.

II. 2. 1. 2. Description botanique et taxonomie des plantes concernées

Selon Morales le genre *Thymus* regroupe 250 espèces aromatique vivaces avec de nombreuses sous espèces (Morales, 2002).

II. 2. 1. 2. 1. *Thymus vulgaris* (Thym commun)

Le *Thymus vulgaris* est l'espèce caractéristique du genre *Thymus* et connue avec des noms vernaculaires suivants : thym des jardins, thym cultivé, farigoule. Le Thym commun est un sous-arbrisseau vivace, touffu et aromatique qui pousse arrivant à une hauteur de 40 cm. Il se caractérise par des tiges dressées, rameuses et qui deviennent ligneuse avec le temps et enfin des racines assez robustes. Les feuilles de *Thymus vulgaris* sont petites, de 2.5 à 5 mm

de long, recourbées sur les bords, opposées, oblongues-lancéolées, de couleur vert grisâtre recouvertes de poils et de glandes sécrétrices d'essences.

Les fleurs sont zygomorphes, bilabiés, rassemblés en glomérules de couleur qui varie du blanc, violet et le rose (Teuscheret *al.*, 2005 ; Dauqan et Abdullah, 2017)(Fig. 1).



Figure 1: *Thymus vulgaris*) Touffe, b) Fleurs, C) Tige et feuilles
(Nieto, 2020 ; Patilet *al.*, 2021)

Selon Dobignard et Chatelain, (2010), la classification botanique de *T. vulgaris* est représentée dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Systématique de *T. vulgaris*

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Neptoidae
Tribu	Menthae
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i>

II. 2. 1. 2. 2. *Thymus serpyllum*

Le *Thymus serpyllum* appelé serpolet, thym rampant ou thym sauvage, est une plante vivace originaire des régions nord et centre d'Europe. Le *T. serpyllum* est un sous-arbrisseau vivace de 5 à 30 cm avec des tiges ligneuses à la base, couchées-radicantes, rampantes de formes gazonnantes. Les feuilles sont ovales (arrondies au sommet et effilées a la base) d'une longueur de 4 à 6 mm, et de 2 à 4mm de large, opposées, glabres sur la surface et le dessous, longuement ciliées a la base et a nervures saillantes. Les inflorescences mesurant 4 à 7cm forment une série le long d'une tige basse avec une couche uniforme de trichomes sur les cotés ; calice poilu ou glabre en dessus. Le serpolet fleurit de Mai à Septembre, les fleurs sont zygomorphes, petites de couleurs roses blanchâtres (Jarić *et al.*, 2015)(Fig. 2).



Figure 2 : *Thymus serpyllum*(Jarić *et al.*, 2015)

La classification botanique de *T. serpyllum* est représentée dans le tableau 2 (Jalas, 1970 ; Marhold et Artonfi, 1998) :

Tableau 2 : Systématique de *T. serpyllum*

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Neptoidae
Tribu	Menthae
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus serpyllum</i>

II. 2. 1. 3. Habitat

Les espèces du genre *Thymus* sont des plantes vivaces aromatiques herbacées qui poussent dans un sol calcaire bien drainé et ensoleillé pour atteindre leur plein potentiel. Le *Thymus vulgaris* pousse abondamment dans des sols caillouteux, légers, secs ou bien drainés en plein soleil à une altitude qui ne dépasse pas les 2500 m (Pitman, 2004).

Le thym sauvage *T. serpyllum* pousse mieux sur un sol sec et pierreux, des landes sablonneuses et dans les prairies (Jarić *et al.*, 2015).

II. 2. 1. 4. Répartition géographique

Le genre *Thymus* est originaire d'Europe, et se cultive dans le bassin méditerranéen, en Asie et Amérique du sud (Nabavi, 2005). Son centre de diversité se trouve dans la région de l'ouest méditerranéen, et représenté principalement par les espèces *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, *Thymus algeriensis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus pulegioides* et *Thymus capitatus*. Le *T. vulgaris* et le *T. serpyllum* ont une forte distribution en sud de l'Europe (Espagne, France, Italie), et au Nord d'Afrique (Abu-Darwish *et al.*, 2009 ; Stéfanaki et Van Andel, 2021). Selon Quezel et Santa, (1962) le genre *Thymus* est représenté par 12 espèces dont 9 sont endémiques dans la flore Algérienne.

II. 2. 1. 5. Composition chimique

La composition chimique des différentes espèces du genre *Thymus* est très complexe. Les principales classes chimiques des huiles essentielles extraites de ce genre sont des terpènes, alcools terpéniques, des dérivés phénoliques, aldéhydes, cétones, éthers et esters. Cette composition varie entre les espèces et selon les chémotypes en fonction des composés dominants dans l'huile essentielle qu'ils soient phénoliques tel que le thymol, cravacol ou non phénoliques tel que le géraniol, bornéol, thujanol, α -terpineol et le *p*-cymène. Les espèces du genre *thymus* contiennent aussi des composés phénoliques non volatils, représentés principalement par les acides phénoliques (acide rosmarinique, caféique) et les flavonoïdes, tanins, saponines (Kosakowska *et al.*, 2020).

II. 2. 1. 6. Usages

Les espèces du genre *Thymus* sont des plantes aromatiques et médicinales utilisées en cuisine et en médecine traditionnelle depuis des milliers d'années dans les pays du bassin méditerranéen. Les huiles essentielles extraites des espèces de ce genre sont très appréciées en raison de leur large spectre d'actions pharmacologiques tel que anti-oxydants, antimicrobiens antifongiques, cytotoxique, antiparasitaires et autres (Salehi *et al.*, 2019).

En médecine traditionnelle, les espèces appartenant au genre *Thymus* sont utilisées par voie orale dans le traitement des troubles respiratoires (asthme, bronchites). Le *Thymus vulgaris* est utilisé dans le traitement de la dyspepsie et d'autres troubles gastro-intestinaux en raison de son effet carminatifet son action spasmolytique qui semble être due au thymol, aussi utilisé pour traiter les infections urinaires. Le Thym est également utilisé a usage externe comme bain de bouche, solution anti-acnés, anti eczéma et anti-stomatites. Le *T.vulgaris*, et *T. algeriensis* sont très utilisés pour traiter les problèmes gynécologiques chez les femmes après l'accouchement surtout en Espagne et en Tunisie tandis que le *T. serpyllum* est très utilisé en Inde pour les troubles menstruelles (Li *et al.*, 2019).

En plus de leur utilisation en médecine traditionnelle, les espèces du genre thymus occupent une grande place en cuisine méditerranéenne où les parties aériennes fraîches ou séchés sont utilisées comme aromatisants pour les viandes, aliments cuits au four et pour les sauces.

Les huiles essentielles du thym en particuliers, sont utilisés comme additifs antimicrobiens alimentaires en raison de leur action bactéricide contres les bactéries pathogènes alimentaires ainsi, réduire les détériorations qui peuvent entrainer une diminution de la qualité des aliments en matière de valeur nutritive et sécurité sanitaire tout en substituant les additifs synthétiques par des composés naturels (Nabavi, 2005).

Chapitre III

Les molécules bioactives des plantes médicinales

III. 1. Généralités

Les plantes aromatiques et médicinales ont la capacité de produire des substances naturelles bioactives très diversifiées appelées « métabolites secondaires ». Ce terme a toujours été utilisé pour désigner les substances qui ne sont pas des « métabolites primaires » (Tiwari et Rana, 2015).

Les métabolites secondaires constituent un groupe très variés de composés organiques synthétisés en petites quantités et qui ne possèdent pas de fonctions directes (photosynthèse, le transport des solutés, synthèse des protéines). Ils sont produits par la majorité des espèces végétales pour faire face au stress biotique et abiotique (défense contre les prédateurs et pathogènes, attire les pollinisateurs, affronter les changements soudains de températures, humidité, intensité lumineuse et sécheresse) (Mera *et al.*, 2019).

III. 2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être classés selon plusieurs critères : la structure chimique, la solubilité et la voie biosynthétique. Cette dernière est la plus couramment utilisée, ainsi les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois grands groupes : composés phénoliques, terpènes et alcaloïdes (Chomel *et al.*, 2016).

III. 2. 1. Composés phénoliques

III. 2. 1.1. Définition

Les composés phénoliques ou polyphénols sont considérés comme les constituants les plus abondants dans les plantes où, plus de 8000 composés ont été identifiés. Leur structure chimique est caractérisée par un ou plusieurs noyaux aromatiques directement liés à un ou plusieurs groupements hydroxyles (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019).

Les composés phénoliques sont présents sous forme libre ou liée. Les phénols libres sont généralement solubles dans un solvant polaire (organique/aqueux). En revanche, les phénols liés interagissent avec des macromolécules tel que la cellulose, protéines, lignine (Wang *et al.*, 2020).

La répartition des polyphénols diffère quantitativement et qualitativement au niveau des différentes parties de la plante, les espèces ainsi que les stades de développement physiologiques (Gracia-Salas *et al.*, 2010).

III. 2. 1.2. Biosynthèse des composés phénoliques

III. 2. 1.2.1. Voie shikimate (acide shikimique)

A partir des sucres simples dérivés du métabolisme des sucres simples, le phospho-énoypyruvate (glycolyse) et l'érythrophosphate-4 (voie pentose phosphate) sont convertis en acide shikimique puis en acide chorismique, précurseur de la synthèse des acides aminés aromatiques. La désamination de ces derniers conduit à l'élaboration des acides hydrocinnamiques (p-coumarique, férulique, caféique et sinapiques) (Ewané, 2012) (Fig. 3).

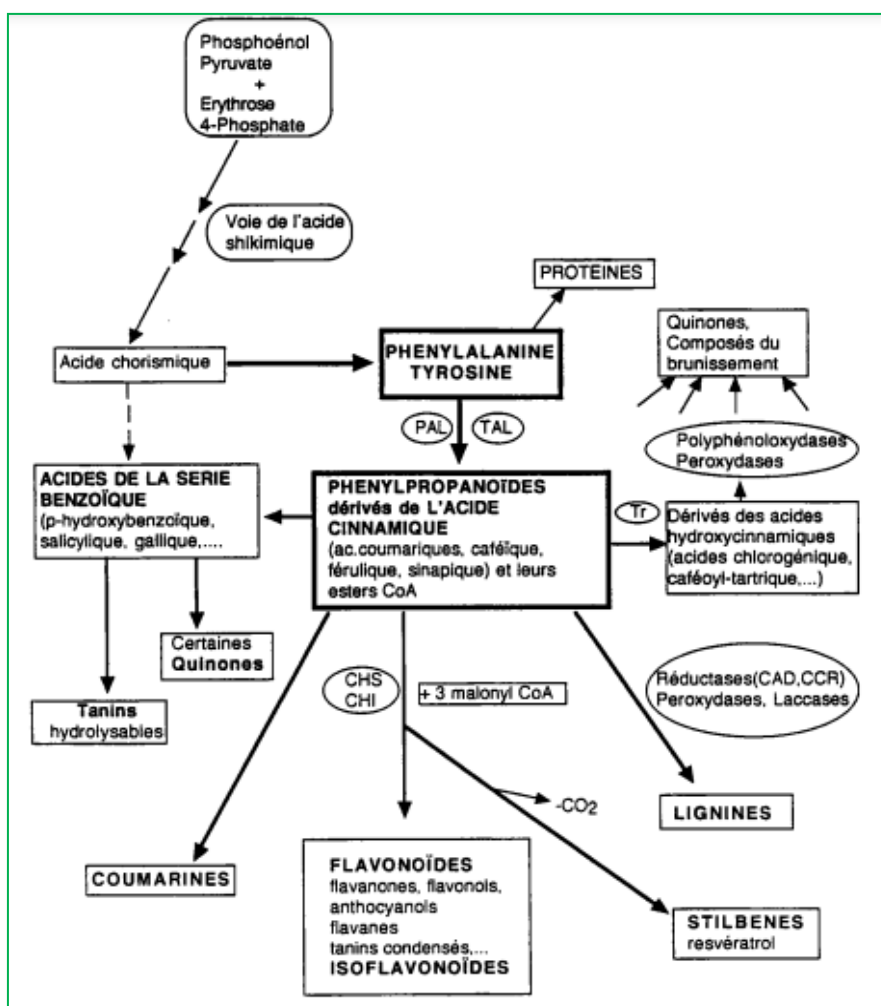


Figure 3 : Schéma représentatif de biosynthèse des composés phénoliques (La voie shikimate) (Macheix, 1996).

Les esters des acides hydrocinnamiques associés au coenzyme A (CoA) conduisent à la formation de différentes classes de polyphénols. La biosynthèse des flavonoïdes est mise en place par un ensemble de réactions (oxydations, hydroxylations, méthylations, glycolisation et réductions) où 3 molécules d'acétyl CoA (**cycle A**) s'associe avec le p-coumaryl CoA (**cycle B**) et l'hétérocycle C formant ainsi la chalcone, la structure de base des flavonoïdes (Richard *et al.*, 1995) (Fig. 3).

III. 2. 1.2.2. Voie des polyacétates

Peu d'acides phénoliques sont produits par cette seconde voie de biosynthèse. Le malonate est fournis après polymérisation de l'acétyl-CoA. La voie malonique conduit à la formation de polyacétates qui peuvent servir de précurseurs pour la synthèse des flavonoïdes (Prinsloo et Nogemane, 2018).

III. 2. 1.3. Classification des composés phénoliques

La classification la plus fréquente est celle basé sur le nombre d'atomes de carbone et de cycles aromatiques disponibles dans la chaîne latérale. Selon ce critère, les polyphénols sont classés en phénols simples et benzoquinones (squelette de C₆), acides phénoliques (C₆-C₁ ou C₆-C₃), flavonoïdes (C₆-C₃-C₆), et tannins ((C₆-C₃-₆)_n) (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

III. 2. 1.3. 1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont définis comme des composés possédant au moins une fonction acide carboxylique avec un ou plusieurs hydroxyles phénoliques (Khoddami *et al.*, 2013).

En se basant sur la position et le nombre des groupements hydroxyles présents sur le noyau aromatique, les acides phénoliques peuvent être divisés en deux classes: les acides hydroxybenzoïques (acide gallique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, syringique et vanillique), et les acides hydroxylés dérivés des acides cinnamiques (acide caféique, férulique, p-coumarique et sinapique) (Ajila *et al.*, 2011).

III. 2. 1.3. 2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques de faible poids moléculaires, où plus de 9000 de leurs dérivés sont associés à diverses activités biologiques (Khalid, 2019). À côté des caroténoïdes et des chlorophylles, les flavonoïdes sont souvent responsables des différentes couleurs des parties de la plante (jaune, orange, rouge et bleu) (Venkateswara Rao *et al.*, 2017).

La structure de base des flavonoïdes est constituée d'un squelette carboné de 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$) distribués sur deux noyaux benzéniques (**A** et **B**) liés par un pont de 3 carbones généralement sous la forme d'un hétérocycle oxygéné **C** (Fig. 4) (Singla *et al.*, 2019).

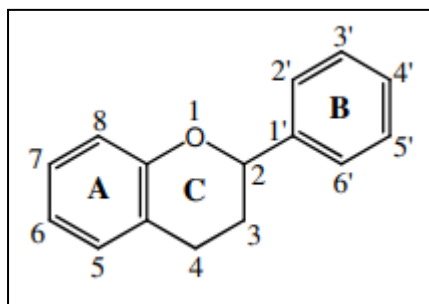


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Singla *et al.*, 2019)

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en flavones, flavanones, flavonols, flavanols, isoflavones et anthocyanidines. Les activités biologiques des flavonoïdes y compris l'activité anti-oxydante dépendent à la fois des variations structurelles ainsi que des schémas de glycosylations (Tsao, 2010; Dai et Mumper, 2011).

III. 2. 1.3. 3. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques non flavonoïdes qui se présentent en structure $C_6C_2C_6$. Le resvératrol est le principal représentant de ce groupe et joue un rôle important en tant qu'agent anticancéreux et dans le traitement des pathologies cardiovasculaires (Giovinazzo *et al.*, 2012).

III. 2. 1.3. 4. Lignanes et lignines

Les lignanes sont des composés phénoliques généralement présents sous formes aglycones (C₆-C₃)₂. L'intérêt pour ces composés est croissant en raison de leur grand potentiel d'utilisations en chimiothérapie (Ignat *et al.*, 2009).

La lignine est un bio-polymère de structure (C₆-C₃)_n formée par polymérisation d'unités de lignanes. C'est un composé très abondant dans le règne des végétaux après la cellulose qui confère au bois sa rigidité. (Lewis *et al.*, 1998).

III. 2. 1.3. 5. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de poids moléculaire élevé (500-3000Da), connus pour leur action défensive contre les herbivores et les pathogènes. Leur présence est responsable du caractère astringent de certains fruits et boissons. Les tanins peuvent être subdivisé en tanins hydrolysables (TH) et tanins condensés (TC) (Hassanpour *et al.*, 2011).

Les tanins hydrolysables contiennent généralement le D-glucose ou autres alcools polyhydriques estérifiés à l'acide gallique (gallotanins) ou à l'acide ellagique (ellagitanins). Tandis que les tanins condensés sont des polymères catéchines formés d'unités de (flavan-3-ol) (Das *et al.*, 2020).

III. 2. 1.4. Méthodes d'extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques dépendent entièrement du temps d'extraction, le choix du solvant (molécules cibles), la température, le pH, la taille des particules du matériel végétal et du rapport échantillon-solvant. Ainsi les conditions d'extraction doivent garantir la protection contre les réactions d'oxydations, dégradations thermiques et modifications biochimiques des extraits obtenus (Das *et al.*, 2020).

III. 2. 1. 4.1. Méthodes classiques d'extraction

La macération est une technique traditionnelle, couramment employée et qui implique la mise en contact du matériel végétale avec le solvant le plus souvent méthanol, éthanol, acétone et eau pendant une période définie avec agitation jusqu'à dissolution de la

matière soluble dans l'échantillon. La solubilité des composés phénoliques dépend de la nature chimique et la polarité des molécules. Cette technique se déroule a température ambiante se qui la rends la méthode de choix pour l'extraction des composés phénoliques thermolabiles (Ajila *et al.*, 2011).

L'extraction par Soxhlet à l'avantage de l'utilisation d'un seul lot de solvant recyclé où le matériau posé dans l'unité d'extraction est continuellement exposé a un solvant frais. Cependant son désavantage qu'elle ne peut pas être employée pour les composés thermosensibles (Azmir *et al.*, 2013). Ces procédés classiques d'extractions sont souvent utilisés mais leurs inconvénients résident dans la consommation élevée de solvants et rendements inferieur.

La décoction et l'infusion sont des méthodes généralement utilisés pour les composés thermostables et aqueux. La décoction consiste à faire bouillir le matériel végétal (les racines et les écorces) avec de l'eau pendant 15 min, tandis que l'infusion se fait par macération de la poudre végétale dans de l'eau chaude bouillie (Azwanida, 2015).

III. 2. 1.4.2. Méthodes alternatives

Ces derniers temps, une demande accrue sur l'application de nouvelles méthodes d'extraction telle que l'extraction par ultrasons (collision entre les particules du matériel végétal et les vagues électromagnétiques), extraction assistée par micro-ondes (radiations électromagnétiques), le fluide supercritique (CO₂) et extraction sous pression. Ces techniques présentent des avantages tel que: un temps d'extraction plus court qui se traduit par une cinétique plus rapide, une consommation réduite en solvants (réduire l'impact de pollution sur l'environnement) et des rendements plus élevés en extraits (Méra *et al.*, 2019).

III. 2.1.5. Dosage et identification des composés phénoliques

Les polyphénols sont majoritairement hydrophiles, ainsi les polyphénols libres (aglycones, glycosides) sont extraits avec de l'eau ou solvants organiques polaires. Cependant les acides phénoliques et les lignanes existent sous forme liés d'où nécessité d'un passage par une hydrolyse acide ou alcaline pour les libérer, simplifier le profil chromatographique et faciliter le dosage et l'identification structurelle des polyphénols (Tsao, 2010).

Plusieurs méthodes de dosage et d'identifications des polyphénols sont utilisées. Le dosage des composés phénoliques d'un extrait reste difficile à réaliser avec une seule technique d'où la nécessité de développer des méthodes basées sur le groupe phénolique

III. 2.1.5.1. La spectroscopie UV/Vis

Les méthodes spectro-photométriques représentent l'une des techniques les plus utilisés pour le dosage des composés phénoliques des végétaux. Les méthodes Folin-Denis et Folin-Ciocalteu sont utilisés pour doser les phénols totaux. Ils sont basés sur réactions de réduction chimiques en présence des composés phénoliques. Bien que ces méthodes soient simples et rapides, elles manquent de sensibilité et de spécificité des composés individuels (Khoddami *et al.*, 2013).

Les méthodes basées sur les réactions des extraits phénoliques avec $AlCl_3$ sont utilisés pour le dosage des flavonoïdes. Concernant le dosage des pro-anthocyanidines et les tanins condensés, la méthode vanilline est utilisé avec la catéchine comme standard (Delgado *et al.*, 2019).

III. 2. 1.5. 2. Les procédés chromatographiques

Il existe différents types de techniques d'isolement, purification et identification des molécules phénoliques tel que la chromatographie sur couche mince CCM, chromatographie sur colonne, chromatographie en phase gazeuse GC, chromatographie liquide haute performance HPLC.

L'HPLC couplée à un détecteur diode (DAD) ou a un détecteur spectrométrique de masse (MS) est l'outil analytique le plus utilisé pour la caractérisation des polyphénols. Le DAD peut recueillir les données spectrales UV/visibles, ainsi l'identification est réalisée par comparaison du temps de rétention avec le spectre du standard. Cependant L'HPLC couplé au détecteur MS est hautement sensible et présente la capacité d'atteindre une grande spécificité en raison de la détection sélective par masse (Chirinos *et al.*, 2008).

III. 2. 1.5. 3. La résonance magnétique nucléaire (MRN)

La résonance magnétique nucléaire (MRN) est une autre méthode spectroscopique puissante qui permet une élucidation structurale des composés phénoliques complexes. Elle est coûteuse et rarement utilisée pour les composés phénoliques. Cependant, elle est plus précise que l'HPLC, donne des informations sur les impuretés et les structures isomériques des composés analysés (Ajila *et al.*, 2011).

III. 2. 2. Les huiles essentielles**III. 2. 2. 1. Définition**

Selon la 7^{ème} édition de la pharmacopée européenne, l'huile essentielle est définie comme « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par un procédé mécanique sans chauffage » (El Asbahani *et al.*, 2015).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés de faible poids moléculaire (moins de 500 Dalton) et qui peuvent contenir jusqu'à 200 molécules différentes qui fonctionnent en synergie. Les huiles essentielles sont généralement liquides volatils de nature lipophiles, incolores ou colorés en jaune pâle. Ils sont solubles dans les solvants organiques et possèdent un indice de réfraction très élevé et une densité inférieure à l'eau (Raut et Karuppayil, 2014).

III. 2. 2. 2. Localisation

Les plantes produisent et stockent des substances dans des structures appropriées sous forme d'essences, résines et gommés. Les essences peuvent représenter jusqu'à 5% de la matière végétale sèche. Ils peuvent être extraits des fleurs (jasmin, roses), bourgeons (girofle), feuilles (thym, eucalyptus, sauge), écorces (cannelle), zeste (agrumes), bois (sandale), rhizomes (gingembre) (Baptista *et al.*, 2020).

III. 2. 2. 3. Composition chimique

Les principaux composants des huiles essentielles peuvent être classés en deux catégories structurelles chimiques distinctes : les terpènes et les phényl-propanoïdes. Ces derniers sont couramment présents dans les huiles essentielles mais en moindre abondance que les terpénoïdes. Ces composés aromatiques sont dérivés du phénylpropane et contiennent une ou plusieurs unités C₆-C₃ (Moghaddam et Mehdizadeh, 2017).

III. 2. 2. 3. 1. Généralités sur les terpènes

Avec plus de 8000 composés, les terpènes / terpenoïdes constituent l'une des plus grandes catégories de produits naturels. Les terpènes sont des hydrocarbures dont la structure de base est constituée d'un nombre variable d'unités isopréniques (C₅H₈)_n. Cependant les terpenoïdes sont des composés possédant le squelette carboné des terpènes isoprène avec des groupes fonctionnels oxydés (Zhou et Pichersky, 2020 ; Mosquera *et al.*, 2021) (Fig. 5).

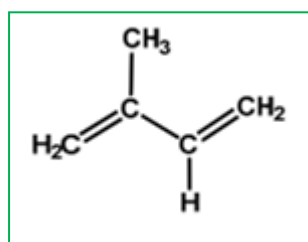


Figure 5 : Unité Isoprène.

Les terpènes et les terpenoïdes sont utilisés par les plantes surtout dans les interactions chimiques et la protection dans l'environnement biotique et abiotique (Tholl, 2015).

III. 2. 2. 3.2. Biosynthèse

La biosynthèse des tous les terpenoïdes débute de deux précurseurs universels : le di-phosphate-isopentyle (IPP) et son isomère le diméthylallyl phosphate (DMAPP). Ces composés sont générés à la fois par la voie (MEP) et (MVA). Ces voies de biosynthèse sont catalysées par différents enzymes permettant ainsi la production des différentes classes de terpenoïdes (Abdallah et Quax, 2017).

III. 2. 2. 3.3. Classification des composés terpéniques

La classification des terpènes et des terpenoïdes est basée sur le nombre et le réarrangement des atomes de carbone dans les molécules (Fig.6) (Mosquera *et al*, 2021).


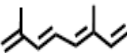
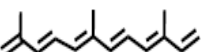
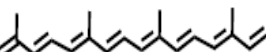
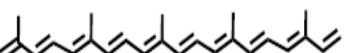

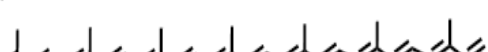

CLASSIFICATION	CARBON ATOMS (Isoprene Units)	CHEMICAL STRUCTURE
Hemiterpenes	5 (1)	
Monoterpenes	10 (2)	
Sesquiterpenes	15 (3)	
Diterpenes	20 (4)	
Sesterterpenes	25 (5)	
Triterpenes	30 (6)	
Sesquaterpenes	35 (7)	
Tetraterpenes	40 (8)	

Figure 6: Classification des terpènes selon le nombre d'unités isoprène (Mosquera *et al*, 2021).

- **Les hémiterpènes**

Les hémiterpènes sont des composés d'une seule unité isoprène C_5H_8 . Ils sont volatils et se trouvent couramment dans l'atmosphère émis par les feuilles comme produit naturel. Leur rôle semble être lié à la protection dans les conditions de stress (températures élevées ou excès d'absorbance de lumière) (Ryan *et al*, 2014).

- **Les monoterpènes**

Les monoterpènes comprennent deux unités isoprènes $C_{10}H_{16}$. Ils se caractérisent par leur odorat et arôme. Les monoterpènes peuvent être acycliques ou aliphatiques (myrcène, geraniol, lavandulol, linalool), monocyclique (limonène, thymol, eucalyptol) et bicyclique (thujone, camphre) (Singh, 2007).

- **Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes sont des composés de trois unités d'isoprène $C_{15}H_{24}$. Ils peuvent être de formes linéaire (nérollidol, farnesol), monocyclique (zingibène), bicycliques (caryophyllène) et tricycliques (thujopsène) (Mosquera *et al*, 2021).

- **Les diterpènes**

Les diterpènes se composent de quatre unités isoprénique $C_{20}H_{32}$ et peuvent être linéaire, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques et macrocycliques. Ces composés possèdent des actions pharmacologiques de l'ordre anti-inflammatoire, cardiovasculaire, anti-tumoral et antimicrobien (Lanzotti, 2013).

- **Les sesterpènes**

Les sesterpènes se composent de 5 unités isoprène ($C_{25}H_{40}$). Ils se présentent sous divers formes, allant de la forme linéaire jusqu'au macrocycliques (Liu *et al.*, 2007).

- **Les triterpènes**

Les triterpènes sont constitués de six unités isoprène $C_{30}H_{48}$. Ils se caractérisent par la présence de groupes méthyliques. L'acide oléanique, pardinols, sitostérol et campestérol sont des exemples de triterpenoïdes (Harborne, 1999).

- **Les tétraterpènes**

Les tétraterpènes sont des composés à huit unités isoprène $C_{40}H_{64}$, et qui comprennent les pigments caroténoïdes liposolubles (β -carotène et lycopène) et leur analogues oxygénés les xanthophylles (lutéine, astaxanthine). Ils possèdent un grand pouvoir antioxydant et un rôle photo-protecteur leur est attribué (Huang *et al.*, 2012).

- **Les polyterpènes**

Les polyterpènes sont des composés polymériques constitués de plus de 8 unités isopréniques tel que le caoutchouc (Ludwiczuk *et al*, 2017).

III. 2. 2. 4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différents procédures d'extraction existent pour la récupération des huiles essentielles. Ces méthodes et conditions d'extraction peuvent affecter la composition chimique de ces huiles. De ce fait, le choix de la méthode appropriée et l'optimisation des techniques font partie des facteurs importants pour produire une huile essentielle présentant les caractéristiques des composants d'origine. Par conséquent, de nouvelles procédures d'extraction sont récemment proposées comme alternative aux méthodes classiques fastidieuses (Pateiro *et al.*, 2018).

III. 2. 2. 4. 1. Méthodes d'extractions conventionnelles

▪ La distillation

Le principe de la distillation repose sur la caractéristique des huiles essentielles d'être volatils sous l'action de la chaleur.

- L'hydrodistillation : est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée, dans la quelle le matériel végétale est en contact direct avec l'eau en ébullition. Les vapeurs se condensent et les huiles essentielles se séparent par décantation. Cette méthode présente plusieurs inconvénients tels que de longs temps d'extraction, qui pourraient favoriser l'hydrolyse des composés thermolabiles et production de composés indésirables.

- L'entraînement par la vapeur d'eau : est une méthode qui repose sur le même principe de l'hydrodistillation avec la différence que le matériel végétale n'est pas en contact direct avec l'eau se qui minimise les altérations hydrolytiques (El Asbahani *et al.*, 2015).

▪ Extraction par les solvants

Cette méthode est utilisée pour l'extraction de certaines huiles qui ont une densité proche de l'eau. Elle est basée sur l'épuisement du matériel végétal par un solvant volatil, et après traitement le produit obtenu appelé « absolu » est proche d'une huile essentielle. Ce procédé d'extraction présente des contraintes tels que la non sélectivité des produits (extraction d'huiles fixes, cires,...) d'où la nécessité du passage d'un traitement de purification, aussi la toxicité des solvants présents dans les extraits sous formes de résidus (Bruneton, 1999).

- **L'expression**

La pression à froid est la méthode courante pour l'extraction des huiles essentielles du zeste d'agrumes. Pendant l'extraction les sacs d'huiles se brisent et libèrent les huiles essentielles. Ce procédé mécanique permet la production d'une émulsion aqueuse d'où les huiles essentielles sont récupérées après centrifugation (Ferhat *et al.*, 2007).

III. 2. 2. 4. 2. Méthodes d'extractions innovantes

Un des inconvénients des techniques d'extraction conventionnelles est lié aux modifications chimiques des huiles essentielles par l'action des températures élevées et les temps longs d'extraction appliqués. Ainsi, les nouvelles techniques doivent garantir une réduction de temps, de consommation d'énergie et de solvants.

- **L'extraction par fluides supercritiques**

L'extraction par les fluides supercritiques est une technique qui utilise le CO₂ comme solvant inerte pour la séparation des composés volatils. La température utilisée avoisine les 35°C permettant ainsi l'extraction des composés sensibles à la chaleur. Les extraits obtenus sont réputés d'être purs, de haute qualité et de grande similitude avec les arômes d'origines des plantes. Bien que cette technique est coûteuse sur le plan économique mais elle est efficace et qualifiée d'être respectueuse de l'environnement (Sharif *et al.*, 2014).

- **L'extraction par micro-ondes**

L'extraction par micro-ondes est une technique qui combine entre le chauffage par micro-onde, l'extraction classique au solvant et l'hydro-distillation. Elle offre une haute reproductibilité avec une manipulation simplifiée, délais plus courts et une consommation réduite en solvants (Koubaa *et al.*, 2016).

III. 2. 2. 5. Méthodes d'Identification des huiles essentielles

La chromatographie en phase gazeuse GC est généralement la technique analytique la plus utilisée où les composants volatils sont séparés sur des colonnes de silices avec différentes phases stationnaires.

L'identification des composants est basée sur des données chromatographiques (indice de Kovats, indice de rétention linéaire) obtenus à partir d'un détecteur (FID), ou par des données spectrales de masse (MS). La combinaison GC-MS est la plus utilisée où dans les spectromètres de masses (MS), les composants sortant de la colonne capillaire du GC sont ionisés par impact électronique ou ionisation chimique ainsi les molécules chargées et les fragments moléculaires sont sélectionnés en fonction de leur masse à charge m/z . Les chromatogrammes obtenus fournissent des informations sur les temps de rétention de chaque composé ainsi leur spectre de masse (Smelcerovic *et al.*, 2013).

La chromatographie liquide haute performance HPLC est peu utilisée pour l'analyse de l'huile essentielle mais elle peut être utile pour l'identification des composés non volatils. La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur Fourier Transform Infra Red spectroscopy (GC-FTIR) est utilisée pour la différenciation des isomères présentant des spectres de masses étroitement semblables. L'analyse des mélanges complexes des huiles essentielles par la technique de résonance magnétique nucléaire (MRN) est limitée de part sa faible sensibilité, grand nombre de signaux et leurs chevauchements ainsi la difficulté de couplage GC-MRN (Dugo *et al.*, 2005).

III. 2. 3. Les alcaloïdes**III. 2. 3. 1. Définition**

Les alcaloïdes représentent un groupe de composés à faible poids moléculaire contenant un ou plusieurs atomes d'azote et qui sont généralement basiques. Plusieurs rôles ont été attribués aux alcaloïdes, la plupart liés à l'autoconservation, la communication et l'inhibition des compétiteurs (Evans, 2009; Cushnie *et al.*, 2014).

Les alcaloïdes sont hautement toxiques bien qu'ils aient des effets thérapeutiques marqués en faibles quantités. Plusieurs actions pharmacologiques ont été rapportés tel que antipsychotique, antidiurétique, antinéoplasiques, hépato-protecteur (morphine, codéine, éphédrine) et certains sont de puissants poisons et drogues (cocaïne) (Fett-Neto, 2015).

III. 2. 3. 2. Biosynthèse des alcaloïdes

Les alcaloïdes dérivent dans la majeure partie d'acides aminés (ornithine, tyrosine, lysine, tryptophane). La biosynthèse des alcaloïdes commence par transformation des acides aminés par réactions de décarboxylations ou désaminations puis suivis par d'autres étapes de méthylation, hydroxylations et/ou couplés avec d'autres composés (Yang *et al.*, 2016).

Deux schémas généraux caractérisent la voie de biosynthèse des alcaloïdes :

- 1- A partir du phspho-énolpyruvate qui via la voie shikimate va fournir des acides aminés aromatiques, qui conduisent aux alcaloïdes.
- 2- A partir du cycle de krebs qui fournit des acides aminés aliphatiques contribuant a la production des alcaloïdes.

III. 2. 3. 3. Structures et classification des alcaloïdes

En se basant sur l'arrangement phytochimique et leur origine par rapport aux acides aminés, les alcaloïdes peuvent êtres classés en :

- **Alcaloïdes non-hétérocycliques (proto-alcaloïdes)** : Dérivent d'une acide amine, cependant l'atome d'azote ne fait partie du système hétérocyclique (adrénaline, éphédrine).
- **Alcaloïdes hétérocycliques (alcaloïdes typiques)** : Dérivent d'acides aminés et présentent un hétérocycle azoté (atropine, nicotine).
- **Pseudo-alcaloïdes** : Sont des composés qui ne proviennent pas d'acides aminés tels la caféine et la théobromine (Evans, 2009; Roy, 2017).

Chapitre IV

Stress oxydatif et activités biologiques

IV. 1 Stress oxydatif et antioxydants**IV. 1 .1. Introduction**

Les différents processus biologiques tels que la respiration, la digestion des aliments, le métabolisme des médicaments et la transformation des graisses en énergie produisent des composés appelés radicaux libres. Ces derniers sont généralement détruits par le système antioxydant naturel. Si ce système ne s'adapte pas correctement, les radicaux libres peuvent déclencher un stress oxydatif (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

IV. 1.2. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est un phénomène qui résulte suite à un déséquilibre entre les oxydants produits en excès et les capacités du système de défense antioxydant conduisant ainsi à un processus nocif qui peut affecter certain nombre de structures cellulaires tel que les membranes, les protéines, les lipides et l'ADN (Butterfield et Halliwell, 2019).

Ce déséquilibre favorisera l'apparition d'une multitude de maladies chroniques et dégénératives, d'accélérer le processus du vieillissement du corps avec émergence de pathologies aiguës tel l'accident vasculaire cérébrale AVC (Pizzino *et al.*, 2017).

IV. 1.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être définis comme des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbite externe (Liguori *et al.*, 2018). Le nombre impair d'électrons les rends instables et très réactifs et peuvent extraire les électrons d'autres molécules pour parvenir à leur stabilité en rendant la molécule attaquée elle-même en état radicalaire et ainsi déclencher des réactions en chaîne qui peuvent provoquer des dommages moléculaires associés dans les cellules (Phaniendra, 2014).

IV. 1.3. 1. Les espèces réactives

Les radicaux libres qui interviennent dans le phénomène du stress oxydant possèdent les caractéristiques d'avoir un électron libre sur l'atome d'oxygène ou de l'azote d'où la dénomination d'espèces réactives à l'oxygène ERO et espèces réactives à l'azote ERN (Weidinger et Kozlov, 2015).

En fonction de leur concentrations relatives, la production des espèces réactives ne se limite pas aux impacts nocifs, mais ils sont impliqués également dans la production d'énergie, la défense immunitaire et dans le processus de signalisation (Genestra, 2007).

IV.1.3. 1. 1.Espèces réactives à l'oxygène

Les espèces réactives à l'oxygène ERO sont des composés issus du métabolisme aérobie (Fig. 7). Ils sont hautement réactifs et peuvent être de nature radicalaire tel le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl (OH^{\cdot}), alkoxyl (R^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}) et non radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), (1O_2) et l'ozone (O_3) (Poprac *et al.*, 2017).

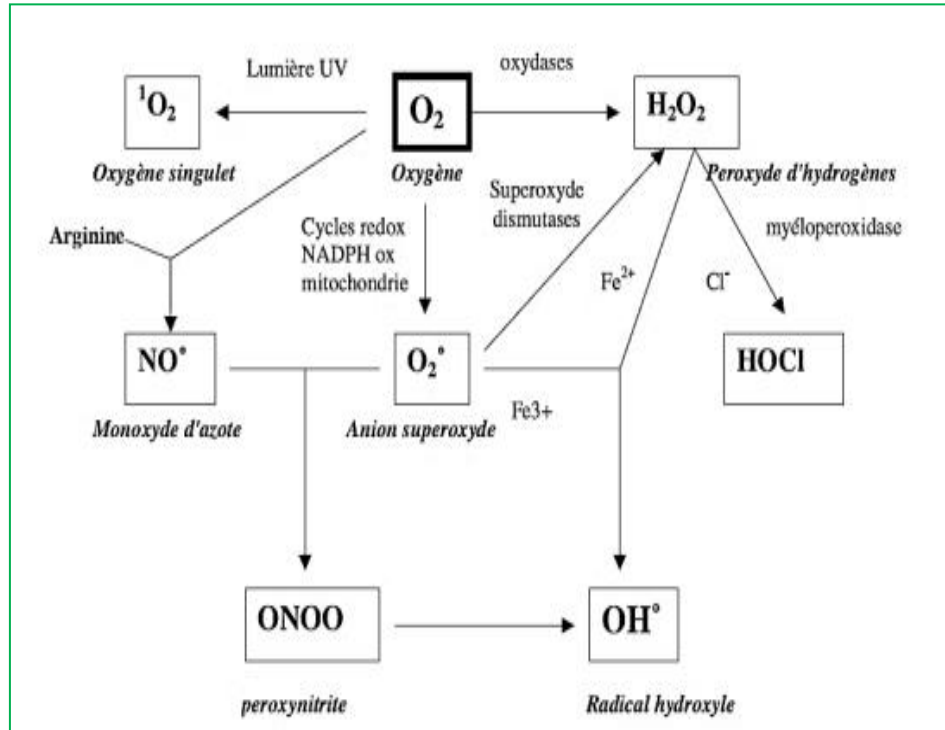


Figure7: Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène (Favier, 2003).

IV.1.3. 1. 2. Espèces réactives à l'azote

Les espèces réactives à l'azote ERN sont représentées par l'oxyde nitrique (NO[•]) et le dioxyde d'azote (NO[•]₂), qui possèdent des électrons non appariés et sont considérés comme des radicaux libres. Cependant les formes non radicalaires sont représentés par HNO₂ et N₂O₄ (Evans et Halliwell, 2001).

IV. 1 .3. 2. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont générés à la fois par des sources endogènes et exogènes. Les radicaux libres endogènes représentent des sous-produits naturels du métabolisme cellulaire de l'oxygène produits en continu par des réactions enzymatiques et non enzymatiques.

Les réactions enzymatiques au niveau de la mitochondrie, produisent environ 90 % des ERO. En moindres quantités, ils sont produits au niveau de la chaîne de transfert des électrons du réticulum endoplasmique (Cytochrome P450), les réactions d'oxydations dans les peroxysomes, la phagocytose, ainsi que les réactions catalysés par la transition des métaux (Fer et le cuivre) (Skulachev, 2012 ; Santo *et al.*, 2016).

Les radicaux libres exogènes sont produits sous l'effet d'oxydants environnementaux tels les rayons UV, la pollution de l'air et de l'eau, les métaux lourds, le tabac et d'alcool, les pesticides et herbicides, et en chimiothérapie (Thanan *et al.*, 2014).

IV. 1.4. Effets du stress oxydatif sur l'organisme**IV. 1.4.1. Effets moléculaires****➤ L'ADN**

Les ERO et ERN interagissent avec l'ADN provoquant des mutations. Le radical libre OH[•] provoque des alternances avec rupture des doubles et simples brins de l'ADN. Le peroxy-nitrite (ONOO⁻) peut provoquer des lésions au niveau de l'ADN (8-nitroguanine) impliqués dans les cancérogénèses. Ce dernier est considéré comme un biomarqueur de l'inflammation due au stress oxydatif (Valko *et al.*, 2007 ; Thanan *et al.*, 2014).

➤ Les lipides

La peroxydation lipidique est un ensemble de réactions en chaîne entre les radicaux libres ERO et ERN avec les lipides de la membrane cellulaire spécialement les acides gras polyinsaturés. Cette réaction conduit à la formation du radical (LOO[•]) (Galleli *et al.*, 2018).

Le radical hydroxyl OH[•] est le principal radical impliqué dans la réaction de peroxydation lipidique. Cette dernière peut altérer la structure et le fonctionnement de la membrane et engendrer la lyse cellulaire (Ramana *et al.*, 2017).

➤ Les Protéines

Les acides aminés les plus susceptibles à l'oxydation sont la cystéine, méthionine, arginine et histidine (Rasool *et al.*, 2019). L'oxydation des protéines peut induire la formation de produits très réactifs y compris le sulfoxyde-méthionine et des carbonyles de protéines. Ces derniers sont utilisés comme bio-marqueurs du stress oxydatif et dont leur formation irréversible affecte la fonction protéique (processus de signalisation) (Avery, 2011).

IV. 1.5. Pathologies associées**IV. 1 .5. 1. Maladies neurodégénératives**

Étant le cerveau une partie qui consomme 20% en plus d'oxygène et d'antioxydants que d'autres parties du corps ainsi que sa richesse en acides gras polyinsaturés, il est une cible aux réactions de peroxydations lipidiques (Singh *et al.*, 2019).

Le dysfonctionnement et perte progressive de certains neurones spécifiques avec agrégation des protéines conduit à l'apparition de maladies neurologiques telles que Parkinson et l'Alzheimer. Ce dernier est une maladie incurable (perte de mémoire et démence) est induite par l'accumulation de la protéine β amyloïde formant des plaques séniles. La génération de la protéine β amyloïde est étroitement liée au stress oxydatif par les radicaux libres (ERO) (Biswas et Banejee, 2017).

IV. 1 .5. 2. Le cancer

Le stress oxydatif est particulièrement lié au processus de la carcinogenèse qui est le résultat d'une régulation incontrôlée des oncogènes, et des suppresseurs de tumeurs suite à l'oxydation de l'ADN cellulaires par les espèces (ERO). Ces derniers peuvent endommager l'ADN par modifications et suppression de base, entrainement de l'arrêt de la transcription, modification d'induction et des réplifications et rupture des brins (Valko *et al.*, 2004).

IV. 1 .5. 3. L'athérosclérose

Le stress oxydant est étroitement lié au dysfonctionnement vasculaire (perturbation de l'homéostasie vasculaire) et joue un rôle important dans l'apparition d'un grand nombre de maladies cardiovasculaires tel l'athérosclérose (Cervantes *et al.*, 2017).

IV. 1 .5. 4. Diabète type 2

Le diabète non insulino-dépendant (type 2) est dû à un dysfonctionnement métabolique glucidique provoquant une moindre absorption du glucose au niveau des tissus et ainsi élévation du taux de glucose sanguin. L'hyperglycémie est souvent associée à une production massive d'ERO. Les radicaux super-oxydes et les NO engendrent des changements de structure et de fonction des lipides et protéines induisant des peroxydations et des glycoxydations responsables d'hyperglycémies chroniques (Bajaj et Khan, 2012).

IV. 1 .5. 5. Théorie radicalaire de vieillissement

Le vieillissement de l'âge s'accompagne avec une accumulation des radicaux libres responsables d'un stress oxydatif chronique qui affecte spécialement le système immunitaire, nerveux et endocrinien (Bokov et Ricardson, 2004).

IV. 1 .5. 6. L'inflammation

La réponse inflammatoire s'accompagne toujours d'une production d'espèces réactives ERO et ERN par les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles activés dans le milieu inflammatoire. Le peroxyde d'hydrogène peut déclencher une inflammation par activation du facteur de transcription NF- κ B qui est un facteur de grande importance dans l'induction de l'inflammation (Biswas, 2016).

IV. 1 .6. Les antioxydants**IV. 1. 6. 1 Définition**

Les antioxydants sont des molécules de complexité variables, capables à de faibles concentrations d'inhiber, ralentir ou supprimer les dégâts oxydatifs. Ils possèdent l'habilité à convertir le radical libre en un radical stable sans devenir eux-mêmes des radicaux libres en sacrifiant leur électrons (Qaid *et al.*, 2020).

Les antioxydants jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense chez l'être humain par protection contre la production excessive d'espèces réactives et les dégâts que peuvent engendrer (Ayoub et Mehta, 2018).

En industrie pharmaceutique et agroalimentaire, les antioxydants permettent de piéger les radicaux libres et d'augmenter la durée de conservation des produits en retardant les processus de peroxydations lipidique. Selon leur mode d'actions, les antioxydants peuvent être classés en : piégeurs de radicaux libres, briseurs des réactions en chaîne d'oxydation (α tocophérol), chélateurs de métaux (transferrine et ferritine), réducteurs de concentrations d'espèces (Glutathion) (Ifeanyi, 2018).

IV. 1 .6. 2. Sources d'antioxydants**IV. 1 .6. 2.1. Antioxydants endogènes****• Antioxydants enzymatiques et non enzymatique**

Les antioxydants non enzymatiques sont représentés par le glutathion, l'histidine dipeptide et l'acide urique. Ce dernier représente un des puissants antioxydants du plasma (Johnson *et al.*, 2009). Les systèmes enzymatiques interviennent dans la régulation du stress oxydatif, en neutralisant rapidement les ERO tel que la (SOD), Catalase et la (GSH-Px) (Johnson *et al.*, 2009).

IV. 1 .6. 2.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont rapportés à l'organisme principalement via l'alimentation. Ils sont identifiés comme phyto-nutriments et représenté par les vitamines, les polyphénols et les oligo-éléments. Ces composés ont la caractéristique d'être de faibles poids moléculaires par rapport aux antioxydants enzymatiques ce qui leur permet de pénétrer et atteindre facilement les molécules cibles et ainsi réduire les effets du stress oxydatif (McCall et Frei, 1999 ; Nkhili, 2009).

• Les vitamines

La vitamine E (alpha-tocopherol) est une vitamine liposoluble, possédant des propriétés antioxydantes dans les milieux lipidiques (membranes plasmiques et les lipoprotéines) par l'inhibition des processus peroxydations lipidiques (Wang et Quinn, 2006).

La vitamine C, ou L-acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble qui joue un rôle primordiale dans la prévention des réactions d'oxydations dans les fluides extracellulaires et le plasma. Elle agit directement par piégeage d'ERO et d'ERN et indirectement par son action régénératrice de la vitamine E (Koolman *et al.*, 1999).

La vitamine A est une vitamine soluble dans les milieux lipidiques et se divise en deux groupes : les rétinoïdes et les provitamines A (β -carotène). Ces derniers, par leurs propriétés lipophiles, inhibent des réactions de peroxydations lipidiques (Godicet *et al.*, 2014).

• Les oligo-éléments

Les oligo-éléments agissent indirectement sur les radicaux libres ERO comme cofacteurs des réactions enzymatiques (SOD, glutathion et la catalase). Ils sont représentés par : le sélénium, le cuivre, le zinc, le manganèse (Maares et Haase, 2016).

• Les polyphénols et leurs mécanismes d'actions :

Les polyphénols de par leur grande diversité moléculaire, neutralisent les oxydants par différents processus. Les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les composés qui contribuent le plus dans l'activité antioxydante. Ils peuvent agir comme agents réducteurs en piégeant les radicaux libres (soit par transfert d'électrons, donation d'atomes d'hydrogène), par chélation des ions métalliques et par inhibitions enzymatiques (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2016).

Les composés phénoliques interagissent fortement avec les protéines et réduisent le stress oxydatif en inhibant les enzymes qui catalysent les réactions d'oxydations (NADPH oxydase, p-Kinase C et la xanthine oxydase) dans la chaîne de transfert d'électrons intracellulaires (Procházková *et al.*, 2011). L'activité antioxydante de la quercétine est due à une inhibition irréversible par liaisons entre ces dérivés oxydés (quinone) et l'enzyme lipo-oxygénase (Chebil, 2006).

La structure chimique des composés phénoliques leur confèrent une forte aptitude à piéger les radicaux libres. Le mécanisme de piégeage de ces derniers peut être effectué soit par le transfert d'électron qui est arraché de l'antioxydant et fixé sur le radical libre ainsi, l'antioxydant devient un radical cation, soit par le processus du transfert d'atome d'hydrogène de l'antioxydant phénolique vers le radical libre et qui va permettre l'obtention du radical réduit en RH et l'antioxydant en forme oxydée moins réactif (Shang *et al.*, 2015; Martinez-Gomez *et al.*, 2020)(Fig. 8).

Les flavonoïdes grâce à leur structure 3, 4 dihydroxy sont considérés comme excellents donneurs d'atomes d'hydrogène. Aussi une autre manifestation de l'activité antioxydante des polyphénols a été enregistrée par les composés appartenant au groupe des flavones qui agissent dans la restriction de la génération de l'oxyde nitrique NO[•] et acide hypochloreux responsables du stress oxydatif (Lipinski *et al.*, 2017).

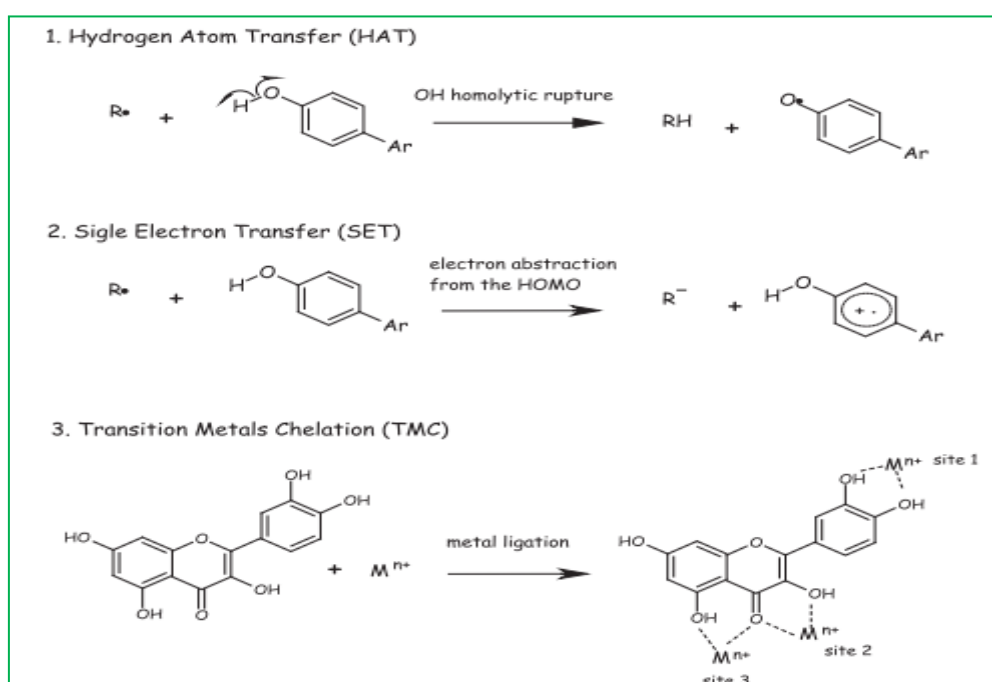


Figure 8: Mécanismes d'action des antioxydants (Léopoldini *et al.*, 2011).

Les antioxydants phénoliques sont des molécules ayant le pouvoir d'être des chélateurs d'ions de transition métalliques (Fig.8). Le Fer et le cuivre ont la capacité de générer à partir de l' H_2O_2 des radicaux hydroxyles très réactifs par la réaction Fenton. Ainsi la chélation de ces métaux de transition inhibe cette réaction dans les milieux biologiques. Les groupes catéchols et gallols sont considérés comme d'excellents chélateurs d'ions de fer (Bouguerne, 2012) (Fig.9).

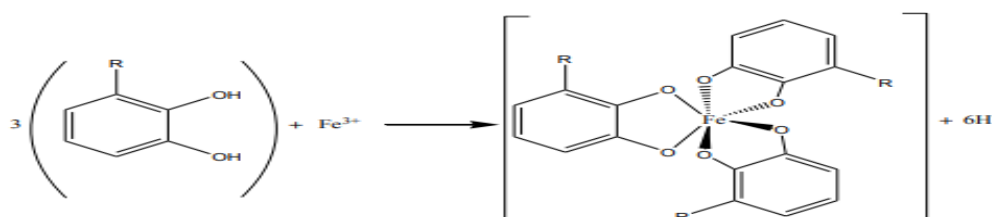


Figure 9 : Complexe fer- polyphenol (Gallol R= OH, Catéchols R= H)
(Perron et Brumaghim, 2009).

IV. 2. Inflammation et anti-inflammatoires

IV.2.1. Généralités

L'inflammation est une réaction suite à une agression par un agent pathogène afin de le neutraliser et réparer les tissus lésés. En cas d'infection, elle permet d'établir une mémoire immunitaire ainsi, obtenir une réponse plus rapide et plus spécifique à l'agent pathogène en cas de future rencontre. Les réactions inflammatoires sont protectrices cependant si elles se développent de façons inappropriées ou après persistance et agressivité de l'agent pathogène, elles peuvent être nocives (Fullerton et Gilroy, 2016).

Les sources d'inflammations peuvent être physiques (brûlure, piqure, coupure, traumatisme, radiations), chimiques (acides, bases et gaz) ou biologiques tel que des agents microbiens, virus, allergènes et maladies auto-immunes provoqués par les résultats des réactions immunitaires (anticorps cytotoxiques et cytokines) (Reuter *et al.*, 2010).

IV.2.2. Types d'inflammation**IV.2.2. 1. Inflammation aigue**

L'inflammation aigue est une réaction rapide et dynamique qui se traduit par quatre symptômes : la chaleur, la douleur, la rougeur et la tuméfaction. Elle se déroule en trois phases distinctes:

- **Phase initiale :**

Caractérisée par une vasoconstriction rapide et une vasodilatation des vaisseaux à calibres fins. Lors de cette phase, les cellules inflammatoires (macrophages et mastocytes) sont activées et vont permettre la libération des cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires. Les cytokines et les PN neutrophiles libérés vont agir sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins augmentant ainsi l'afflux local du sang, responsable de la rougeur et de la chaleur (Noack et Kolopp-Sarda, 2018).

- **Phase cellulaire**

Se manifeste par le recrutement des cellules leucocytaires. L'engagement des PN neutrophiles vers le foyer inflammatoire va permettre la libération d'enzymes hydrolytiques et la phagocytose. Les lymphocytes qui portent des récepteurs antigéniques vont permettre la captation et l'élimination de l'agent pathogène (Weil et Batteux, 2003).

- **Phase de résolution**

Au cours de laquelle, la maîtrise de l'agent agresseur rend fin à la réaction inflammatoire. L'opération de phagocytose va permettre le nettoyage des débris cellulaires, aussi la réparation des tissus. La sécrétion et l'action des médiateurs inflammatoires vont être inhibés et remplacés par des cytokines anti-inflammatoires ainsi, la réaction inflammatoire est en phase de résolution (Serhan *et al.*, 2007).

IV.2.2. 2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique peut être définie comme une persistance et évolution de l'inflammation à une durée supérieure à six semaines. Elle est conduite suite à une dysrégulation de la balance d'homéostasie tissulaire (recrutement, migration et la mort des cellules impliqués dans la réaction inflammatoire) (Noack et Kolopp-Sarda, 2018).

L'inflammation chronique s'oppose à l'inflammation aiguë dans les points suivants :

- Les phases vasculaires et cellulaires coexistent tout au long de la réaction inflammatoire contrairement à l'inflammation aiguë où ses phénomènes se succèdent.
- L'infiltrat cellulaire persiste dans le site inflammatoire contribuant à l'hyperplasie et à des destructions tissulaires plus graves (hypertrophie des cellules endothéliales et des fibres musculaires des vaisseaux) ayant des conséquences fonctionnelles sur certains organes.
- Dans l'inflammation chronique les macrophages sont aux premiers rangs contrairement à l'inflammation aiguë où le rôle primordial est conféré aux polynucléaires neutrophiles.
- La phase de réparation fait appel aux fibroblastes et les cellules endothéliales qui vont produire un tissu cicatriciel riche en collagène qui est loin de remplacer les propriétés anatomiques et fonctionnelles du tissu initial (Weil et Batteux, 2003).

IV. 2.3. Les cellules et médiateurs de l'inflammation

Les cellules de l'inflammation sont représentées par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Ajoutant aussi les éosinophiles, les mastocytes, les fibroblastes et les plaquettes (Larsen et Henson, 1983).

Les médiateurs de l'inflammation sont résumés et représentés par l'histamine et la sérotonine qui sont responsables de vasodilatation et l'accroissement de la perméabilité vasculaire. Aussi les prostaglandines, leucotriènes qui favorisent l'œdème et l'afflux leucocytaire. Les cytokines et chimiokines jouent un rôle dans les communications intercellulaires lors du processus inflammatoire (Weil et Batteux, 2003).

IV. 2. 4. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires appartiennent à des classes chimiques différentes et sont souvent doués d'activités antipyrétiques et antalgiques périphériques. Leur mode d'action est symptomatique et permet d'empêcher la transformation de l'inflammation aiguë en inflammation chronique (Muster, 2005).

IV. 2. 4. 1. Anti-inflammatoires conventionnels

Les anti-inflammatoires sont répartis en fonction de leur mode d'action en :

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

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent une classe de médicaments les plus utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgiques, et antipyrétiques. Les AINS inhibent la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂) sous l'action de la cyclooxygénase (COX), impliquant ainsi l'inhibition de la production des prostanoides (PGE₂ dans le monocytes, thromboxane B₂ dans les plaquettes et prostacycline de l'endothélium)(Fig.10)(Blain *et al.*, 2000).

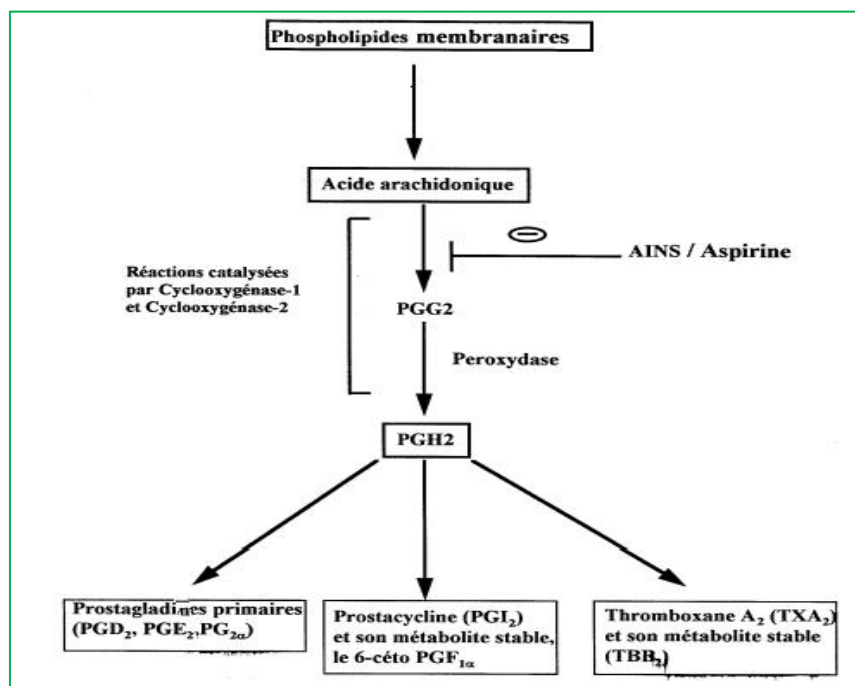


Figure 10 : Schéma représentatif de la biotransformation de l'acide arachidonique sous l'action de la cyclooxygénase (Blain *et al.*, 2000).

Les effets thérapeutiques bénéfiques des AINS sont limités particulièrement, l'aspirine par l'émergence d'effets délétères indésirables qui touchent principalement le système digestif (ulcères gastriques), rénale et nerveux (Céphalée et vertige).

La cyclooxygénase se présente sous deux formes (COX-2) inductible, impliqué dans le processus inflammatoire et la (COX-1) constitutive, intervient dans l'équilibre de l'homéostasie vasculaire et surtout dans la protection de la muqueuse gastrique. De ce fait l'action non spécifique des AINS par inhibition de la (COX-1) contribue à l'apparition des effets indésirables de ces médicaments (Tréchet et Jouzeau, 2014).

Parmi les AINS les plus utilisés en thérapies de polyarthrites rhumatoïdes on trouve l'aspirine, feldène, les dérivés indoliques et les dérivés propioniques (Profénid) (Sany, 2003).

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

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes sont des analogues ou précurseurs de la cortisone secrétés par les glandes surrénales utilisés en particulier en cas d'inflammation chronique tel que la polyarthrite rhumatoïde et aussi pour son action antiallergique et immunosuppressive en cas de maladies auto-immunes.

A l'opposé des AINS, les AIS ont la capacité d'inhiber tous les phénomènes cellulaires de la réaction inflammatoire, par leur effet antiprolifératif des cellules de l'inflammation (diminution de leur migration vers le site inflammatoire), diminution de la production des médiateurs inflammatoires et aussi par leur action directe sur les vaisseaux (diminution de la perméabilité capillaire) (Muster, 2005).

IV. 2. 4. 2. Les anti-inflammatoires naturels

Les AINS et les glucocorticoïdes représentent une grande classe de médicaments présents sur le marché, mais tous présentent des toxicités, irritations du tractus gastro-intestinal et un dysfonctionnement hépatique et rénal. De ce fait, la recherche de produits naturels à action anti-inflammatoire est en croissance permanente. En médecine traditionnelle, depuis longtemps les produits naturels ayant des activités anti-inflammatoires ont été utilisés pour traiter la douleur, la fièvre et les maladies articulaires (Yuan *et al.*, 2006).

La complexité des extraits naturels leur permet un mécanisme d'action synergique. Les composés phénoliques exercent une action anti-inflammatoire de façon subtile (moins d'effets indésirables) et exécuté par une variété d'activités inhibitrices plutôt que d'exercer une action a une étape unique comme les médicaments conventionnels (Fig.11).

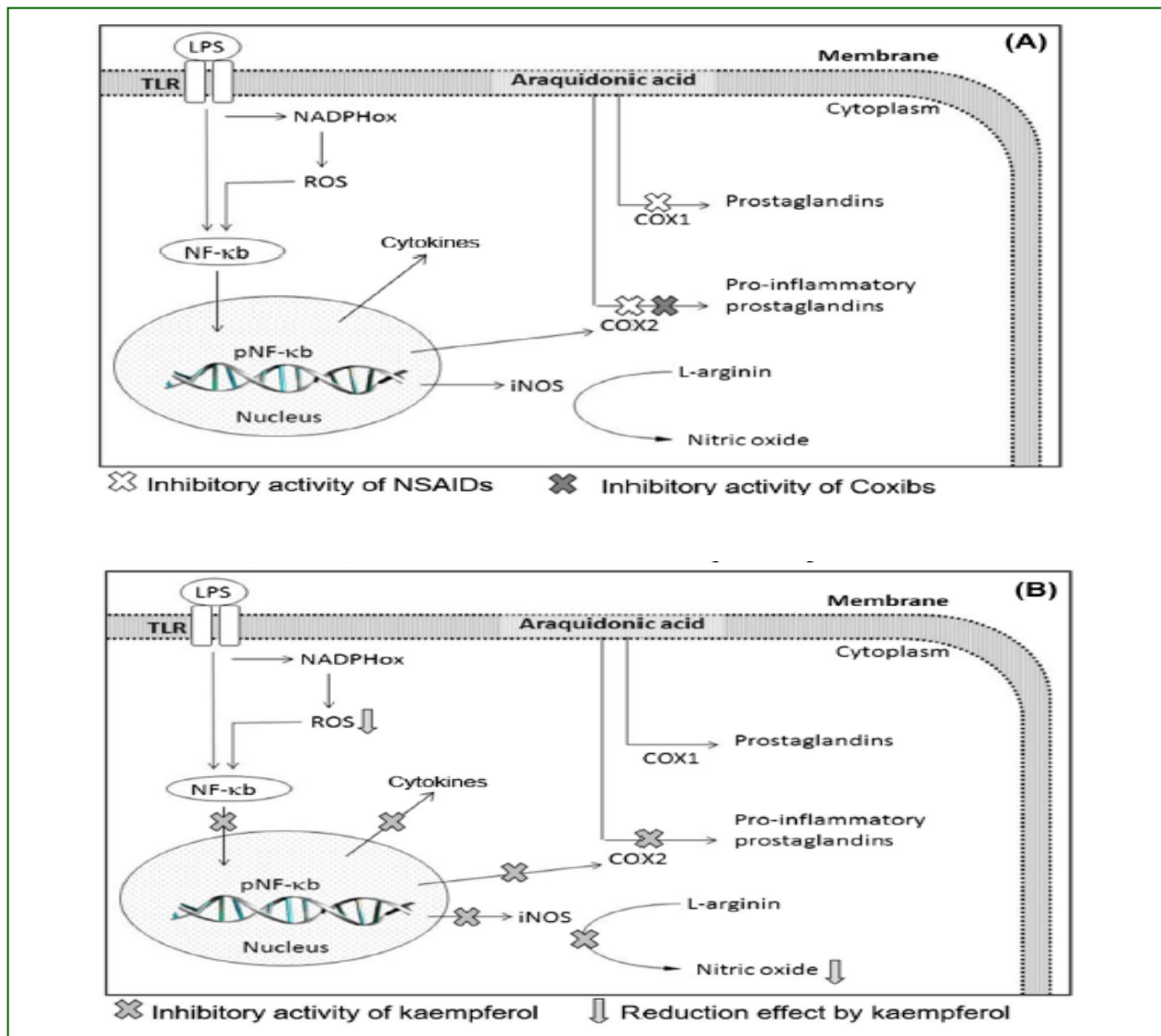


Figure 11 : Mode d'action des anti-inflammatoires A) AINS b) Le kaempferol (Ambriz-pérez *et al.*, 2016).

Les flavonoïdes, tel que le kaempférol, quercétine, epicatéchine ont montrés une action inhibitrice des enzymes en relation avec l'acide arachidonique (phospholipase A2, la

cyclooxygenase (COX) et la lipoxigénase (LOX) ainsi que l'inhibition des activations du NF- κ B (nuclear factor-kappa B), protéine-1 (AP-1) et MAPK (mitogen activated proteinkinase), l'expression de l'iNOS (inducteur d'oxyde nitrique synthase), production de l'oxyde nitrique NO et des prostaglandines PGE2 et la production des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Serafini et Raguzzini, 2010 ; Ambriz-pérez *et al.*, 2016).

Les terpénoïdes contenus dans les espèces du genre *Thymus* peuvent affecter divers mécanismes pertinents à l'inflammation. Le Linalool a provoqué la suppression de production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) ainsi la production de l'oxyde nitrique et l'expression des iNOS et COX-2 (Prakash, 2017).

Le thymol et le carvacrol présentent un grand potentiel comme agents thérapeutiques à l'inflammation et aux troubles immunologiques associés à l'hyperactivité des lymphocytes T. Ils provoquent la diminution de production des cytokines IL-2 et l'INF- γ par les cellules lymphocytaires T activé par inhibition des facteurs de transcription laprotéine-1 (AP-1) et le NAFT-2 (facteur nucléaire des lymphocytes T activés), avec peut être d'autres voies de signalisation plutôt que le NF- κ B et le NAFT-1 (Gholijani *et al.*, 2015).

Liang *et al.* (2014) ont montrés que le thymol a provoqué l'inhibition de la production du TNF- α et l'interleukine IL-6, la suppression de l'expression iNOS, cytochrome C oxydase-2 et blocage de la phosphorylation du p-38 (protéinemitogène kinase activés).

Le thymol exerce une activité anti-inflammatoire sur la colite (inflammation de la paroi du colon) en inhibant la voie de signalisation NF- κ B et en diminuant l'expression de l'activité des TNF- α et MPO (myelo peroxydase du colon). Le thymol peut inactiver les canaux de calcium cytosoliques ainsi provoquer la diminution de la production de l'élastase qui est considérée comme un marqueur de maladies inflammatoires. Aussi il a montré un grand potentiel dans la cicatrisation rapide des plaies et des brûlures (Araruna *et al.*, 2020).

Le thymol et le carvacrol présentent des effets anti-œdémateux mais de façon antagoniste. Le carvacrol a montré un effet inhibitoire de la migration des leucocytes vers le site de blessure, tandis que le thymol a montré une réponse partiellement dépendante de l'histamine et des prostanoides (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012).

IV.3. Douleur et analgésiques**IV. 3.1. Définition de la douleur**

La définition de la douleur approuvée par l'association internationale de l'étude de la douleur (IASP) est « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles » (Raja *et al.*, 2020). Cependant cette définition est pluridimensionnelle (sensorielle, affective et cognitive). L'intensité d'une réaction de défense suite à un stimulus est un processus physiologique pour la protection de l'organisme et qui se résume sous la nomination de nociception (Baliki et Apkarian, 2015).

IV.3.2. Types de douleurs**IV.3.2. 1. Selon la durée****➤ La douleur aiguë**

La définition la plus courante est « une réponse physiologique normale et prévue à un stimulus chimique, thermique ou mécanique associés à la chirurgie, aux traumatismes et aux maladies aiguës (Carr et Gouda, 1999). La douleur aiguë est une douleur qui survient en réponse à une lésion tissulaire ou à une maladie sous-jacente (ex calculs rénaux). Elle est de courte durée et est adaptative, permettant le déclenchement de la réaction de protection favorisant ainsi la récupération après traumatisme (Radnovichet *et al.*, 2014).

➤ La douleur chronique

La douleur chronique se définit comme une douleur qui persiste plus de 3 mois. La source de la douleur peut être connue ou inconnue et sa persistance n'est plus seulement un symptôme de blessure ou de maladie mais un problème médical en soi même. Cette douleur n'a aucune fonction biologique, se produit dans plusieurs sites dans le corps et accompagne généralement une maladie inflammatoire ou neuropathique (White *et al.*, 2017).

IV.3.2. 3. Selon les mécanismes physiopathologiques

➤ La douleur nociceptive

La douleur nociceptive est une douleur qui se produit suite à un excès de nociception causé par des lésions des tissus périphériques (peaux, muscles, viscères). Ces lésions stimulent les capteurs de douleurs appelés nocicepteurs permettant la transmission des messages au cerveau. La plupart des nocicepteurs sont polymodales, répondant à des stimuli mécaniques (pression douloureuse, coupure de tissu) stimuli thermique (brûlure, chaleur et froid) et stimuli chimiques (Trouvin et Perrot, 2019)(Fig.12).

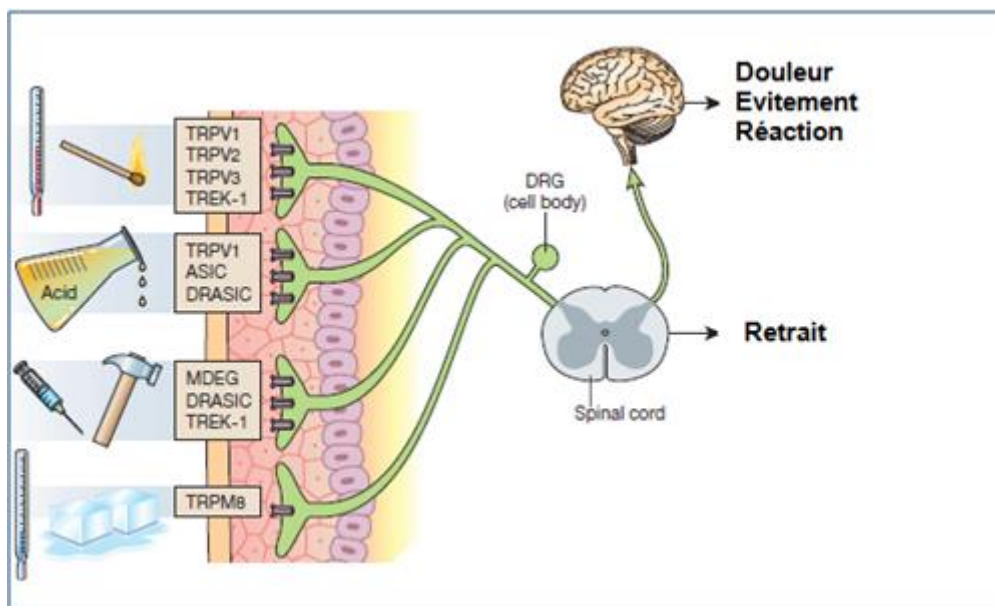


Figure 12 : Schéma représentatif de la douleur nociceptive (Scholz et Woolf, 2002).

➤ La douleur neuropathique

La douleur neuropathique a pour origine l'atteinte du système nerveux. Elle est définie comme étant une douleur amorcée par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux périphérique (une amputation, zona, diabète) ou central (infarctus cérébral) (Das, 2015). Elle peut se manifester de façons spontanées (sans stimulus) mais aussi peuvent apparaître suite à un stimulus normalement inoffensif (allodynie) ou peu douloureux senti de façon exagérée (hyperalgésie) (Schaible et Richter, 2004).

➤ **La douleur inflammatoire :**

La douleur inflammatoire est causée par l'activation du système immunitaire et est l'une des caractéristiques cardinales de l'inflammation. Bien que cette douleur soit adaptative et protectrice, elle doit être réduite chez les patients souffrant d'inflammation chronique telle que la polyarthrite rhumatoïde (Woolf, 2010).

Suite à une lésion mécanique, une infection tissulaire, ischémie, croissance tumorales ou processus auto-immune, les nocicepteurs sont sensibilisés par la libération de médiateurs pro-inflammatoires (protons, histamine, bradykinine, prostaglandine (PGE₂), NO, IL-1, IL-6, TNF- α , facteurs de croissance nerveuse (NGF) des cellules et des vaisseaux sanguins endommagés sur le site de lésion ainsi que les cellules immunitaires (macrophages, mastocytes, neutrophiles) qui envahissent le site blessé (Das, 2015) (Fig. 13).

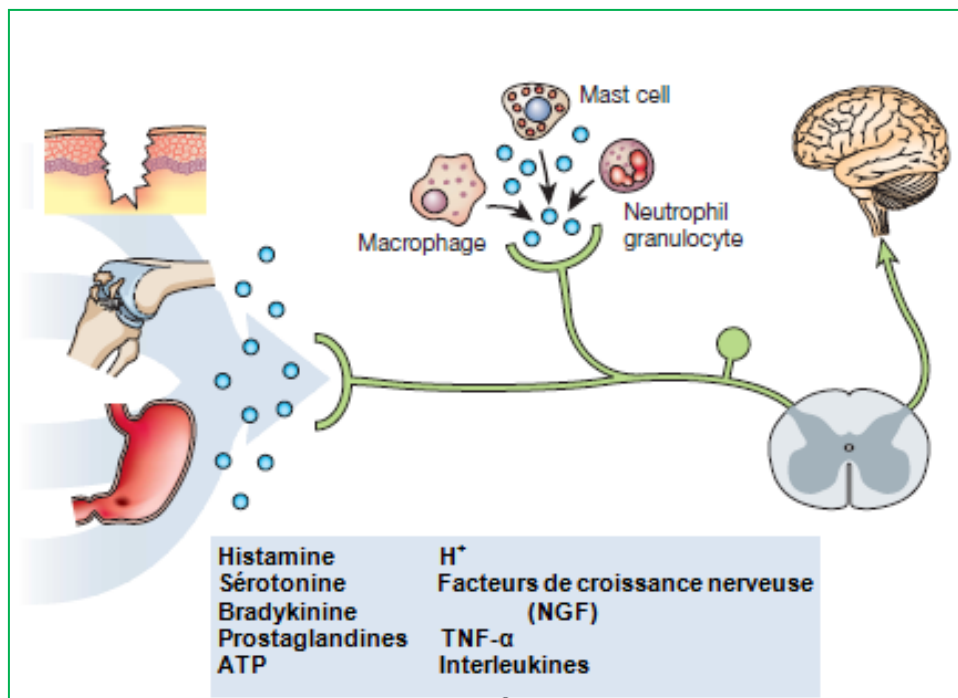


Figure 13 : Schéma représentatif de la douleur inflammatoire (Scholz et woolf, 2002)

IV.3.3. Mécanismes de la douleur :

La douleur est perçue par l'intervention des nocicepteurs qui s'activent suite à des stimulations thermiques, mécaniques et chimiques. Ces nocicepteurs sont responsables de la transformation du stimulus en impulsions électriques (étape de transduction). Les stimulations mécaniques et thermiques activent directement les nocicepteurs tandis que les lésions traumatiques et inflammatoires vont permettre la libération de substances inflammatoires dites algogènes (Le Bars et Willer, 2004).

Les principaux récepteurs cutanés sont les fibres nerveuses C (non myélinisées) et A δ (peu myélinisées) responsables des sensations thermo-algiques, tandis que les fibres A β sont responsables des sensations tactiles (Le Bars et Plaghki, 2001).

Les messages nociceptifs sont acheminés par ces fibres nerveuses jusqu'à la moelle épinière, permettant le passage à l'étape de transmission et de modulation. L'impulsion électrique provoque le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, qui vont se fixer sur des récepteur de l'axone post-synaptique permettant la création d'un signal électrique qui se diffusera jusqu'au cerveau formant l'étape de perception qui se traduira par une réponse (retrait et évitement en cas de brûlure) et donne l'émotion de douleur (Beaulieu, 2005).

IV.3.4. Les traitements analgésiques

Le traitement de la douleur par les médicaments analgésiques ou antalgiques doit s'adapter au type, l'intensité et les mécanismes impliqués dans la douleur. En fonction des sites d'actions, les analgésiques peuvent être classés comme suite (Swieboda *et al.*, 2013).

IV.3.4.1. Analgésiques périphériques

Les analgésiques périphériques agissent sont les analgésiques non opiacés qui sont utilisés pour soulager les douleurs modérées (céphalées, névralgie, arthralgie, maux de dents). Les médicaments analgésiques peuvent être sédatifs à la douleur seulement appelé antalgiques purs ou associés à des actions antipyrétiques (paracétamol) et/ou anti-inflammatoire (aspirine et les AINS). Leur point en commun est l'inhibition de la cyclo-oxygénase ; cependant le paracétamol n'agit que sur les cyclo-oxygénases centrales tandis que les salicylés et les AINS agissent sur les cyclo-oxygénases périphériques et centrales (Swieboda *et al.*, 2013).

IV.3.4.2. Analgésiques centraux

Les opioïdes sont des analgésiques centraux typiques, qui produisent une analgésie puissante efficace dans le traitement de la douleur sévère. Ils affectent de multiples organes et systèmes, y compris le système immunitaire (Liang *et al.*, 2016).

- **Les analgésiques opiacés**

L'activation des récepteurs opioïdes produit une analgésie profonde. Les analgésiques opioïdes exercent leurs actions via des récepteurs opioïdes, dont au moins trois grande classes: μ (Mu), δ (Delta) et κ (Kappa). Les analgésiques opioïdes produisent un large éventail d'effets indésirables y compris l'euphorie, dysphorie, troubles respiratoires et cardiovasculaires, convulsions, nausées et vomissements (Jamison et Mao, 2015; Ballantyne et Mao, 2003).

IV.3.4.3. Analgésiques de sources végétales

En raison des effets indésirables évidents des drogues synthétiques, les recherches se concentrent sur les plantes médicinales pour développer de nouveaux agents analgésiques avec moins d'effets secondaires. Malgré de nombreux opioïdes synthétiques, la méthadone, la morphine et la codéine sont toujours extraites des graines de pavot en raison de la difficulté économique et de synthèse chimique (Abdel-Rahman, 2017).

Les monoterpènes acycliques (myrcène, linalool) modulent habituellement le système opioïde. Le linalool a réussi à réduire considérablement la réponse nociceptive avec possible implication récepteurs M_2 , opioïdes, dopaminergique (récepteurs D_2) et adénosinergique. Le traitement aigu et chronique avec le linalool a permis la réduction de la douleur inflammatoire par réduction de synthèse ou libération de NO (Berliocchi *et al.*, 2009).

Les monoterpènes monocycliques tel que le carvacrol et ses analogues ont montrés l'effet analgésique sans la participation du système opioïde. Le contrôle de la douleur par le carvacrol est associé à l'inhibition de prostaglandines avec suppression de l'expression de COX-2. Le carvacrol possède un effet anti-hypernociception par inhibition des cytokines TNF- α et libération de NO, tandis que le thymol contribue au contrôle des sensations douloureuses par modulation des canaux Na^+ et K^+ , le récepteurs GABA et la synthèse de prostaglandines (Guimaraes *et al.*, 2012).

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Objectifs

Les plantes aromatiques et médicinales représentent un réservoir de composés actifs d'un large éventail d'activités biologiques. De ce fait, l'objectif de ce travail de thèse et de participer dans des avancées technologiques afin de valoriser les composés bioactifs de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* de la région de Mascara pour leurs potentiels en pharmacologie et en industrie agroalimentaire.

Dans ce contexte, la recherche a été effectuée sur les axes suivants :

- Enquête ethnobotanique auprès de la population locale de la région de collecte des deux espèces de thym étudiés.
- Extraction des composés phénoliques et des huiles essentielles (Fig. 13).
- Caractérisation chromatographique des extraits bruts par HPLC/DAD et les huiles essentielles par GC/MS.
- Dosage des composés phénoliques.
- Etude *in vitro* de l'activité antioxydante par l'utilisation de plusieurs méthodes : DPPH, GOR, CUPRAC, pouvoir réducteur et phénanthroline.
- Etudes *in vivo* des activités biologiques : tests de toxicité, activité anti-inflammatoire, activité analgésique.

Le travail de cette thèse de recherche a été réalisé au sein de :

- Laboratoire de bioconversion, génie microbiologique et sécurité sanitaire.
- Centre de recherches en Biotechnologie, Constantine.
- Laboratoire de biotechnologie et biologie moléculaire, Aksaray, Turquie.
- Les échantillons d'huiles essentielles ont été envoyés et identifiés dans le laboratoire de chimie et sciences géologiques, Caligari, Italie.

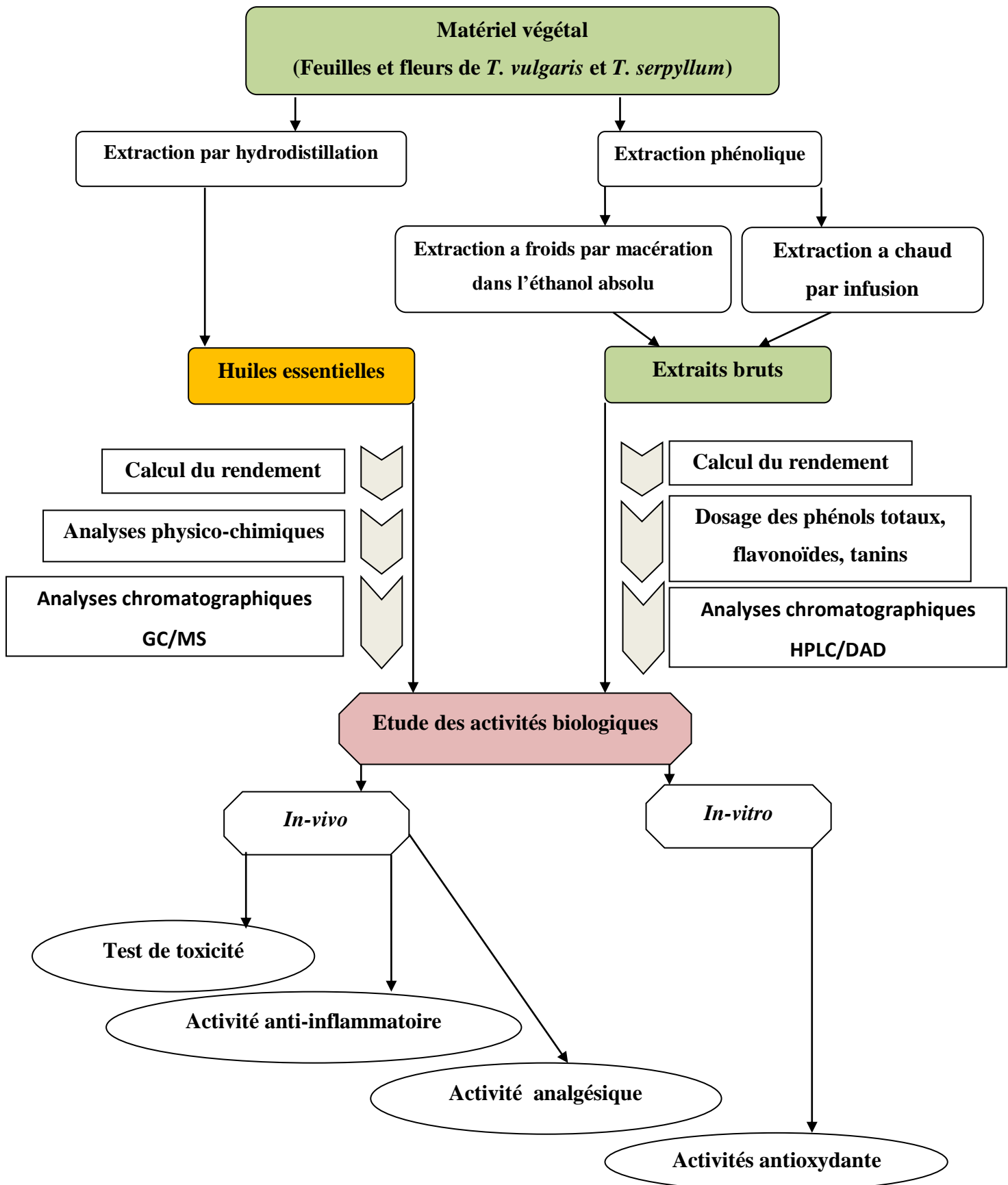


Figure 14 : Schéma récapitulatif de la méthodologie générale.

II. Enquête ethnobotanique

II.1. Méthodologie :

Le choix des deux plantes est basé sur une enquête ethnobotanique auprès de la population locale. L'enquête a été effectuée selon la méthode décrite par (Martin, 1995) et le protocole suivi a été comme suite :

- Choix de la région d'étude : la région de Mascara ville a été choisie comme zone d'étude comprenant aussi El Bordj, Bouhanifia, Ghris et Tighenif.
- Le rapprochement envers la population a été effectué avec explication des objectifs et des intérêts de notre étude.
- L'entretien avec la population a été réalisé via un questionnaire présenté dans l'annexes qui comporte :
 - Partie informateur : comporte l'âge, sexe, situation familiale, niveau d'études afin de collecter des informations d'ordre ethnologique.
 - Partie plante : comporte des questions précises sur les plantes étudiés tel que : connaissez vous la plantes ?, comment utilisez vous la plante?, et quel sont les principaux affections traités avec ces plantes ?

II.2. Expression des résultats:

Les résultats de cette enquête ethnobotanique sont exprimés en pourcentages représentés graphiques par des diagrammes. Les spécialistes dans ces études telles que les ethnobotanistes ont développés des moyens d'uniformiser les résultats de ces types d'enquêtes par le calcul de certains indices **UV** et **FL** dans le but de faciliter la comparaison entre les différents études .

II.2.1. Valeur d'usage (*Use value* UV)

La valeur d'usage UV est un indice qui représente l'importance relative de chaque espèce enquêté par la population. Il est calculé par la formule suivante (Revathi *et al.*, 2013) :

$$UV = \sum U / n \quad \text{Où :}$$

UV : Valeur d'Usage

U : nombre de rapports d'utilisation par les personnes interrogées.

n : nombre de personnes interrogées.

II.2.2. Niveau de fidélité (fidelity level *FL*) :

Appelé niveau de fidélité est un indice qui permet l'étude de la fréquence d'utilisation d'une espèce dans le traitement d'une pathologie spécifiée. Il est calculé selon la formule suivante (Martin, 1995) :

$$FL (\%) = (NP / N) \times 100$$

Où :

FL : niveau de fidélité.

NP : nombre de rapports enregistrés sur l'espèce dans le traitement d'une pathologie défini.

N : nombre de rapports enregistrés par les personnes interrogées.

III. Matériel

III.1. Matériel végétal

Les espèces sélectionnées *T. serpyllum* et *T. vulgaris* ont été choisies de par leur grande utilisation par la population locale de la région de Mascara. Les deux espèces de thym ont été récoltées durant la période de pleine floraison Avril-Juin 2017. La partie utilisée est représentée par les feuilles et fleurs fraîches. Une fois séchées, ils ont été récupérés et stockés dans des sacs en papier.

L'identification botanique de *Thymus serpyllum* a été validée par Monsieur le Professeur Benhassaini H ; laboratoire de biodiversité végétale. Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbes (Fig.15).

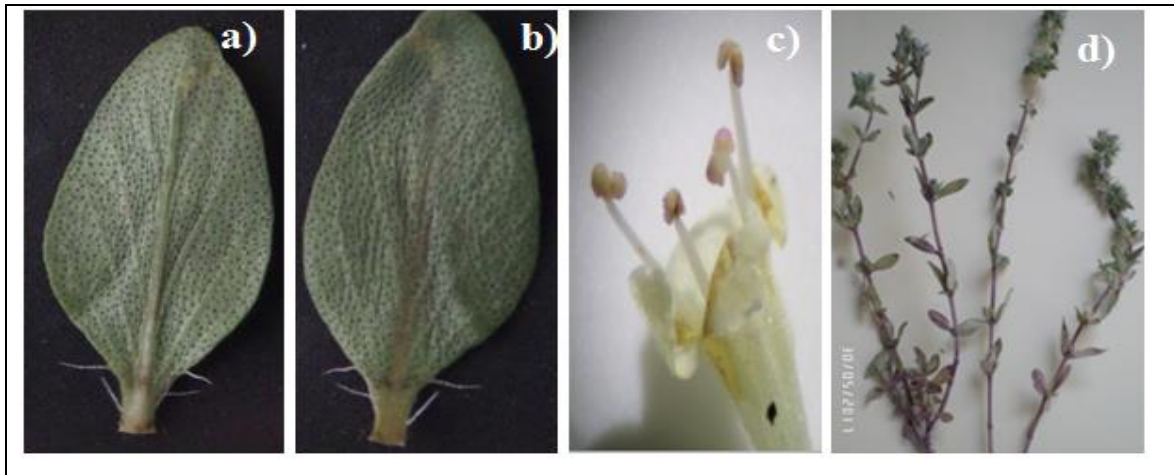


Figure 15: Identification botanique *Thymus serpyllum*

a) et b) Feuille, c) Fleur, d) Tige et feuilles (Cliché personnel).

L'identification botanique de *Thymus vulgaris* a été réalisée par Dr Bouyahmed. H ; Centre de biotechnologie CRBT Constantine (Fig.16).

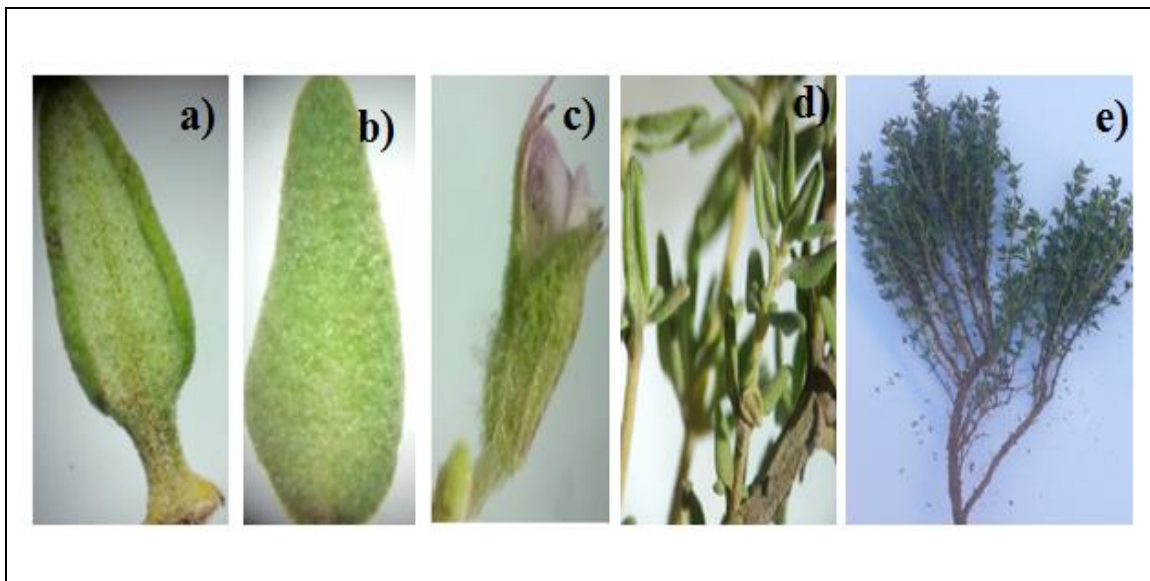


Figure 16: Identification botanique *Thymus vulgaris*

a) et b) Feuille, c) Fleur, d) et e) Tige et feuilles (Cliché personnel).

III.1.1. Situation géographique du site de récolte :

Le *T. serpyllum* et *T. vulgaris*, ont été récoltés dans la région d'El bordj de la wilaya de Mascara. La station de récolte est représentée par la figure n°17 et le tableau 3.

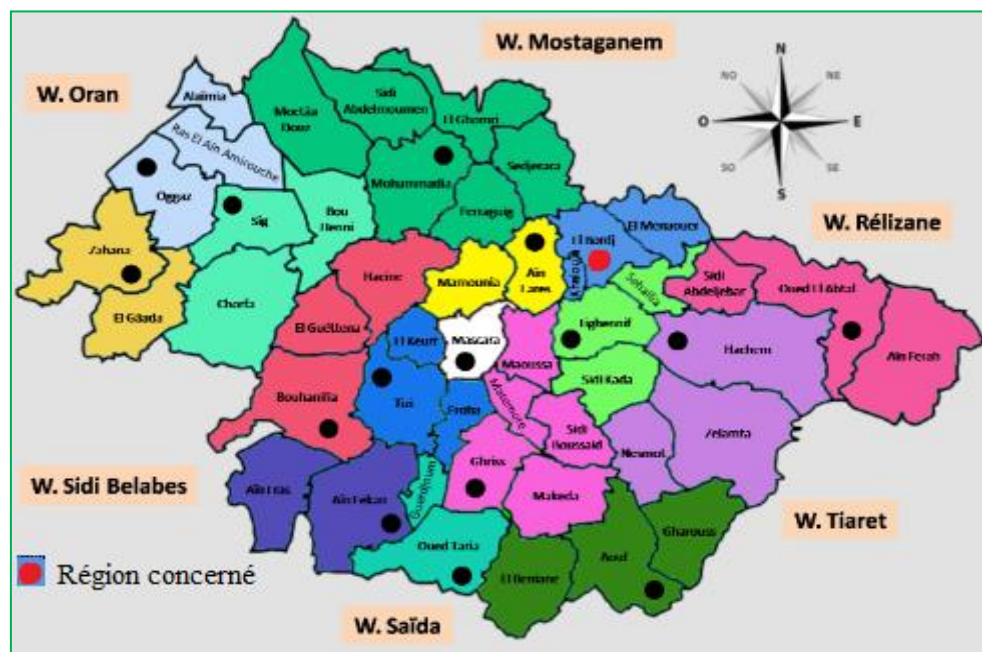


Figure 17: Carte géographique du site de collecte de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (DW)

Tableau 3 : Caractéristiques géographique du site de collecte des deux espèces étudiées

Région de collecte	Altitude (m)	Latitude	Longitude
El Bordj	783m	35° 30' 57" N	0° 18' 6" E

III.2. Matériel animal

Le model choisi pour les expérimentations *in-vivo* sont les souris Swiss albinos des deux sexes, pesant entre (25±2 gr), fournis par l'animalerie de la faculté SNV, de l'Université Djillali Liabes SBA. L'élevage des souris a été effectué dans des cages en polypropylène munies de mangeoires et de biberons pour leur assurer une alimentation *ad libitum*.

La température de la chambre d'élevage a été maintenue à 25 °C avec changement de litière et de l'eau de boisson 3 fois par semaines. Le traitement et les conditions d'élevage des souris a été conformes aux lignes directrices. Les souris ont été réparties en 8 lots pour l'ensemble des études de toxicité, l'activité anti-inflammatoire et activité analgésique.

IV. Extraction des principes bioactifs et étude phytochimique

IV.1. Les huiles essentielles

IV.1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydro-distillation type Clevenger selon les normes de la pharmacopée européenne, 2004. Chaque 50 gr de poudre sèche des deux espèces étudiées ont été soumis avec 500ml d'eau distillée dans un ballon de 1 litre, le tout porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle produites s'accumulent dans une burette graduée remplie auparavant d'eau distillée. Etant de faible densité par rapport à l'eau, l'huile essentielle surnage à la surface (Fig. 18) Les huiles obtenues ont subi une déshydratation par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), ensuite conservées dans des flacons teintés et bien scellés puis stockés à 4°C jusqu'à caractérisation.



Figure 18 : Photo de montage d'hydrodistillation type Clevenger (cliché personnel)

IV.1.2. Rendements des huiles essentielles

Les rendements ont été calculés suivant la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = 100 \times m_1 / m_0$$

Où :

Rdt (%) : Rendement en pourcentage.

m_1 : masse de l'huile essentielle en gr.

m_0 : masse de la poudre de plante en gr.

IV.1.3. Analyses physico-chimiques

IV.1.3.1. Indices chimiques

Les tests d'indices chimiques ont été déterminés selon la norme (AFNOR., 2000).

a) Détermination de l'indice d'acide

La détermination de l'indice d'acide a été effectuée par la mesure du nombre en mg de KOH requis pour neutraliser les acides libres dans une quantité de 1g d'huile essentielle (NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103)).

b) Détermination de l'indice d'ester

La détermination est réalisé par dosage de quantité en mg de KOH indispensables a la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters dans une masse de 1g d'huile essentielle (AFNOR NF T 75- 104 : 1994).

IV.1.3.2. Indices physiques

a) Détermination de la densité relative à 20°C

Cette détermination est effectuée par le rapport de la masse volume d'HE sur la masse d'un volume égale d'eau à 20°C.

b) Détermination de l'indice de réfraction

La détermination est maintenue à une température constante pendant la mesure du rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée (AFNOR NF ISO 280 : 1999 (75-112)).

IV.1.4. Caractérisation chromatographique

La composition chimique des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* extraites a été identifié par analyse chromatographique en phase gazeuse GC/FID et chromatographique en phase gazeuse couplé a un spectre de masse GC/MS.

L'identification chromatographique des huiles essentielles a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie et sciences géologiques, Caligari, Italie. L'analyse chromatographique en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC/FID) a été réalisée sur un appareil des technologies Agilent équipé d'un auto-échantillonneur Agilent 7683B, colonne capillaire en silice et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). La séparation a été effectuée selon les conditions opératoires suivantes : le volume d'échantillon injecté est de 1 µl dilué dans l'hexane (1 :100 m/m), une température programmée de 60°C à 250°C et l'hélium comme gaz vecteur.

L'analyse chromatographique GC-MS a été réalisée avec un appareil type HP 6890N muni d'une colonne capillaire en silice HP1 connecté à un quadruple détecteur de masse type Agilent 5973. Les conditions chromatographiques sont identiques à celles mentionnées auparavant pour la GC/FID tandis que pour la spectrométrie de masse SM les conditions sont comme suite : un potentiel d'ionisation de 70eV, un mode de détection Scan de 5 scans/seconde avec enregistrement des spectres de masse dans la gamme 30-350 m/z et une température d'interface de 250°C.

L'identification des composés est basée sur la comparaison des spectres de masses avec ceux dans les banques de données informatiques NIST 02 reliées au système GC/MS et la bibliographie Adams (Adams, 2007). Les indices de rétention ont été déterminés selon le temps de rétention d'une série de n-alcanes (C8 - C20) et (C21 – C40 (Brahmi *et al.*, 2016).

IV.2. Les composés phénoliques

IV.2.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée selon deux méthodes, la macération à froid dans des solvants à polarité croissante et l'infusion.

IV.2.1. 1. La macération

La macération est une technique très utilisée en phytochimie, qui consiste à tremper 10gr de poudre de plante dans 100 ml d'éther de pétrole, par la suite le résidu est macéré dans l'éthanol avec agitation en continu par un agitateur magnétique pendant 24h (Fig. 19). La méthodologie suivie est celle décrite par (Diallo *et al.*, 2004 ; Bourgou *et al.*, 2016) avec

quelques modifications. La macération dans l'éther de pétrole a pour but l'élimination des composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle).



Figure 19 : Extraction des composés phénoliques par l'éthanol (cliché personnel).

IV.2.1.2. L'infusion

Le protocole d'extraction est celui décrit dans les travaux de (Kulisic *et al.*, 2006). Pour la préparation des infusions, 10 gr de poudre des deux espèces de thym ont été infusées trempés dans 100ml d'eau distillé bouillante. Après 30 min, ils sont filtrées a travers du papier Whatman N°4 et ensuite concentrés sous vide a l'aide du rota-vapeur jusqu'à obtention d'un résidu sec. Ce dernier est conservé au réfrigérateur à 4°C.

IV. 2. 2. Les rendements des extraits phénoliques

Le rendement des extraits éthanolique et l'infusé sont calculé suivant la formule suivante :

$$\mathbf{Rdt\ (\%)\ =100\ m_1\ /\ m_0}$$

Où :

Rdt (%) : Rendement en %.

m₁ : masse de l'extrait brut.

m₀ : masse de la poudre de plante.

IV.2.3. Dosages des composés phénoliques

IV.2.3. 1. Dosage des phénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux a été effectuée par le test Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965 ; Muller *et al.*, 2010). Ce test repose sur les réactions d'oxydoréduction cependant il n'est pas spécifique à une classe de polyphénols bien définie et manque d'intervention avec les acides aminés (tyrosine) et l'acide ascorbique (Dykes et Rooney, 2006).

Mode opératoire

La teneur en polyphénols est déterminée par utilisation du réactif Folin-Ciocalteu (FCR). A 200 μl d'extrait à la concentration 1mg/ml sont ajoutés 1ml de solution FCR diluée (1:10 v/v) et 750 μl de carbonate de sodium (7.5 %). Le mélange est mis à l'obscurité pendant 120 min, puis lecture à 760 nm. Lors de l'oxydation des phénols, le FCR qui est constitué par un mixte d'acide phospho-tungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$), est réduit en un mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et d'oxydes de molybdène (Mo_8O_{23}) et vire vers une coloration bleu qui absorbe à 750-765nm. La courbe d'étalonnage est établie par le standard acide gallique à partir duquel les résultats sont exprimés en μg d'équivalents acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) (Fig.20).

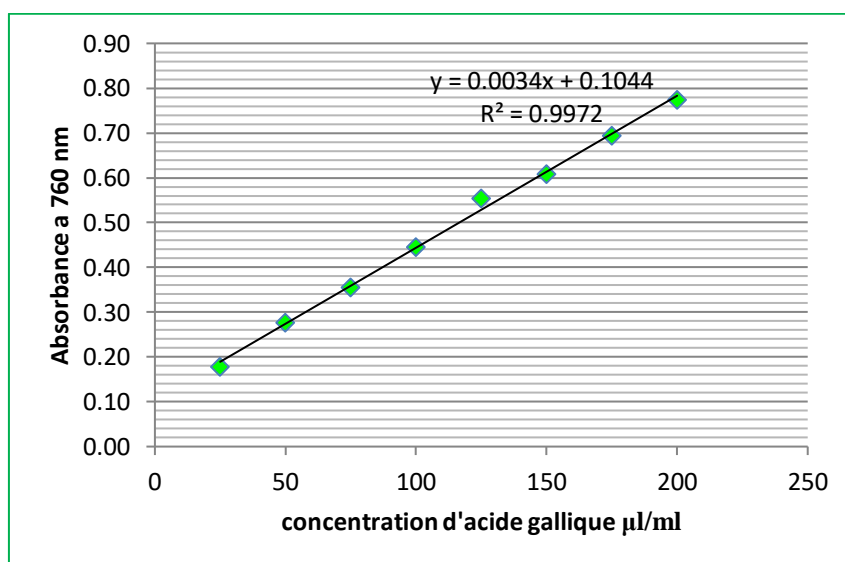


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV.2. 3. 2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est basé sur le principe de formation de complexe jaunâtre entre les groupements hydroxyles libres des flavonoïdes et Al^{3+} du trichlorure d'Aluminium $AlCl_3$.

Mode opératoire

Le protocole suivi est celui de (Kim *et al.*, 2003), où 500 μ l de la solution des extraits sont mélangées avec 1500 μ l d'eau distillé et 250 μ l de nitrate de sodium $NaNO_3$ à 5%. Après 5 minutes, 250 μ l d' $AlCl_3$ (5%) sont ajoutés. Après incubation de 11 min, à ce mélange 500 μ l de NaOH à 4% sont ajoutés. La mesure de l'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de 510 nm. La teneur en flavonoïdes des extraits étudiés est exprimée en μ g équivalent de la quercétine par mg d'extrait sec (Fig.21).

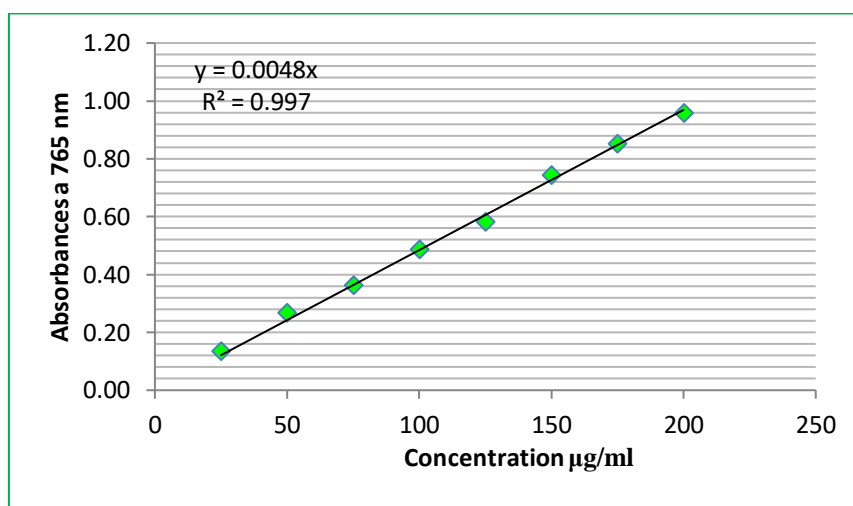


Figure 21: Courbe d'étalonnage de la quercétine

IV.2. 3. 3. Dosage des tanins

Le dosage de la teneur des extraits en tanins condensés est effectué selon la méthode vanilline. Le principe repose sur la formation d'un complexe chromophore rouge entre la vanilline et les flava-3ols libres ainsi que des pro-anthocyanidines (Sun *et al.*, 1998).

Mode opératoire

A 50 μ l de solution d'extraits sont ajoutés 1500 μ l de solution méthanolique de vanilline à (4% m/v) et 750 μ l d'acide chlorhydrique HCL. Après 20 min d'incubation à

l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 550 nm et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide catéchique par gr d'extrait sec (mg EC/g) (Fig.22).

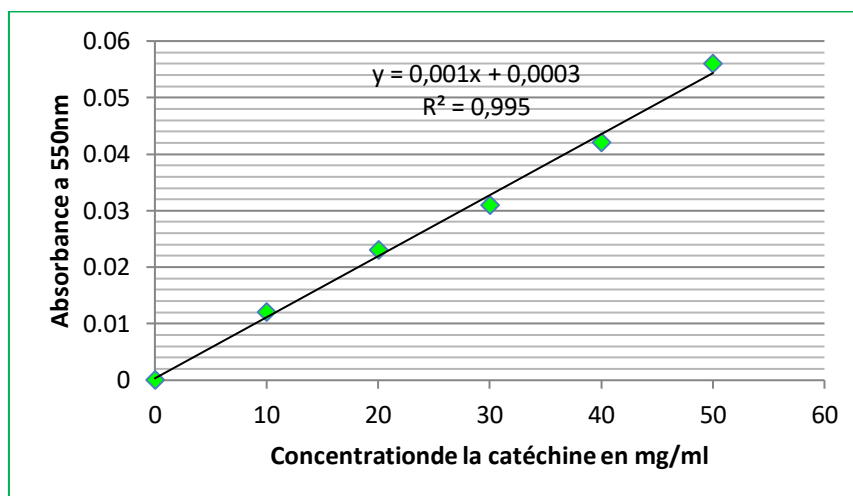


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la catéchine

IV.2. 4. Analyse chromatographique : HPLC/DAD

- La caractérisation phénolique des extraits éthanoliques et des infusés de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* a été réalisée dans le laboratoire de Laboratoire de biotechnologie et biologie moléculaire, Aksaray, Turquie, suivant la méthode décrite par (Caponio *et al.*, 1999) après modifications.

Mode opératoire

L'évaluation qualitative et quantitative a été effectuée par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système HP Agilent 1290 infinity couplé à un détecteur automatique de barrette d'iode (HPLC-DAD). Les phases de séparation ont été réalisées sur une colonne C18. Les extraits ont été préparés en concentration 20mg/ml et le volume injecté dans la colonne est de 10 μ l. La phase mobile est constituée d'un mélange (A) d'acide acétique avec l'eau à 3% (v/v) et (B) dans le méthanol.

Le débit de la phase mobile est de 0.8ml / min et a été utilisé comme suit : 93% A / 7% B pendant (0.1 min), 72% A / 28% B pendant (20min), 75% A / 25%B pendant (8min), 70% A / 30% B pendant (7min), 67%A / 33% B pendant (10min), 58% A / 42% B pendant (3min), 20% A / 80% B pendant (2min) et 100% B pendant 5min jusqu'à la fin de l'opération chromatographique (Abdulqadir *et al.*, 2018).

La détection a été effectuée à 278nm, et les temps de rétention des composés phénoliques analysés ont été comparés aux standards disponibles suivants : acide gallique, (+)-catéchine, acide chlorogénique, acide caféique, acide hydroxybenzoïque, épicatechine, acide sinapique, acide benzoïque, hésperidine, acide rosmarinique, acide cinnamique et quercitrine. L'analyse quantitative a été déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage externe de chaque standard et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g}/\text{gr}$.

V. Activités biologiques

V.1. Activités *in vitro*

V.1.1. Activités antioxydantes

La détermination de l'activité antioxydante peut être réalisée par des différents tests en raison de la complexité des processus d'oxydation et de la nature variée des antioxydants (composés hydrophiles et hydrophobes). L'étude *in vitro* de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* est testée selon cinq méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, radical libre GOR, pouvoir réducteur des ions métalliques fer (reducing power) et ions de cuivre (CUPRAC) ainsi que la *O*-phénanthroline.

V.1.1.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

La méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est une technique d'évaluation du pouvoir antioxydant dont le principe repose sur la réduction du DPPH qui absorbe à 517nm et dont l'absorption diminue en présence d'antioxydants (Fig.23).

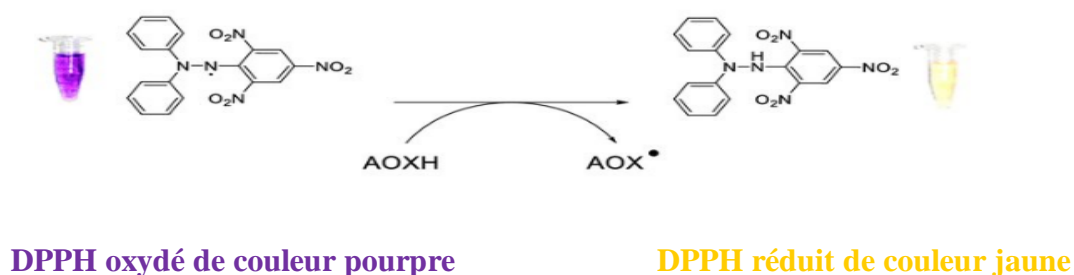


Figure 23: Réaction de DPPH avec un antioxydant naturel (Arce-Amezquita *et al.*, 2019).

Mode opératoire

Le protocole expérimental suivi est celui élaboré par (Blois, 1958). 40µl de chaque extrait a différentes concentrations (1.562 -100µg /ml) de chaque plante sont ajoutés a 160 µl de solution méthanolique de DPPH (0.1 Mm). Après 30 min d'incubation, les absorbances sont lues à 517 nm. Le Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme antioxydants standards. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où :

A_{blanc} : Absorbance du blanc (contrôle négatif).

A_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ qui représente la concentration des échantillons nécessaire à réduire 50% du DPPH. Elles sont calculées par régressions linéaires sur les graphes élaborés.

V.1.1.2. Activité anti-radicalaire du Galvinoxyl (GOR)

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire GOR en utilisant le Galvinoxyl comme radical libre.

Mode opératoire

L'activité est déterminée selon le protocole établi par (Shi *et al.*, 2001) où 160 µl de la solution méthanolique de galvinoxyl (01.Mm) est ajouté 40µl de chaque concentration d'extraits (1.562- 100µg/ ml). La solution méthanolique de galavinoxyl est utilisée comme blanc et l'acide ascorbique ainsi que le Trolox sont utilisés comme standards. L'absorbance est mesurée a la longueur d'ondes 428 nm et le pourcentage de piégeage du radical galvinoxyl est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où :

A_{blanc} : Absorbance du blanc (contrôle négatif).

A_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon testé.

V. 1. 1. 3. Test du pouvoir réducteur des ions de fer Fe^{3+}

L'étude du pouvoir réducteur des extraits a pour but d'évaluer la capacité des extraits à convertir la forme oxydée du Fe^{3+} en forme réduite Fe^{2+} . Le pouvoir réducteur des différents extraits est déterminé suivant la méthode développée par (Gali et Bedjou, 2019).

Mode opératoire

10 μl de chaque extrait à différentes concentrations est mélangé avec 40 μl de tampon phosphate (0.2M et Ph 6.6), 50 μl de la solution ferricyanide de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Après incubation du mélange réactionnel à 50°C pendant 20min, 50 μl d'acide trichloro-acétique (TCA) à 10% ,40 μl d' H_2O distillé et 10 μl d'une solution de chlorure de fer FeCl_3 à 0.1% sont ajoutés. Les absorbances des mélanges sont lues à 700nm avec un blanc où l'extrait est substitué par le méthanol. Les résultats obtenus sont exprimés en $\text{A}_{0.50\mu\text{g/ml}}$ qui représente la concentration à une absorbance égale à 0.5.

V.1.1.4. Evaluation de l'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante est évaluée par la détermination de la capacité de réduction des ions de cuivre Cu^{2+} (Fig.24).

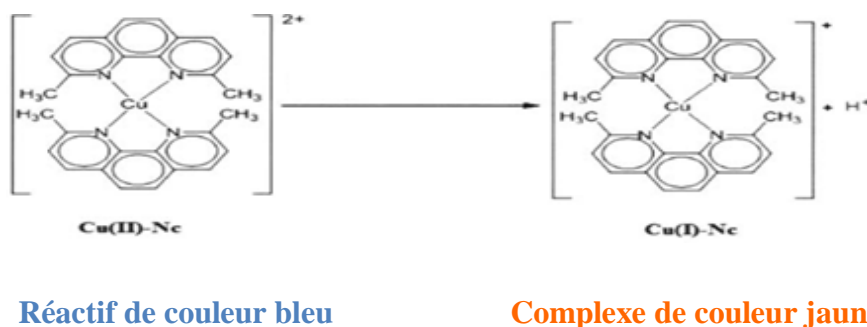


Figure 24: Test CUPRAC (Réduction du complexe Cu^{2+} -NC) (Özyürek *et al.*, 2011).

Mode opératoire

L'expérience est réalisée selon le protocole établi par (Apak *et al.*, 2004), où dans chaque puits des microplaques utilisés : 40 μl tampon acétate d'ammonium (ACNH_4 à Ph 7), 50 μl de solution méthanolique de néocuproïne (7.5Mm), 50 μl de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont déposés. Ensuite, 40 μl d'extrait à différentes concentrations sont ajoutés pour atteindre le volume de 200 μl dans chaque puits. Les microplaques sont incubées à l'obscurité pendant 60 min et

l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde 450nm. Le pouvoir réducteur est comparé à celui des standards Trolox et de l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en A_{0.5}µg/ml.

V.1.1.5. Test Phénanthroline

Cette méthode est utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur des différents extraits et huiles essentielles étudiés. Cette évaluation est effectuée selon la méthode de (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008).

Mode opératoire

Un mélange réactionnel est constitué de 30 µl d'O-Phénanthroline à 0.5%, 50 µl de FeCl₃, 110 µl de méthanol et 10 µl d'extrait à différentes concentrations. Après incubation du mélange à 30°C pendant 20 min, les absorbances sont mesurées à 510 nm. Les résultats sont exprimés en A 0.5 µg/ml.

V.1.2 Activité photo-protectrice

Le facteur de protection solaire SFP peut être mesuré *in vitro* permettant la détermination de l'efficacité de l'écran solaire ; plus le SFP est élevé plus la protection est excellente. La détermination du facteur de protection solaire SFP des extraits et des huiles essentielles de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* a été réalisée selon le protocole de (Mansur *et al.*, 1986).

Mode opératoire

Les échantillons sont préparés à la concentration de 2mg/ml (dilués dans l'éthanol absolu) puis analysés à des longueurs d'ondes 290 à 320nm avec l'utilisation de l'éthanol comme solution blanc. Le SFP est calculée selon la formule suivante :

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{Où :}$$

EE(λ) : Le spectre des effets érythémiques.

I(λ) : Le spectre d'intensité solaire.

Abs(λ) : Absorbance.

CF : Facteur de correction (=10).

EE(λ) et I(λ): Valeurs stables.

V.2. Activités biologiques *In vivo*

Afin de mettre au point de nouvelles biomolécules actives et de déterminer leur potentiel thérapeutique, les extraits de plantes médicinales doivent passer par des tests sur les animaux (pharmacologie expérimentale), puis évaluer les effets bénéfiques sur l'homme. Lors des expériences *in vivo* certaines considérations ont été prises en compte comme suit :

- Les extraits phénoliques ont été préparés en suspension dans l'eau physiologique (sérum salé NaCl 0.9%) tandis que les huiles essentielles dans l'eau physiologique additionnée de quelques gouttes de « polysorbate 80 » ; l'ensemble a été formulé aux doses souhaitées.
- Les souris destinées aux expérimentations ont été transportées au laboratoire 24 heures avant l'expérimentation avec leur mise à jeun toute une nuit avec accès libre à l'eau.
- L'administration des extraits a été faite par voie orale « gavage » avec un volume administré de 10 ml/kg du poids corporel de l'animal tel qu'il est recommandé par (OCDE, 2008) (Fig. 25).



Figure 25: Administration des extraits par gavage (cliché personnel).

- Les procédures de manipulation des animaux vivants au cours des expérimentations ont été réalisées selon les règles d'éthiques (minimiser les souffrances).

V.2.1. Test de toxicité

L'évaluation de l'action toxique des extraits de plantes médicinales est indispensable pour considérer un traitement sans danger ; elle permet de définir la toxicité intrinsèque et d'établir le rapport bénéfice/risque de la plante. Les souris de laboratoires sont sensibles aux substances toxiques, et l'administration des extraits en quantités croissantes permet d'évaluer les limites de toxicité (Parra *et al.*, 2001).

V.2.1.1. Test de toxicité aigue

Le but de cette phase exploratoire a été la détection rapide de la toxicité des extraits, l'établissement de la gamme des doses actives ainsi que de noter les variations du comportement et les fonctionnements physiologiques et même les taux de mortalités. La toxicité des extraits étudiés a été déterminée selon la méthode déterminée par (Lorke, 1983).

Mode opératoire

L'étendue approximative de la toxicité a été déterminée par une première étape dans laquelle trois lots de trois souris dont chacun a reçu par gavage les doses 10, 100 et 1000 mg/kg du poids corporel respectivement (Tab. 4).

Tableau 4 : Nombre de mortalités des souris de l'étape 1 et les doses correspondantes pour l'étape 2 (méthode Lorke, 1983).

Doses en mg/kg de poids corporel avec tous les résultats possibles de la première étape du test			Doses choisies pour la deuxième étape du test en fonction des résultats de la première étape			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3	/	1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

*Nombre d'animaux morts / nombre d'animaux utilisés.

Après administration des extraits, les souris sont mis sous surveillance pendant 2h dans le but de noter toutes variations de comportement ou de signes de toxicité. Le taux de mortalité est comptabilisé après 24h d'administration des extraits. En se basant sur les résultats de cette première étape exploratrice, une seconde étape est entamée par des doses spécifiques (Tab2). Dans cette étape, deux souris ont été étudié par lot et les mortalités sont suivies pendant les 24h jusqu'à 14 jours après administration des extraits.

La détermination de la dose létale de 50% des souris est calculée par la moyenne géométrique entre la dose non létale (0/1) et la dose létale (1/1).

V.2.2. Activité anti-inflammatoire (modèle d'œdème induit par la carraghénine)

Le test de l'œdème plantaire à la carraghénine a été choisis pour déterminer l'activité anti-inflammatoire pour un model d'inflammation aigue. Il consiste à induire un œdème localisé par l'injection de la carraghénine dans la partie sub-plantaire de la patte postérieur droite de la souris. C'est un test qui est fréquemment utilisé en raison de sa simplicité, la rapidité d'apparition des réactions (développement rapide de l'inflammation) et dont le mécanisme d'action des anti-inflammatoires est proche des actions des NAIS dans l'arthrite chez l'homme (Otterness et Gans, 1988).

Mode opératoire

Le protocole expérimental suivis est celui élaboré par (Morris, 2003 ; Maheen *et al.* 2015). Au total 8 lots de 6 souris chacun ont étaient pesés et identifiés par un marqueur indélébile, ensuite mis à jeun pendant 12 h avant le test anti-inflammatoire.

Le **lot I** (témoin) a été traité par l'eau physiologique (10 ml/kg), **lot 2** (témoin positif) traité par l'indométacine (10 mg/kg), tandis que le reste des **lots 3, 4, 5, 6, 7 et 8** ont été traités avec les extraits phénoliques et les huiles essentielles des plantes étudiés a la dose de 100 mg/kg. Les diamètres des pattes des souris ont été mesurés avant injection à l'aide d'un pied à coulisse (V_0). Après 30 minutes d'administration des traitements par gavage de l'ensemble des lots, 50 μ l de la solution de carraghénine à 1% à été injecté à chaque souris par voie sous-cutanée au niveau de a partie sub-plantaire de la patte postérieur. Les diamètres des pattes injectés ont été mesurés après 60, 120,180, 240 et 300min (T_{1h} , T_{2h} , T_{3h} , T_{4h} , T_{5h}) (Fig. 26).

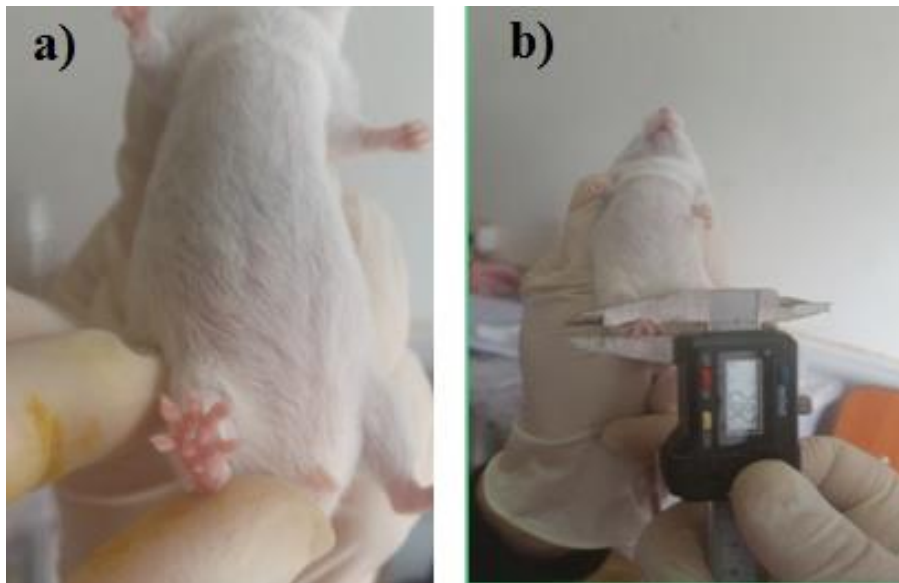


Figure 26 : a) forme de la patte après injection a la carraghénine ; b) et mesure du diamètre d'œdème.

L'œdème des pattes des souris traitées a été comparé avec le témoin négatif ainsi l'évolution de l'œdème a été déterminée par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \left[\frac{(V_n - V_0)}{V_0} \right] \times 100.$$

Où :

V_n : volume de la patte au temps n

V_0 : volume initial de la patte

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition d'œdème suivant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{[(V_n - V_0)_{\text{témoin}} - (V_n - V_0)_{\text{traités}}]}{(V_n - V_0)_{\text{témoin}}} \right] \times 100.$$

V.2.3. Activité analgésique : model plaque chauffante (Hot plate)

Le nociception et l'action anti-nociceptive des traitements administrés sont évalués expérimentalement sur des souris en mesurant la réponse motrice comportementale résultant d'un stimulus nociceptif (Le Bar, 2001).

Le test qui a été choisis pour l'activité anti-nociceptive est le model de la plaque chauffante (Eddy et Leimbach, 1953) qui implique une réponse analgésique centrale. Ce test est basé sur les comportements répulsifs des souris suite a la stimulation thermique et qui se traduisent d'abord par le léchage de leurs pattes puis aux sauts de façon a s'échapper de la chaleur. Les extraits étudiés sont évalués pour leurs effets analgésiques en permettant l'augmentation du temps de latence du léchage/saut (Fig.27).



a) Souris en phase de latence b) Souris en saut après douleur nociceptive

Figure 27 : Photo de l'activité analgésique sur plaque chauffante

Protocole opératoire

Le protocole suivi dans ce test est celui élaboré par Suresha *et al.*, (2014) .Avant de tester l'effet anti-nociceptif, seuls les souris qui ont montrés des réponses nociceptives (lécher les pattes ou sauter) dans le test préliminaire a une durée moins de 15 secondes sont retenues

pour l'expérimentation afin d'éviter les souris présentant des déficits neurologiques ou moteurs.

Les souris ont été subdivisées en huit lots de 6 chacun dont lot1 a été traité par gavage avec de l'eau physiologique, le lot 2 a été traité avec de l'ibuprofène 10 mg/kg. Les lots 3, 4, 5, 6, 7 et 8 ont été traités par les extraits à la dose de 100 mg/kg.

Après 30 min d'administration du traitement, les souris sont placées sur la plaque chauffante à une température de $55\pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 26 a) et le temps de latence qui est définis comme le temps en secondes que peut supporter les souris (Fig. 26 b). Un temps de coupure de 45 secondes et 10 secondes a été utilisé pour éviter les dommages tissulaires lors des tests sur la plaque chauffante.

VI. Analyses statistiques :

L'ensemble des dosages phytochimiques et des tests d'activités biologiques *in vitro* ont été effectués en trois répétitions tandis que pour les tests *in vivo* en six répétitions. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm écart-type après utilisation de l'Excel 2010. L'analyse statistique a été effectuée par l'usage du logiciel « IBM SPSS » avec évaluation des différences entre les moyennes par analyse de la variance a un seul facteur (ANOVA) suivi d'une comparaison par le Tukey test. Les différences statistiques ($P < 0.05$) sont considérées comme significatives.

Résultats et discussion

I. Enquête ethnobotanique

Les résultats de l'enquête ethnobotanique sont décrits selon les réponses de chaque question posés en deux parties:

I.1. Partie de l'informateur

I.1.1. Selon l'âge

D'après les résultats obtenus dans l'enquête ethnobotanique des deux plantes sélectionnées *T. serpyllum* et *T. vulgaris* de la région de Mascara, les personnes âgées plus de 50 ans représentent 45% des personnes ayant répondues au questionnaire. Suivi de la tranche d'âge 20-29 ans qui a enregistré un recours à la phytothérapie suite aux expériences transmises des personnes âgées. Les tranches d'âges restantes ont marqués des pourcentages homogènes et très proches (Fig. 28).

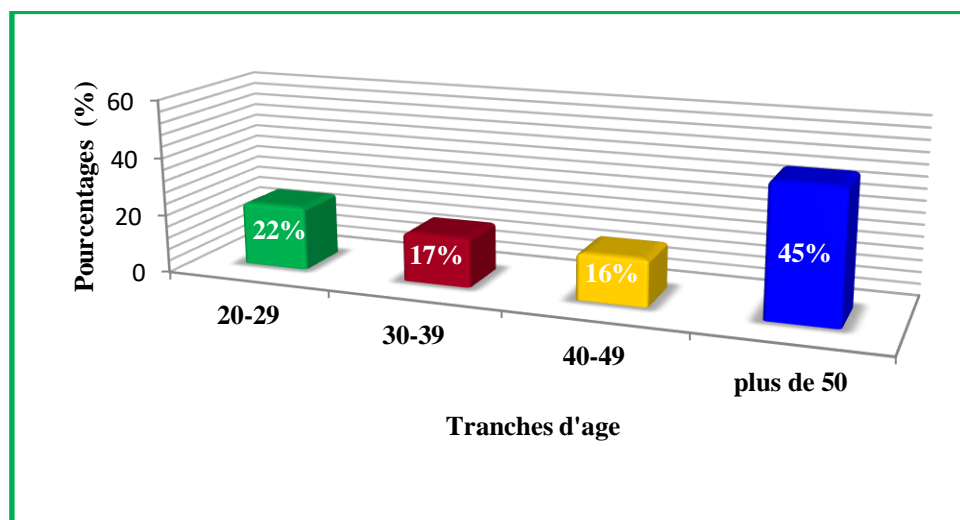


Figure 28 : Répartition des usages des plantes selon l'âge.

L'analyse de ces résultats montre que la fréquence d'utilisation des plantes médicinales est liée à l'âge de personnes interrogées. La prédominance de la tranche d'âge de plus de 50 ans est en concordance avec les résultats de (Mikouet *al.*, 2016). Nanovaet *al.*, (2015) ont étudiés le thym et ont obtenus des résultats similaire dans la prédominance de cette tranche d'âge et qui peut être traduit par le fait que la connaissance des propriétés et des utilisations des plantes médicinales sont généralement acquises avec l'âge et avec des expériences transmises d'une génération à l'autre.

La tranche de population de 20-29 ans argue son recours à la médecine traditionnelle suite aux échecs et l'augmentation de la résistance aux traitements conventionnels. Ceci permet d'assurer une certaine transmission de connaissances en phytothérapie par les générations. Le reste des tranches d'âges interrogés (30-39 ans et 40-49 ans) ont enregistré une utilisation qui devient moins fréquente selon leurs arguments portés sur les résultats moyens que peuvent se procurer par l'utilisation des plantes médicinales par rapport aux résultats rapides des traitements pharmaceutiques conventionnels.

I.1.2. Selon le sexe

Suivant les résultats illustrés dans la (Fig.29), un pourcentage de (66%) a été enregistré dans la fréquence d'utilisation des plantes médicinales en thérapie par rapport aux hommes qui ont enregistré (34%). Ceci peut être expliqué par le fait que les femmes sont plus responsables dans l'entretien et la prise des traitements en cas de maladies dans les foyers.

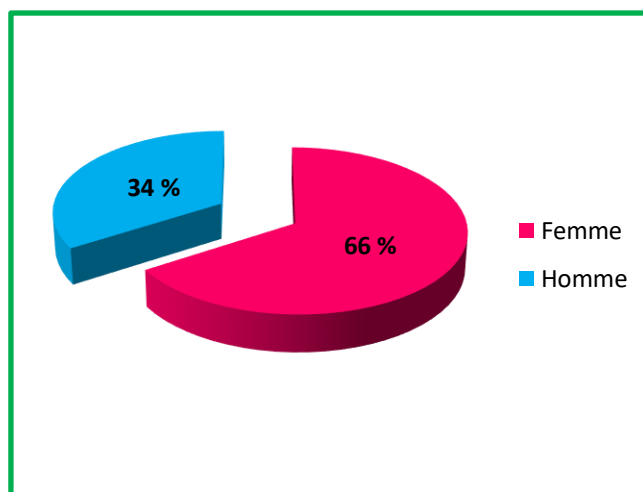


Figure 29 : Répartition de l'usage de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* selon le sexe.

Ces résultats confirment d'autres réalisations ethnobotaniques de Benlamdini *et al.*, (2014); Souilah *et al.*, (2018) qui ont prouvé que les femmes sont plus expertes et praticiennes dans l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales en raison de leurs responsabilités en tant que mères qui prodiguent les premiers soins à leurs enfants et héritières d'un grand savoir familial par transition de connaissances de mères en filles.

I.1.3 . Selon le niveau académique

Suivant les résultats de l'étude ethnobotanique selon le niveau académique (Fig.30), les analphabètes représentent le pourcentage le plus élevé (42%) ce qui traduit leur forts connaissances en phytothérapie. Suivis du niveau primaire avec (27%) et la tranche universitaire qui a enregistré un pourcentage (19%). Cette tranche, peut traduire sa faible utilisation des remèdes traditionnels par le recours a la médecine conventionnelle de part leur rapidité dans les processus de guérison.

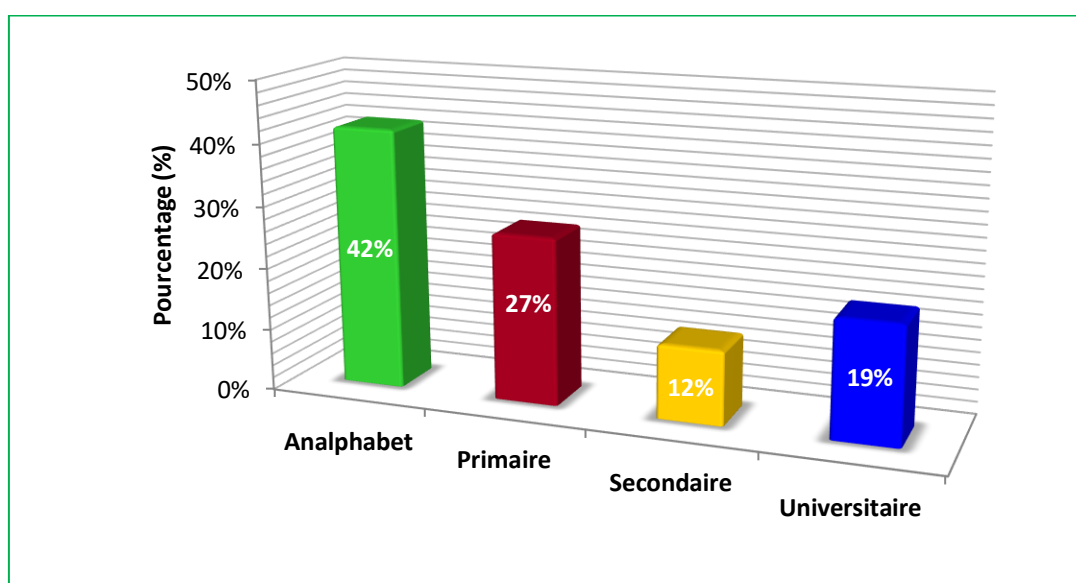


Figure 30 : Répartition d'usage de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* selon le niveau académique

Les résultats obtenus dans cette étude sont similaires a ceux des résultats des travaux ethnobotaniques de Benlamdini *et al.*, (2014) qui ont étudiés plusieurs familles de plantes médicinales et dont a été présente la famille des lamiacées avec deux espèces de thym et qui ont trouvés que le pourcentage des personnes enquêtés analphabètes été le plus élevé avec un pourcentage de (41%), suivis de ceux avec le niveau primaire(26%), puis le niveau secondaire et universitaire avec des pourcentages de 24 % et 9% respectivement. Kayani *et al.*, (2014) ont réalisés une étude ethnobotanique sur le *T. serpyllum* et ont révélés des résultats qui concordent avec les résultatsde cette présente étude avec des pourcentages de 36.9 %, 20.9%, 18.5% et 11.5% des personnes enquêtés analphabètes, de niveau primaire, secondaire et universitaire respectivement.

I.2. Partie de la plante

I.2.1. Usage de la plante

Les résultats obtenus dans cette partie de l'enquête révèlent une hétérogénéité dans l'utilisation des deux espèces de thym sélectionnées où le *T. serpyllum* est utilisé à des fins thérapeutiques par (78%) par la population locale de la région de Mascara et (22%) l'utilisent à des fins culinaires (Fig. 31 a). Cependant le *T. vulgaris* est largement utilisé en alimentation (aromatisant) par (70.6%) alors que (29.3%) l'utilisent à des fins thérapeutiques (Fig. 31 b).

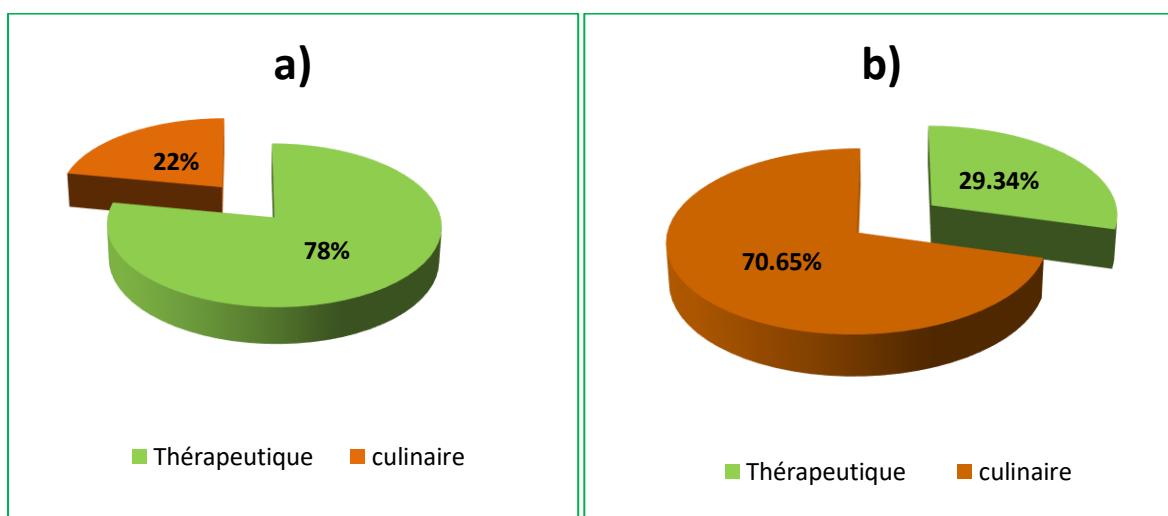


Figure 31: Répartition d'usage des plantes sélectionnées

a) *T. serpyllum*; b) *T. vulgaris*.

Selon Jarić *et al.*, (2015) ; Dauqan et Abdullah, (2017), le *T. serpyllm* et le *T. vulgaris* sont très utilisés en thérapeutiques aussi bien que dans les pratiques culinaires comme herbes importantes dans l'aromatisation des viandes rouges et poissons.

I.2.2. Parties utilisés de la plante

L'enquête ethnobotanique sur les deux espèces de thym sélectionnées de la région de Mascara, nous a permis de connaître les différentes parties utilisés par la population locale où (58.66%) des personnes enquêtés sur *T. serpyllum* ont révélés qu'ils utilisent la partie aérienne (tige, feuille et fleurs) suivie de (36%) qui utilisent uniquement les feuilles tandis que (4%) et (1.33%) utilisent les fleurs et les racines respectivement (Fig. 32 a).

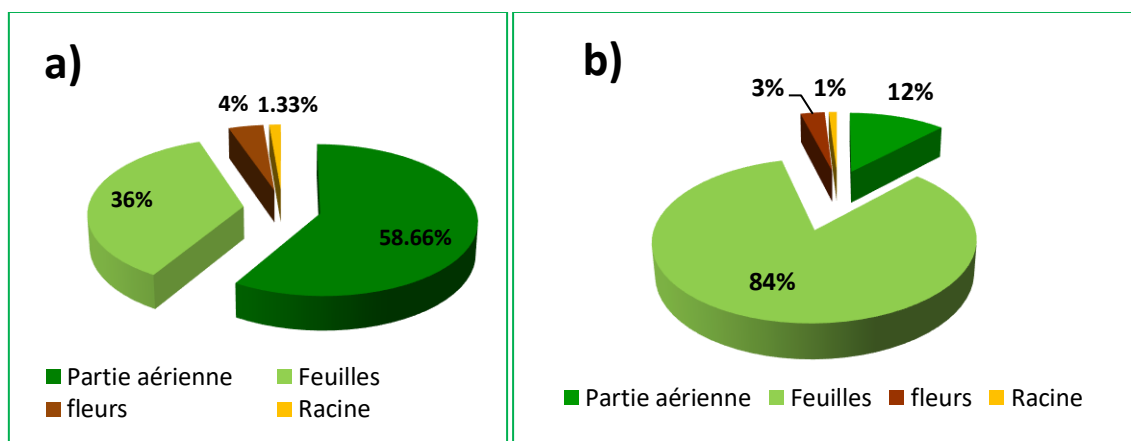


Figure 32: Répartition des parties utilisées a) *T. serpyllum* ; b) *T. vulgaris*.

Concernant le *T. vulgaris* (Fig. 31b), les feuilles sont les plus utilisés par la population locale dans les différents usages thérapeutiques et culinaires avec un pourcentage de (84%), suivis de la partie aérienne par (12%) de la population et par la suite viennent les fleurs et la racine avec (3%) et (1%) respectivement.

Selon Rhattas *et al.*, (2016), l'utilisation fréquente des feuilles des plantes médicinales s'explique par la facilité et la rapidité de la récolte ainsi qu'elles représentent les sites de stockage des métabolites. Aussi, l'utilisation des feuilles ne compromet pas la régénération des plantes se qui assurera une préservation de la richesse végétale. En revanche, la partie aérienne des plantes est la plus dominante dans les pratiques thérapeutiques néanmoins, la cueillette de cette partie se fait parfois sans discernement par les herboristes qui ont tendance à déraciner l'ensemble de la plante plutôt que de cueillir la partie souhaitée contribuant ainsi à la dégradation des ressources naturelles (Benlamdini *et al.*, 2016).

I.2.3. Mode de préparation

L'analyse de l'enquête ethnobotanique sur le mode de préparation à des fins thérapeutiques a révélé une dominance de l'infusion avec un pourcentage de (53.3 %) suivi de la décoction avec (38.66%) et enfin (8%) de la population restante utilisent le *T. serpyllum* sous forme cru (Fig. 33a)). Cependant dans la figure 33b) le *T. vulgaris* est utilisé par les trois modes de préparations cités auparavant avec des pourcentages de 36.95%, 34.78% et 28.26% sous forme cru, infusion et décoction respectivement.

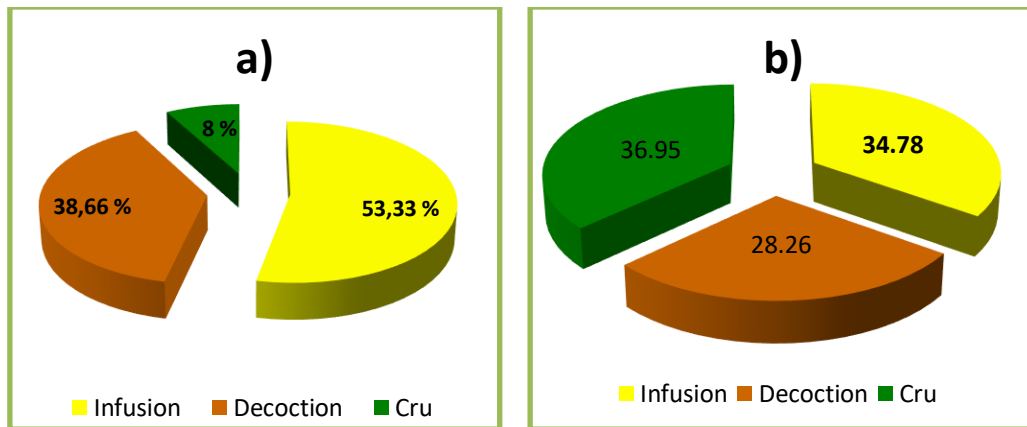


Figure 33: Répartition du mode de préparation

a) *T. serpyllum* ; b) *T. vulgaris*.

Les travaux de Mikou *et al.*, (2015) ont révélés que l'infusion a dominée le mode d'utilisation du *T. vulgaris* par la population enquêtée tandis que les travaux de Cavero *et al.*, (2011) montrent que l'infusion et la décoction sont les principaux mode de préparation du *T. vulgaris* cités a des fins thérapeutiques.

I.2.4. Maladies traités

L'enquête ethnobotanique a révélée que les deux espèces de thym sélectionnées sont utilisées par la population locale de la région de Mascara dans le traitement de plusieurs maladies particulièrement pour les maladies respiratoires, ostéo-articulaires, digestives, dermatologiques et génito-urinaires.

Afin d'estimer la valeur des deux plantes sélectionnées dans le traitement de différentes pathologies, la valeur d'usage (UV) et le niveau de fidélité (FL) ont été calculées. En ce qui concerne la valeur d'usage UV des espèces citées, nous avons constaté que *T. serpyllum* était fréquemment utilisé par les informateurs locaux de la région de Mascara avec une UV la plus élevée de 0,986 (148 rapports d'utilisation) tandis que le *T. vulgaris* a présenté une UV de l'ordre de 0.746 (112 rapports d'utilisation). Les résultats obtenus concordent avec les travaux de Benarba *et al.*, (2015) qui ont enregistré une valeur d'usage UV de l'ordre de 0.883 pour le *T. vulgaris*.

Les valeurs des niveaux de fidélité FL liées à l'utilisation de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* dans chaque type de maladie, sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Niveaux de fidélités FL des deux espèces étudiées

Types d'affections	FL (%) <i>T. serpyllum</i>	FL (%) <i>T. vulgaris</i>
Respiratoires	83.33 %	43.33 %
Dermatologiques	23.33%	6.68%
Ostéo-articulaires	66.66 %	6.66 %
Génito-urinaires	30 %	3.33 %
Digestives	50 %	16.66 %
Autres	13.33 %	20 %

Les niveaux de fidélités FL pour le *T. serpyllum* sont plus élevés que ceux enregistrés pour le *T. vulgaris*, particulièrement pour les maladies respiratoires, articulaires et digestives. Les maladies respiratoires dominent surtout la toux et les allergies saisonnières. Le *T. serpyllum* a enregistré un FL de (83.33%) dans le traitement des maladies respiratoires ce qui prouve la grande dépendance de la population de la région de Mascara dans leurs traitements traditionnels a base de plantes médicinales.

Les valeurs de niveaux de fidélité FL de *T. vulgaris* concordent avec les travaux de Benarba *et al.*, (2015) qui ont enregistrés des valeurs FL de (55.26%) pour les maladies respiratoires. Selon Kayani *et al.*, (2014), le *T. serpyllum* du nord Pakistanais a révélé des valeurs très proches a ceux enregistrés dans la présente étude avec des valeurs d'UV et FL de l'ordre de 1% et 4% respectivement.

II. Etudes phytochimiques

II.1. Extraction des huiles essentielles

II.1.1. Rendements et caractéristique organoleptiques

Les rendements et les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites par hydro-distillation de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* sont représentés dans le (Tab.6)

Tableau 6 : Rendements et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Plante	Rendement	Caractéristiques organoleptiques		
		Aspect	Couleur	Odeur
<i>T. serpyllum</i>	5.66%	Liquide	Jaune clair	Forte, caractéristique du thym
<i>T. vulgaris</i>	0.48%	Liquide	Jaune très pale	Odeur douce citronnée

L'huile essentielle extraite de *T. serpyllum* est de couleur jaune clair, de forte odeur et d'aspect liquide. Les résultats obtenus révèlent des rendements nettement variables. Le rendement obtenu de l'huile essentielle de *T. Serpyllum* (5.66 %) est identique aux résultats obtenus dans les travaux Abu-Darwish *et al.*, (2009) sur le *T. serpyllum* de la région d'Akaba et d'El Karak en Jordanie avec des rendements de 5.6 % et 5.4% respectivement. Cependant nos résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus dans les travaux de Wesolowska *et al.*, (2014) en Pologne (2.5 %), (0.48%) au Pakistan par Ahmed *et al.*, (2006) et en Himalaya (0.28%) (Verma *et al.*, 2011).

L'huile essentielle de *T. vulgaris* obtenue est d'un rendement de l'ordre de (0.48%). Ces résultats sont semblables à ceux des travaux de Shabnum et wagay, (2011) et supérieur à ceux trouvés dans les travaux de Atti-Santos *et al.*, (2004) avec un rendement de (0.2%). cependant nos résultats sont inférieurs aux travaux de Borugă *et al.*, (2014) avec (1.25%) et de (Ed-Dra *et al.*, 2021) avec (3.12%) de rendement.

II.1.2. Analyses physico-chimiques des huiles essentielles

Les analyses physico-chimiques des huiles essentielles sont enregistrées dans le tableau 7.

Tableau 7 :Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*

	Indices chimiques		Indices physiques	
	Indice d'acide	Miscibilité a l'éthanol	Densité	Indice de réfraction
<i>T. serpyllum</i>	3.36	1V/ 0.5V	0.893	1.495
<i>T. vulgaris</i>	2.24	1V/V	0.873	1.472

Les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques sont généralement liquides avec des odeurs très aromatiques caractéristiques pour chaque espèce. Leurs propriétés physiques sont déterminées par la mesure de la densité, l'indice de réfraction et le pouvoir rotatoire. La densité enregistrée est de (0.893) pour le *T. serpyllum* et de 0.873 pour le *T. vulgaris* tandis que l'indice de réfraction est de 1.495 et 1.472 pour *T. serpyllum* et *T. vulgaris* respectivement.

On se référant à la norme AFNOR(2005), les critères d'une huile essentielle de meilleure qualité doit présenter une densité comprise entre 0.895 - 0.920. D'après ces résultats l'huile essentielle de *T. serpyllum* est de bonne qualité suivie de l'huile essentielle de *T. vulgaris* qui aussi est de bonne qualité avec une densité de 0.873. En comparant les résultats des indices de réfraction de *T. serpyllum* et *T.vulgaris* avec la norme AFNOR, nos huiles essentielles sont d'excellentes qualités (Tab.7).

Selon Bruneton, (1993) les huiles essentielles se présentent avec un aspect liquide très volatiles, et rarement colorés, douées d'un pouvoir rotatoire. Leur densité est généralement inférieur à celle de l'eau et sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Dans les travaux de Viuda *et al.*, (2008), l'huile essentielle de *T. vulgaris* à présenté une densité de 0.944 et un indice de réfraction de 1.507.

II.1.3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielle extraites de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* a été identifié après analyse chromatographique en phase gazeuse couplé a la spectrométrie de masse (GC/MS). Les composés détectés de l'huile essentielle de *T. serpyllum* ainsi que les temps de retentions et les quantités relatives sont illustrées dans le (Tab. 8).

Tableau 8: Composition chimique de l'huile essentielle de *T. serpyllum*

N°	Tr [sec]	RI [log. Kovats]	Composé	Formule	Classe	[%]
1	303	929	α -Thujene	C ₁₀ H ₁₆	HM	1.0
2	313	937	α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	2.0
3	335	952	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
4	378	979	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
5	400	991	Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	HM	1.1
6	425	1005	γ -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.2
7	436	1012	Iso-sylvestrene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
8	448	1018	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	1.7
9	463	1027	p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	HM	3.9
10	471	1031	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.6
11	509	1050	(E)- β -Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
12	532	1062	γ-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	11.5
13	594	1089	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
14	61	1099	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	2.0
15	771	1167	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	0.2
16	801	1178	Terpinene-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	0.2
17	966	1246	Carvacrol methyl ether	C ₁₀ H ₁₆ O	Phpr	0.3
18	1090	1293	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	MO	7.0
19	1121	1305	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	MO	66.0
20	1376	1407	α -Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	HS	0.1
21	1399	1418	(E)Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	HS	1.1
22	1446	1438	Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	HS	0.1
23	1582	1493	Viridiflorene	C ₁₅ H ₂₄	HS	0.2
24	1650	1522	Delta-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	HS	0.1
25	1772	1572	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	0.1

Total identifié: 99.9%

HM = 22.5 %; MO = 75.4%; HS = 1.6 %; SO = 0.1%; Phpr = 0.3%.

L'analyse chromatographique a permis l'identification de 25 composés pour l'huile essentielle de *T. serpyllum*. Cette dernière est marquée par une composition chimique représentée par 75.4% de monoterpènes oxygénés et de 22.5% d'hydrocarbures monoterpéniques. Le carvacrol a été détecté comme composant majeur à un pourcentage de (66%) suivi par γ -Terpinene(11,5 %), le thymol (7,5 %) et p-cymen (3,9 %) (Fig. 34).

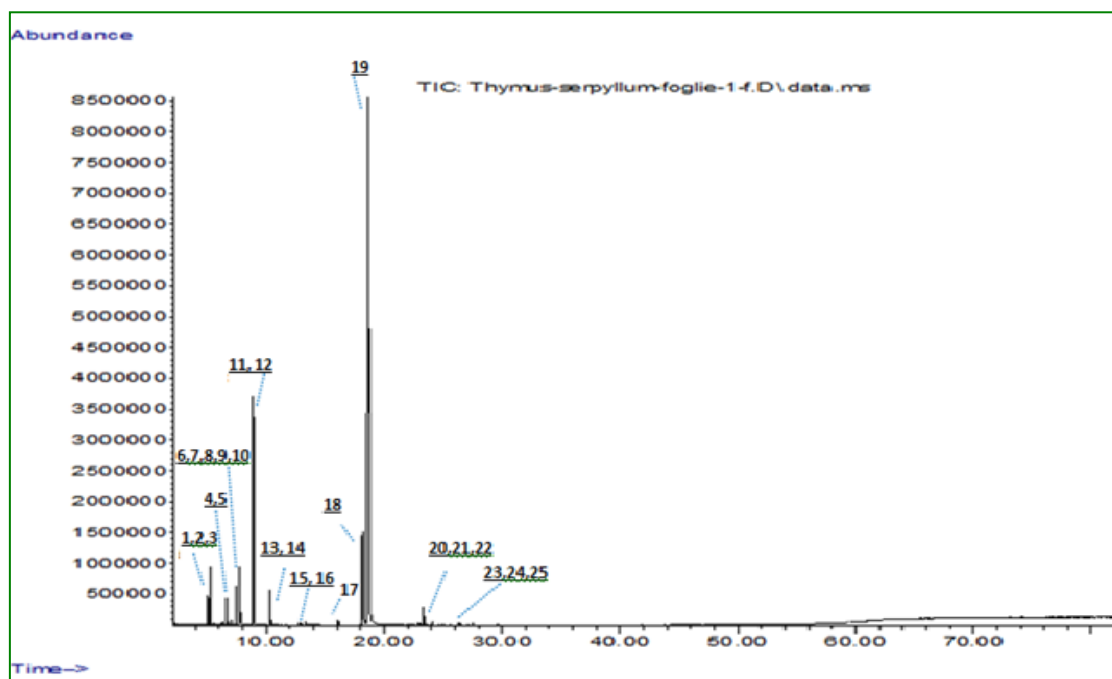


Figure 34: Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. serpyllum*

Cette composition peut prouver que le *T. serpyllum* étudié de la région de Mascara est un thym chemotype à carvacrol. Les résultats de cette présente étude sont en concordance avec les travaux d'Oszagyan *et al.*, (1996) ; Kulisic *et al.*, (2006); Kirillov *et al.*, (2016) qui ont obtenus des pourcentages de carvacrol (45.9%), (49.4%) et (55.85%) respectivement. Cependant notre pourcentage de cravacrol obtenu est nettement supérieur à leurs résultats.

Des différences significatives ont été observées concernant le composant majeur du *T. serpyllum* où le thymol a été détecté à (62.02%) et (38.5%) dans les travaux de Nikolić *et al.*, (2014) et Eweis *et al.*,(2012) respectivement; le p-cymène dans le thym sauvage Italien (D'Auria *et al.*, 2015)et le γ -Terpinene a (22.7%) comme composant majeur dans les travaux de (Sefidkon *et al.*, 2004).

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *T. vulgaris* est illustrée dans le tableau 9.

Tableau 9: Composition chimique de l'huile essentielle de *T. vulgaris*

N°	Tr [sec]	IR [log. Kovats]	Composant	Formule	Classe	Pourcentage [%]
1	303	929	α -Thujene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
2	313	937	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.2
3	335	952	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.3
4	400	991	Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.2
5	448	1018	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	0.1
6	462	1026	Cymene	C ₁₀ H ₁₄	HM	2.1
7	532	1061	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	HM	1.1
8	560	1074	Trans-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	OM	0.3
9	594	1089	Cis- Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	OM	0.4
10	626	1103	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	OM	64.2
11	721	1146	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	OM	0.7
12	772	1167	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	OM	0.1
13	833	1190	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	OM	0.6
14	966	1246	Carvacrol, methyl ether	C ₁₁ H ₁₆ O	OM	0.2
15	998	1258	Linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	OM	2.5
16	1089	1292	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	OM	10.5
17	1113	1301	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	OM	12.5
18	1319	1385	(E)- β -Domascenome	C ₁₃ H ₁₈ O	OM	0.3
19	1399	1417	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	HS	2.3
20	1548	1479	γ -Murolene	C ₁₅ H ₂₄	HS	0.2
21	1783	1580	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	0.8
22	1866	1616	Eudesmol<10- gamma	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	0.2

Total identifié: 99.9%

HM = 4.1 %; MO = 92.3 %; HS = 2,5 %; SO = 1 %.

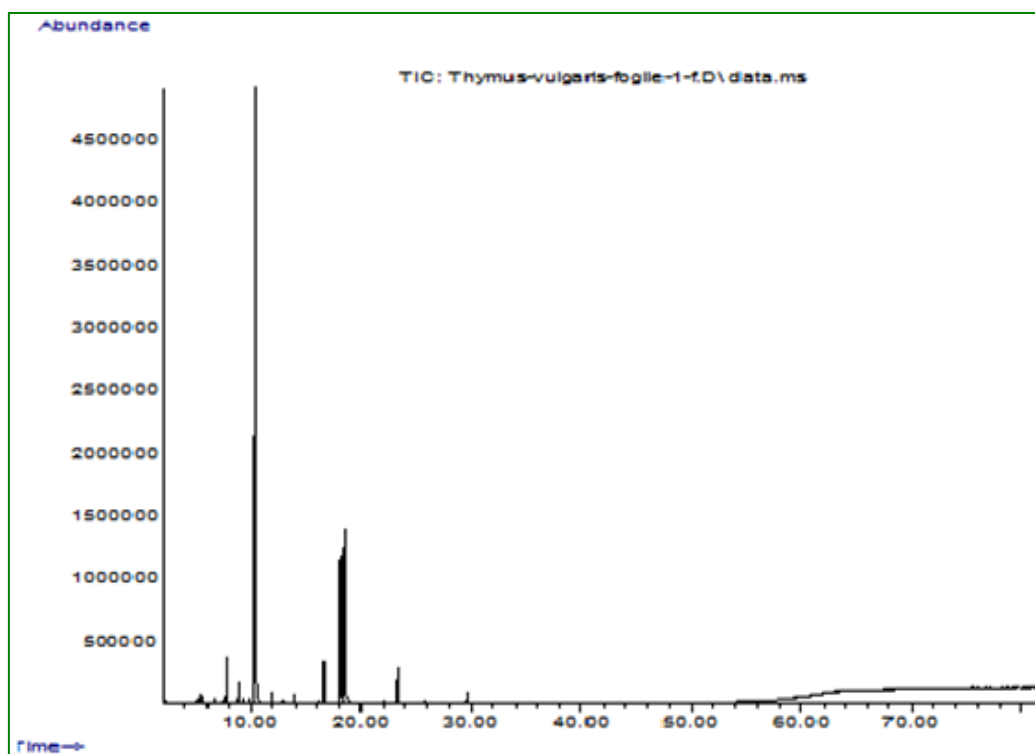


Figure 35: Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. vulgaris*

Les résultats du tableau 9 et la figure 35 ont révélés que le composant majeur dans l'huile essentielle de *T. vulgaris* est le linalool avec un pourcentage de (64.2%) ce qui traduit que le *T. vulgaris* de la région d'El Bordj de la wilaya de Mascara est un thym chémotype à linalool. Le carvacrol et le thymol sont présents avec des pourcentages de (12.5%) et (10.5%) respectivement. D'autres composés sont identifiés mais avec de faibles quantités tel que le cymene, caryophyllene et linalylacetate.

Les résultats obtenus sont similaires a ceux des travaux de Bouguerra *et al.*, (2017) qui ont étudiés un *T. vulgaris* de la région de Blida dont le linalool est le composant majeur avec un pourcentage de 82.88% et celui du *T. vulgaris* de la région de Laghouat avec un pourcentage de 78.1% dans les travaux de (Houicheret *et al.*, 2016).

Kaloustian *et al.*, (2005) ; Schmidt *et al.*, (2012) et Satyal *et al.*, (2016) ont identifiés des *T. vulgaris* collectés du sud Français avec des pourcentages de (77.7%), (68.5%) et (76.2%) de linalool respectivement. Cette similarité de résultats peut être argumentée du fait que les espèces de *T. vulgaris* collectés sont originaires du bassin méditerranéen. Cependant d'autres chemotypes du *T. vulgaris* se distinguent par le thymol comme composé majeur, tel les travaux d'Abdelli *et al.*, (2017) qui ont indiqués un pourcentage de (67.3%) de thymol

dans le *T. vulgaris* de la région de Tlemcen;(34.5%) selon Benameur *et al.*, 2019 tandis que Mardafkan *et al.*, (2015) ont enregistré un pourcentage de (29.98%) de thymol. Boukhatem *et al.*, (2020) ;Zantar *et al.*, (2015)ont indiqués respectivement un pourcentage de (70.97%) et (56.8%) de carvacrol comme composé majeur.

Les rendements et la composition chimique des huiles essentielles peuvent varier qualitativement et quantitativement sous l'influence de facteurs exogènes réglementés sur le plan environnemental (la lumière, les précipitations, nature du sol, altitude... ect) et des facteurs endogènes strictement liés aux caractéristiques génétiques (espèce, chémotype), anatomiques (partie de la plante),et physiologiques (stade de développement, voies de synthèses métaboliques) (Barra, 2009).

Selon Kaloustian *et al.*, (2005), la saison de récolte est impliqué aussi dans les variations des niveaux de terpénoïdes phénoliques et de leurs précurseurs (thymol, carvacrol, linalool etc..).

II.2. Extraction des polyphénols

II.2.1. Les rendements d'extraction des polyphénols

Les rendements d'extraction des polyphénols par macération éthanolique et par infusion de *T. serpyllum* et *T.vulgaris* sont mentionnés dans le tableau 10

Tableau 10 : Rendements et caractéristiques des extraits phénoliques

Extraits	Rendements	Caractéristiques	
		Aspect	Couleur
EETS	15.7 %	Visqueux	Vert foncé
EETV	11 %	Visqueux a granuleux	Vert foncé
AqTS	12.7%	Sec	Marron
AqTV	8.8 %	Sec	Marron

Les résultats obtenus révèlent que le *T. serpyllum* à présenté des rendements en extraits poly-phénoliques supérieurs au *T. vulgaris*. Aussi les extraits éthanoliques enregistrent des taux supérieurs aux infusés des deux plantes.

Selon Prutenau *et al.*, (2018), le rendement d'extrait éthanolique de *T. serpyllum* enregistré est de l'ordre de (5.8%), inférieur à nos résultats (Tab. 9) tandis que le rendement en extrait aqueux (13.17 %) est similaire aux résultats obtenus dans cette présente étude. Cependant pour le *T. vulgaris* le rendement de l'extrait éthanolique (11%) est inférieur aux résultats révélés par Roby *et al.*, (2013) (14.89 %) et par Mehmood *et al.*, (2015) (20.28 %).

II.2.2. Dosage des composés phénoliques

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes (FL) et les tanins (TA) a révélé la richesse des différents extraits de thym en molécules bioactives.

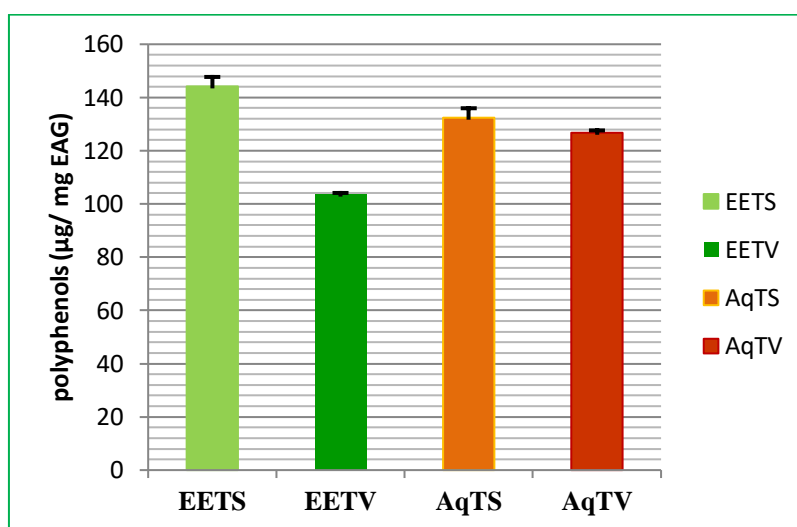


Figure 36: Taux de phénols totaux dans les extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*.

Les résultats présentés dans la figure 36 montrent que les extraits de *T. serpyllum* révèlent une concentration en phénols totaux légèrement supérieure à ceux des extraits de *T. vulgaris*. Aussi la concentration diffère selon la nature des extraits de la même espèce où le taux de flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *T. serpyllum* obtenu est de $60.58 \pm 3.83 \mu\text{g EQ} / \text{mg ES}$ tandis que dans l'infusé est nettement inférieur avec un taux de $18.47 \pm 1.31 \mu\text{g EQ} / \text{mg ES}$ (Fig. 37).

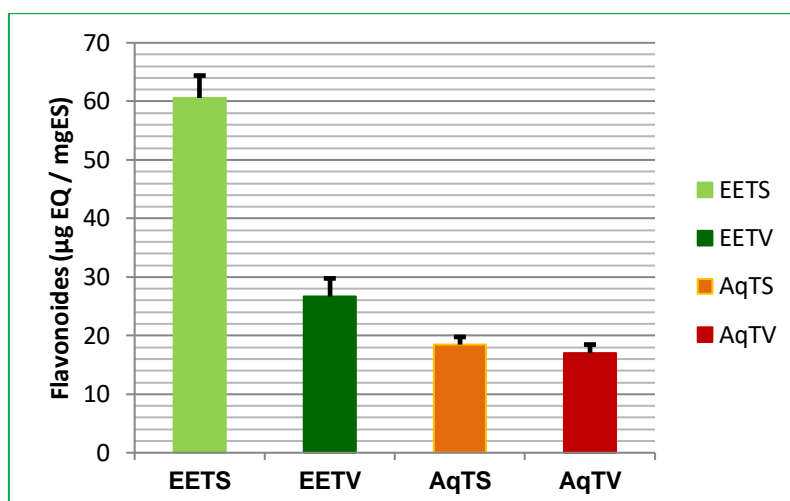


Figure 37 : Taux de flavonoïdes des différents extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*

Le taux de phénols totaux enregistré dans l'extrait éthanolique de *T. serpyllum* est similaire aux résultats obtenus dans les travaux de Brezoiu *et al.*, (2020) où le taux de PPT est de l'ordre de 155.50 mg EAG/ g ES, ainsi que les flavonoïdes sont exprimés en 83.10 mg R/g ES avec la rutine comme flavonoïde le plus abondant. Aussi selon Jovanović *et al.*, (2021) le taux de PPT dans l'extrait éthanolique révélé est de l'ordre de 187.7 mg EAG/g ES, similaire à nos résultats. Cependant le taux de flavonoïdes (110.4 mg EQ/g ES) est supérieur aux résultats obtenus dans cette présente étude.

Sarfaraz *et al.*, (2021) ont rapportés dans leurs travaux sur les extraits méthanoliques de *T. serpyllum* des teneurs en phénols totaux (PPT) et flavonoïdes (FL) de l'ordre de 22.14 ± 0.06 mg EAG/ g ES et 4.36 ± 0.02 mg EQ/g ES, tandis que le *T. vulgaris* a exprimé la teneur en PPT de l'ordre de 37.75 ± 0.05 mg EAG/g ES et 8.70 ± 0.01 mg EQ/g ES en flavonoïdes. Ces résultats mentionnés ci-dessus sont inférieurs en comparaison avec les valeurs enregistrés dans notre étude.

Les extraits éthanoliques et infusés de *T. serpyllum* ont montrés des teneurs en PPT supérieures à ceux des travaux de Miron *et al.*, (2011), où les extraits éthanoliques et aqueux de *T. serpyllum* ont exprimés des taux de l'ordre de 34.57 ± 0.75 mg EAG/g ES et de 91.07 ± 9.25 mg mg EAG/g ES respectivement. En comparant nos résultats obtenus avec ceux des travaux cités auparavant, on peut conclure que les extraits de *T. vulgaris* et *T. serpyllum* de la région de Mascara sont très riches en composés phénoliques par rapports à d'autres régions d'études.

En ce qui concerne le *T. vulgaris*, les résultats obtenus pour la teneur en phénols totaux et flavonoïdes sont similaires aux résultats enregistrés dans les travaux de Amamra *et al.*, (2018) avec des valeurs de $97.11 \pm 2.83 \mu\text{g EAG/mg ES}$ pour les phénols totaux et de $07.63 \pm 0.08 \mu\text{gEQ/mg ES}$ pour les flavonoïdes.

Selon les résultats de Bistgani *et al.*, (2019) l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* a révélé des taux de phénols totaux $16.01 \pm 2.2 \text{ mg EAG/ g ES}$ et de flavonoïdes $13.6 \pm 4.01 \text{ mg EQ/ g ES}$ inférieurs à nos résultats. Cependant dans les travaux de Köksal *et al.*, (2017), le taux de PPT dans l'extrait éthanolique et l'infusé de *T. vulgaris* sont supérieurs à nos travaux avec des taux de $158 \mu\text{g EAG/mg ES}$ et $256 \mu\text{g EAG/mg ES}$. Alors que pour les flavonoïdes, les taux enregistrés sont de l'ordre $44.2 \mu\text{g EQ/mg ES}$ et $36.6 \mu\text{g EQ/mg ES}$ pour l'infusé et l'extrait éthanolique respectivement.

Pour les tanins condensés les valeurs sont similaires pour les différents extraits des deux espèces de thym étudiés avec des taux de $23.06 \pm 3.43 \mu\text{g EC/ mg ES}$ et $25.93 \pm 0.70 \mu\text{g EC/ mg ES}$ pour les extraits de *T. serpyllum* et de $28.73 \pm 0.07 \mu\text{g EC/ mg ES}$, $22.66 \pm 3.47 \mu\text{g EC/ mg ES}$ pour *T. vulgaris* (Fig. 37).

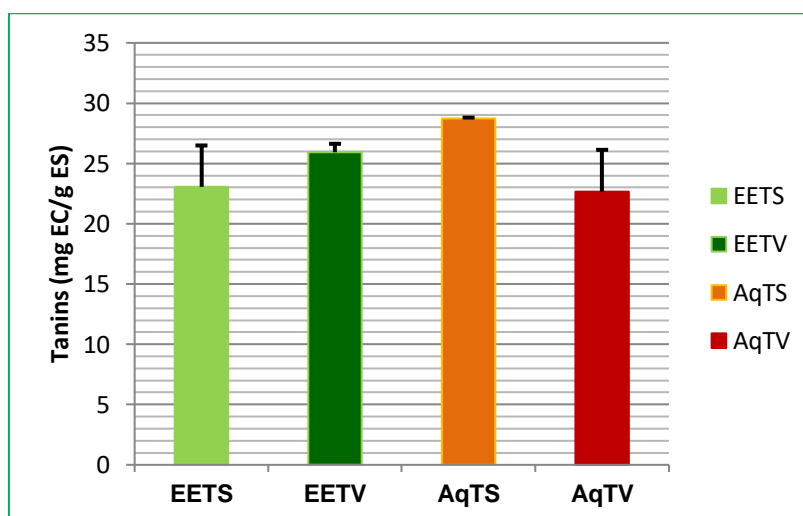


Figure 38: Taux de tanins condensés des différents extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*

La teneur en tanins enregistrée dans l'infusée de *T. vulgaris* mentionnée dans la figure 38 est similaire à celle exprimée dans les travaux de Habashy *et al.*, (2019) avec un taux de $21.49 \pm 1.69 \text{ mg EC/g ES}$ dans l'extrait aqueux du thym Grecque.

La différence dans les résultats obtenus sur les phénols totaux, flavonoïdes et tanins pourrait être due aux méthodes d'extraction et la polarité des solvants. Pendant le traitement et le séchage des échantillons, certains composés actifs volatils peuvent être détruits ou évaporés à partir des échantillons. Selon Jovanović *et al.*, (2016), la stabilité des polyphénols est un aspect très important qui doit être pris en compte pour garantir que les composés polyphénoliques ont les propriétés souhaitées et maintiennent leurs activités et leur structures au cours des différentes étapes du traitement tel que les températures, le temps d'extraction, nature des solvants ainsi que la taille des particules à extraire.

II.2.3. Analyse chromatographique des extraits par HPLC/DAD

Les extraits éthanoliques ainsi que les infusés de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* ont été analysés par chromatographie liquide haute performance HPLC/DAD. La détermination du profil phénolique a été effectuée à l'aide de 15 standards phénoliques. Les résultats ont été exprimés en mg/g d'extrait (Tab. 11).

Tableau 11 : Identification chromatographique des extraits phénoliques

N°	Composés	ET TS (mg/g extrait)	ET TV (mg/g extrait)	Aq TS (mg/g extrait)	Aq TV (mg/g extrait)
1	Acide gallique	0.08	0.05	0.08	0.12
2	Catechine	0.63	0.68	0.68	0.18
3	Acide chlorogénique	0.06	0.05	0.17	0.03
4	Acide caffeique	0.10	0.07	0.02	0.10
5	Acide Hydroxybenzoïque	1.34	0.85	1.02	0.24
6	Epicatechin	0.13	0.58	0.63	0.62
7	Acide syringique	0.05	0.24	-	0.24
8	Acide coumarique	0.06	0.10	-	0.12
9	Acide transférulique	0.25	0.24	0.11	0.05
10	Acide sinapique	0.07	0.05	-	0.09
11	Acide benzoïque	2.45	22.89	5.20	30.45
12	Hesperidine	0.30	0.32	0.61	0.03
13	Acide rosmarinique	0.48	0.38	17.25	0.05
14	Acide cinnamique	0.01	0.14	0.19	0.12
15	Quercétine	-	0.14	-	0.15

La totalité des 15 composés phénoliques standards ont été identifiés dans l'extrait éthanolique et l'infusé de *T. vulgaris*. Cependant pour le *T. serpyllum*, l'acide syringique, coumarique et sinapique n'ont pas été détectés dans l'infusé tandis que la quercétine n'a pas été détectée dans les deux extraits phénoliques.

L'étude chromatographique des extraits de *T. serpyllum* a identifié, l'acide benzoïque comme composé majeur dans l'extrait éthanolique (2.45mg/g) tandis que l'acide rosmarinique est le composant majeur dans l'infusé avec un taux de (17.25 mg/g) d'extrait. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Martins *et al.*, (2015) qui ont détectés l'acide rosmarinique comme composé majeur dans l'infusé de *T. serpyllum* d'Espagne avec un taux de (23.52 mg/g) d'extrait et de Janiak *et al.*, (2017) qui ont analysé l'infusé de *T. serpyllum* de Bulgarie et ont détectés l'acide rosmarinique a un taux de (12.5 mg/g) d'extrait.

L'acide benzoïque a été révélé comme composé majeur pour l'extrait éthanolique et l'infusé de *T. vulgaris* avec des taux de (22.89 mg/g) et (30.45mg/g) respectivement. Cependant Roby *et al.*, (2013) ont rapportés dans leurs travaux la détection de l'acide cinnamique dans l'infusé de *T. vulgaris* d'Égypte comme composé majeur.

L'étude comparative de l'analyse chromatographique des extraits éthanoliques des deux plantes a révélée la présence de l'acide benzoïque comme composé majeur mais avec une valeur très élevée pour le *T. vulgaris* (22.89 mg/g) d'extrait tandis que (2.45mg/g) pour l'extrait éthanolique de *T. serpyllum*. Ces résultats se concordent avec les travaux de Anwar *et al.*, (2022) qui ont détectés l'acide benzoïque comme composé majeur dans l'extrait de *T. vulgaris* dans l'éthanol absolu mais avec une quantité moindre de l'ordre de (0.103 mg/g).

Par comparaison, les infusés de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* ont révélé une différence dans les composés majeurs où l'acide benzoïque a été détecté dans le *T. vulgaris* comme composant principal tandis que l'acide rosmarinique dans l'infusé de *T. serpyllum*.

Selon les résultats constatés, et les travaux rapportés par Jovanović *et al.*, (2019) on peut déduire que les variations dans la composition phénolique des deux espèces de thym étudiés ainsi même au niveau des différents extraits pour chaque espèce dépendent de plusieurs facteurs tel que la nature du solvant (polarité, rapport utilisé), la température et la nature des composés phénoliques (libres ou liés).

III. Activités biologiques

III.1. Activités *In vitro*

III.1.1. Activités anti-oxydante

L'étude des activités antioxydante des extraits et des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* est déterminée selon cinq méthodes qui sont : le piégeage du radical libre DPPH, le radical GOR, détermination de la réduction du cuivre par la méthode CUPRAC, pouvoir réducteur du Fer et la méthode phénanthroline.

III.1.1.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

L'activité anti-radicalaire au DPPH est déterminée par le calcul des pourcentages d'inhibition pour chaque concentration puis détermination des IC_{50} . Les valeurs IC_{50} des extraits phénoliques sont illustrées dans la figure 39.

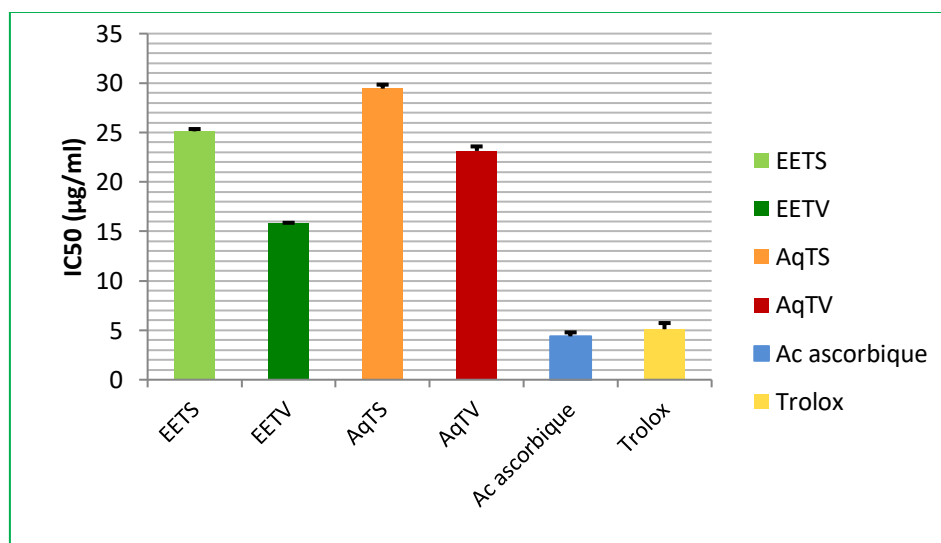


Figure 39 : Les valeurs IC_{50} des extraits de *T. serpyllum* et de *T. vulgaris* (Test DPPH).

Les extraits de *T. vulgaris* ont révélés un pouvoir antioxydant supérieur aux extraits de *T. serpyllum*. L'extrait EETV a donné le plus fort pouvoir antioxydant avec un pourcentage d'inhibition de 82.95 ± 0.3 % a la concentration de $100 \mu\text{g/ml}$ et une faible IC_{50} de l'ordre de $15.79 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ très proche des standards de références.

L'activité antioxydante du EETS a montré une $IC_{50}=25.12\pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ inférieure à celle obtenue dans les travaux de Kulisic *et al.*, (2006), qui ont rapportés des valeurs de ($IC_{50}=450 \mu\text{g/ml}$) et ($IC_{50}=300 \mu\text{g/ml}$) de l'extrait éthanolique de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* respectivement. Aussi le pourcentage d'inhibition enregistré par EETS est supérieur à celui obtenu dans les travaux de Külcü *et al.*, (2019) de l'ordre de ($73.83\pm 1.16\%$) à la concentration de ($100 \mu\text{g/ml}$).

Les extraits EETS et AqTV ont donnés une activité antioxydante similaire avec des valeurs d' IC_{50} de $25.12\pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ et $23.14\pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Cette similarité peut être argumentée par la nature des acides phénoliques qu'ils contiennent. Ceci a été prouvé par les résultats de l'HPLC citées au paravent, qui ont révélés que le composant majeur des deux extraits est l'acide benzoïque.

Les huiles essentielles ont présentées des IC_{50} supérieurs aux extraits phénolique, ce qui ce traduit par une faible activité antioxydante (Fig. 40).

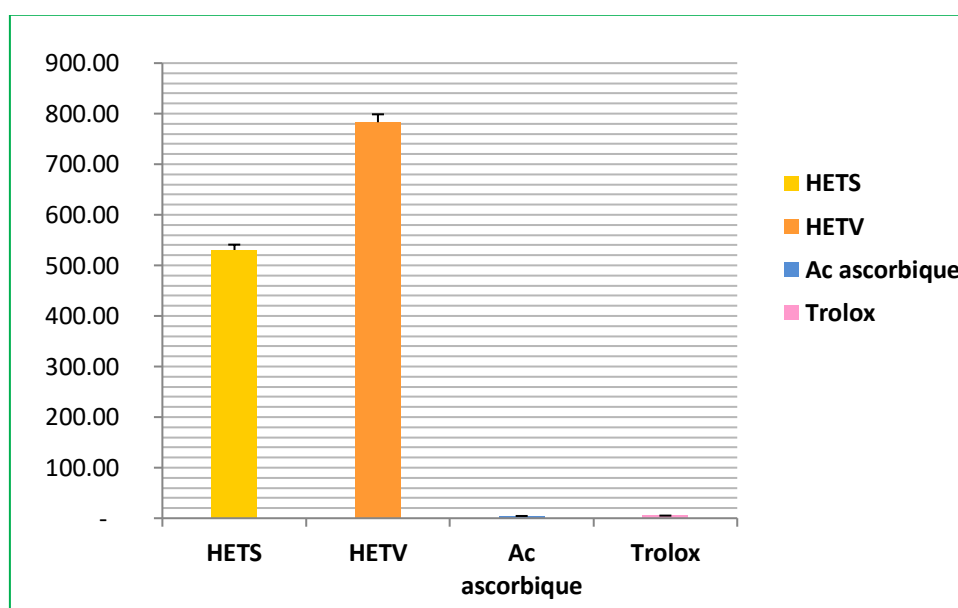


Figure 40: Les valeurs IC_{50} des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test DPPH)

Nos résultats sur les activités antioxydante des huiles essentielles sont plus faibles en comparaison avec les travaux de Mata *et al.*, (2007); Hussain *et al.*, (2013) qui ont obtenus des valeurs ($IC_{50} = 96.9\pm 0.7 \mu\text{g/ml}$) et ($42.9\pm 1.4 \mu\text{g/ml}$) pour l'huile essentielle de *T. serpyllum* du Pakistan et du Portugal respectivement.

L'activité anti-radicalaire **A.A.R** des extraits testés peut être déduite par le rapport inversement proportionnel au IC_{50} . Les résultats sont représentés dans le tableau ci-après.

Tableau 12 : Activité anti-radicalaire des extraits phénoliques et des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris*

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	A.A.R
EETS	25.12	0.0398
EE TV	15.79	0.0633
Aq TS	29.14	0.0343
Aq TV	23.14	0.0432
HETS	510.81	0.0019
HETV	783.01	0.0012
BHA	5.73	0.1745
Ac ascorbique	4.39	0.2277
Trolox	5.12	0.1953

III.1.1.2. Test du pouvoir de piégeage du radical galvinoxyl GOR

Le galvinoxyl est un radical libre stable, peut être réduit de façon irréversible et qui permet de mesurer la capacité de don d'hydrogène par les composés phénoliques. Cette capacité dépend des propriétés redox de leurs groupes hydroxy phénoliques et des relations entre les différentes structures chimiques (Shi *et al.*, 2001). Cette présente étude est la première en évaluation de l'activité de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* dans le piégeage du radical galvinoxyl.

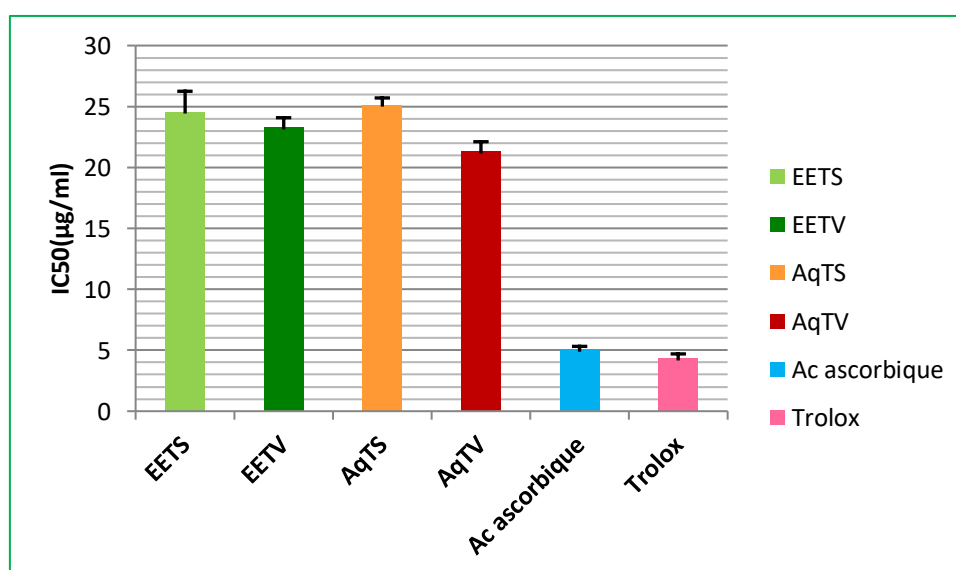


Figure 41: Les valeurs IC_{50} des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test GOR).

D'après les résultats illustrés dans la figure 41 tous les extraits phénoliques ont révélées des valeurs d'IC₅₀ très proches et inférieures à 25µg/ml, ce qui signifie une forte activité des extraits dans le piégeage du radical galvinoxyl GOR. Cette forte activité peut être expliquée par la richesse de ces extraits en acides phénoliques et flavonoïdes. Ces derniers selon Shi *et al.*, (2001) ont la capacité de piéger le radical galvinoxyl grâce aux groupes hydroxyphénoliques actifs attachés aux structures aromatiques par donation d'atome d'hydrogène. Plus les groupes hydroxyles sont présents, plus l'activité est élevée.

Les huiles essentielles ont enregistré des résultats similaires avec des valeurs élevées d'IC₅₀ de l'ordre de 443.40 ±1.47µg/ml pour *T. serpyllum* et 521.27 ±3.75µg/ml pour *T. vulgaris* (Fig.42).

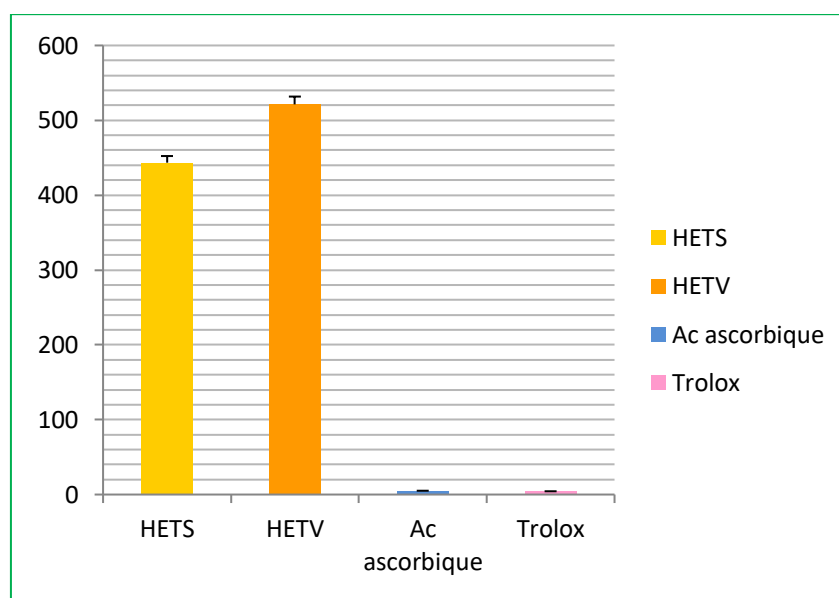


Figure 42: Les valeurs IC₅₀ des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test GOR).

En comparant les résultats de l'activité anti-radicalaire de huiles essentielles par le radical DPPH et celle du GOR on peut noter que les huiles essentielles ont montrés de faibles réactivités par rapports aux radicaux libres testés. Selon Musialik et Litwinienko, (2005) ; Tirzitis et Bartosz, (2010), il est nécessaire de noter que le BHT, qui est un puissant antioxydant de nature hydrophobe, montre une faible réactivité. Certaines de ces complications pourraient être causées par l'ionisation partielle des composés testés, qui affecte le taux de leur réaction avec le DPPH, rendant la réaction pH dépendante.

Sharma et Bhat, (2009) rapportent que l'activité du piégeage du radical DPPH est influencée par la polarité (composé hydrophobes tel que le BHT ont de moindre groupement hydroxyles), la structure chimique et le pH du mélange.

Le DPPH est un radical stable centré sur l'azote (N) tandis que le galvinoxyl est un radical (O) centré. Ceci traduit que la meilleure façon de mesurer l'activité de piégeage des radicaux libres est celle au galvinoxyl, qui serait plus étroitement lié à l'action physiologique aux radicaux oxygénés que du DPPH (Tirzitis et Bartosz, 2010).

III.1.1.3 Test du pouvoir antioxydant par réduction du cuivre CUPRAC

L'activité antioxydante par la méthode CUPRAC est déterminée par la mesure de l'absorbance du (cuivre(I)-néocuproïne) obtenu par réduction du cuivre(II) en cuivre (I) en présence d'antioxydants.

L'infusé AqTV a révélé un fort pouvoir inhibiteur du CUPRAC avec une $A_{0.5}=16.7\pm 0.39$ $\mu\text{g/ml}$, qui est le plus proche aux standards (Fig. 43). Les extraits EETV et EETS ont manifestés une activité inhibitrice similaire avec une $A_{0.5}= 17.38\pm 1.10$ $\mu\text{g/ml}$ et $17.83\pm 0.89\mu\text{g/ml}$ respectivement.

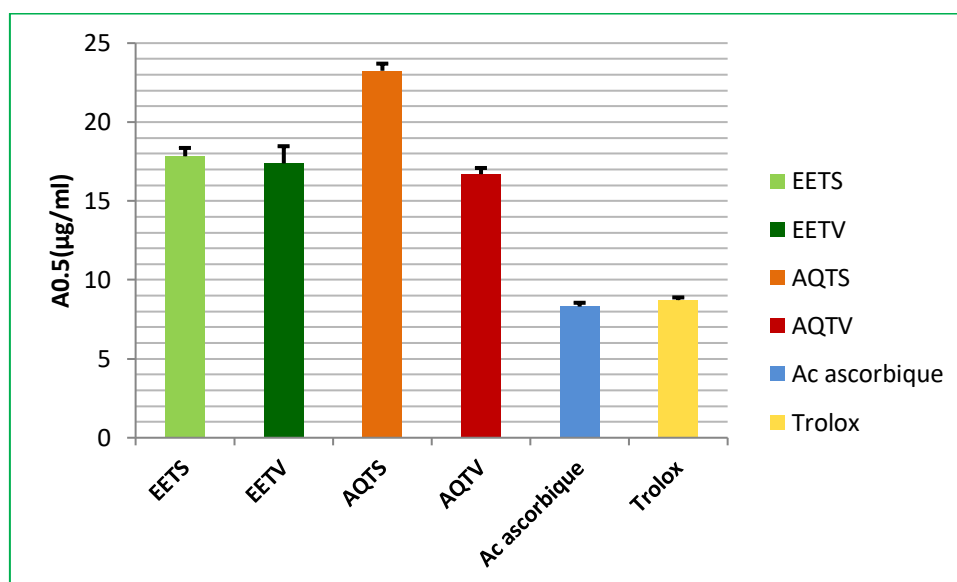


Figure 43: Valeurs $A_{0.5}$ des différents extraits phénoliques de *T. serpyllum* et *T. vulgare* (Test CUPRAC).

Külcüet *al.* (2019) ont révélés une activité réductrice du cuivre plus faible par rapports a nos résultats pour l'extrait éthanolique de *T. serpyllum* de Turquie avec une $A_{0.5} = 250 \mu\text{g/ml}$.

L'HETS a révélée une activité inhibitrice du CUPRAC supérieur à celle de HETV avec une absorbance $A_{0.5} = 37.88 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 44). Le résultat de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *T. serpyllum* par la méthode CUPRAC est rapporté pour la première fois en littérature.

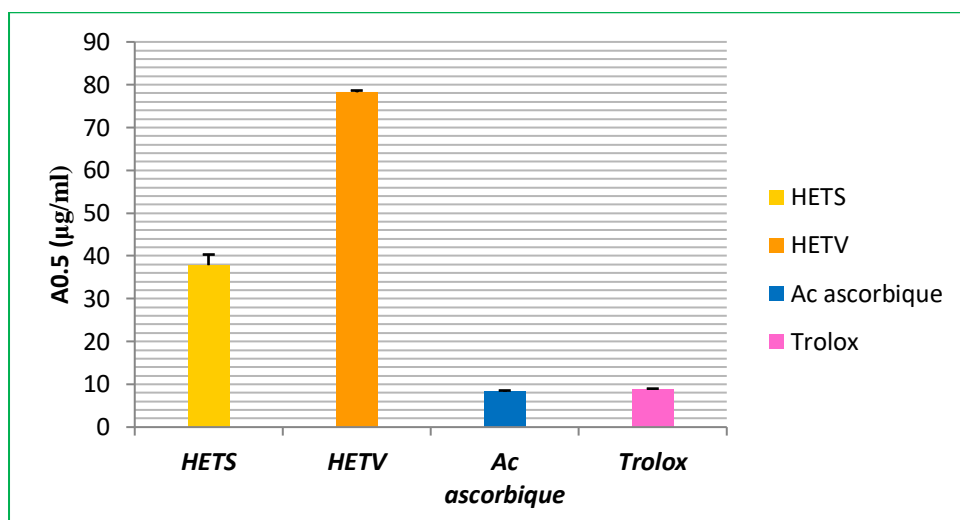


Figure 44: Les valeurs $A_{0.5}$ des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test CUPRAC).

L'huile essentielle de *T. vulgaris* a révélé une activité réductrice du cuivre $A_{0.5} = 82.69 \pm 2.7 \mu\text{g/ml}$ supérieure a celle des travaux de (Nemati *et al.*, 2017) qui ont enregistré une ($A_{0.5} = 524.76 \pm 8.477 \mu\text{g/ml}$). Selon Apaket *al.*, (2004; 2007), la méthode CUPRAC permet l'estimation du pouvoir antioxydant des composé de nature hydrophiles et lipophiles.

La méthode antioxydante CUPRAC est a la fois rapide, stable, non sensible à la dilution et adaptée a une variété d'antioxydants (hydrophiles et hydrophobes). De plus les résultats obtenus des tests *in vitro* peuvent être étendus plus efficacement aux réactions *in vivo* possibles des antioxydants, du fait que la réaction rédox chromogène du CUPRAC s'effectue à un pH (7.0) proche du pH physiologique (Apak *et al.* 2004). Aussi Huang *et al.*, (2005) ont rapportés que la méthode CUPRAC est capable de mesurer les antioxydants de type thiol le glutathion et les thiols non protéiques, Contrairement au test FRAP qui est largement appliqué et non réactif aux antioxydants du groupe SH.

III.1.1.4 Test du pouvoir réducteur du fer ferrique :

Le test du pouvoir réducteur permet la détermination de la capacité à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui est enregistré en mesurant la formation du bleu de Prusse à 700nm. Une absorption accrue indique la capacité des échantillons à agir comme antioxydants en donnant des électrons. Les résultats indiquant le pouvoir réducteur du Fer des extraits phénoliques sont illustrés dans la (Fig. 45).

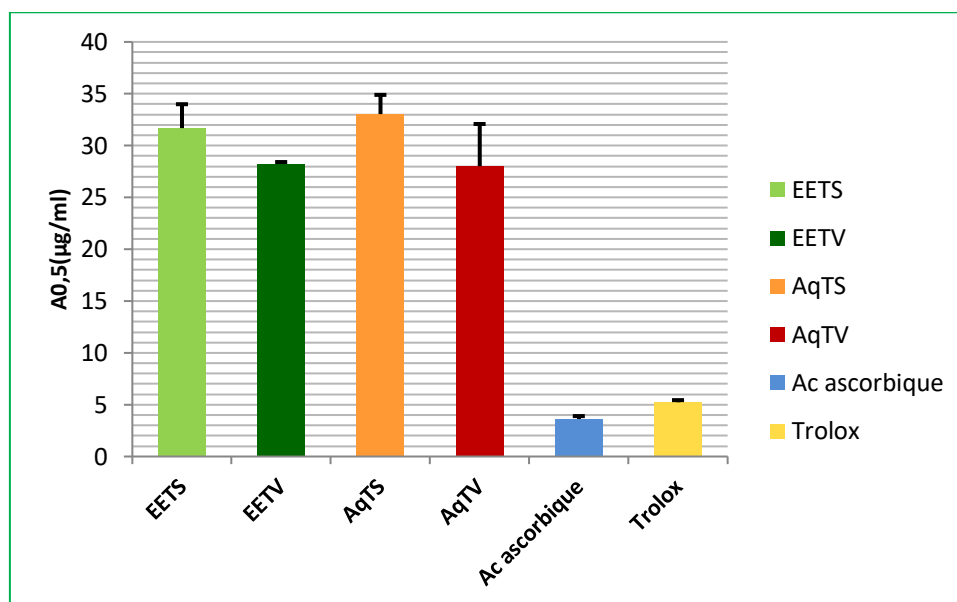


Figure 45: Les valeurs $A_{0,5}$ des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgare* (Test pouvoir réducteur)

D'après la figure 45, tous les extraits ont montrés une forte capacité réductrice du Fer. Le pouvoir réducteur enregistré des extraits EETV et AqTV est supérieur par rapport aux extraits du EETS et AqTS avec des valeurs ($A_{0,5} = 28.26 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$) et ($28.02 \pm 2.07 \mu\text{g/ml}$) respectivement.

Dans les travaux de Martins *et al.*, (2015), l'infusé et l'extrait méthanolique de *T. vulgare* ont révélés des potentiels réducteurs de Fer inférieurs à nos résultats avec des valeurs de $116.8 \pm 2.2 \mu\text{g/ml}$ et $31.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

L'huile essentielle HETS a enregistré un pouvoir réducteur ($A_{0,5} = 226.17 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$) supérieur à l'huile HETV (Fig.46). Cependant cette capacité réductrice est très faible par rapport aux standards.

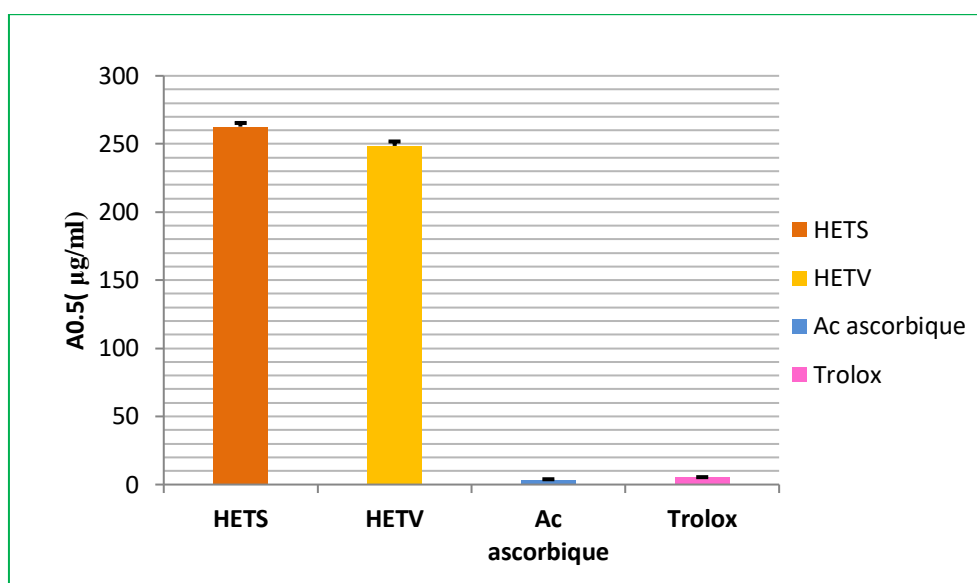


Figure 46 :Les valeurs $A_{0.5}$ des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test pouvoir réducteur)

Les résultats de la présente étude révèlent une capacité réductrice supérieur aux travaux de Nikolić *et al.*, 2014 qui ont montrés que l’huile essentielle a présenté une absorbance $A_{0.5} = 660 \pm 001 \mu\text{g/ml}$. Dans les travaux de Habashy *et al.*, (2018), l’huile essentielle de *T. vulgaris* a montré un potentiel réducteur supérieur a nos résultats avec une ($IC_{50} = 4.27 \pm 0.91 \mu\text{g/ml}$)

Selon Perron et Brumaghim, (2009) les tests qui étudient ce comportement de réduction du Fe^{3+} sont effectués à un pH très bas, ce qui peut être pertinent pour les processus se produisant pendant la digestion dans l’estomac. A pH plus élevé, la formation de complexes bis et tri-polyphénols avec le Fer inhibe ces processus de réduction du Fe^{3+} de sorte que de telles réactions peuvent se produire beaucoup plus lentement. Néanmoins, ce processus de réduction du fer est souvent attribué à la fois à l’activité antioxydante et prooxydante de ces composés (la génération du Fe^{2+} participe dans la réaction de Fenton).

III.1.1.5 Test de l’activité antioxydante par la méthode phénanthroline:

Le 1,10-Phénanthroline est le parent d’une importante classe d’agents chélateurs qui a l’avantage de former rapidement des complexes avec des ions métalliques (Sammes et

Yahioğlu, 1994). La détermination par la phénanthroline est une méthode précise, simple et qui présente une bonne corrélation avec le test FRAP (Yefet *al.*, 2018).

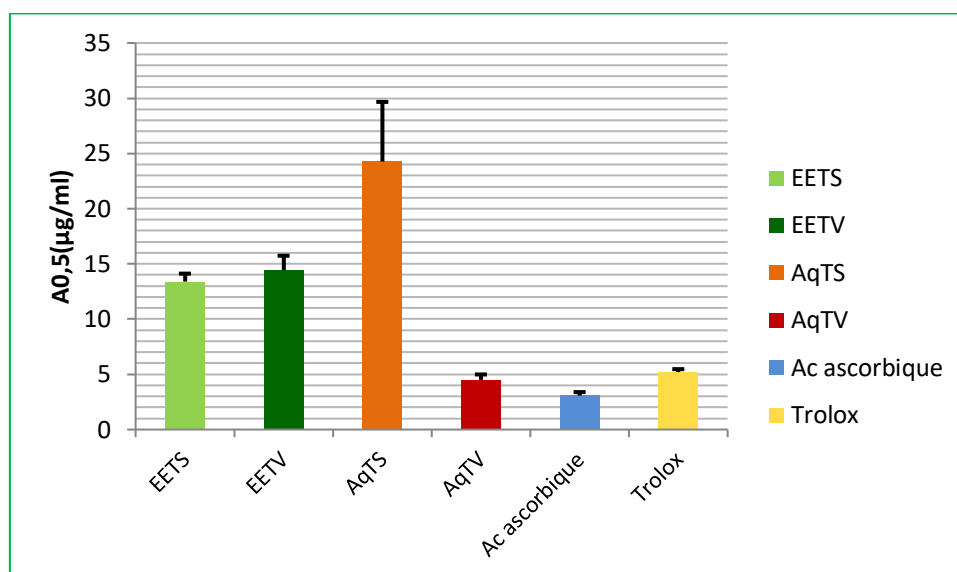


Figure 47 : Les valeurs A_{0.5} des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test phénanthroline).

L'extrait AqTV a révélé la plus forte activité antioxydante par la méthode phénanthroline avec une IC₅₀ = 4.89 ± 1.15 µg/ml égale au standard de référence trolox (IC₅₀ = 5.21 ± 0.27 µg/ml) et très proche du standard acide ascorbique dont l'IC₅₀ = 3.08 ± 0.02 µg/ml. Cependant les extraits EETS et EETV ont montrés des activités similaires avec des valeurs IC₅₀ = 13.40 ± 0.73 µg/ml et 13.45 ± 1.21 µg/ml respectivement (Fig. 47).

Autant que nous puissions savoir, cette méthode a été très peu testée pour les huiles essentielles. Selon Szydłowska-Czerniak *et al.*, (2008), le test de l'activité antioxydante par la méthode phénanthroline est une nouvelle méthode à ions ferriques pour l'évaluation de la capacité antioxydante des huiles végétales. Cette méthode est précise, simple et pratique.

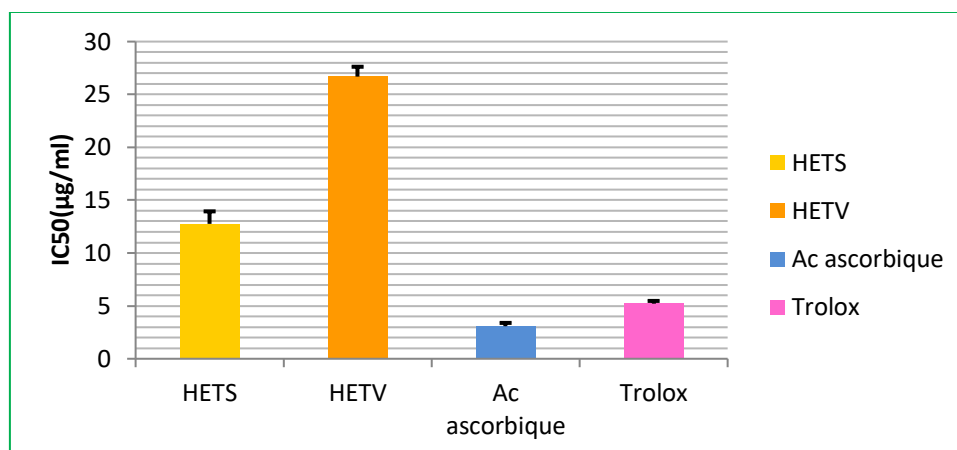


Figure 48 : Valeurs $A_{0.5}$ des huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* (Test phénanthroline)

Selon nos résultats obtenus et illustrés dans la figure 48, l'huile essentielle de *T. serpylluma* révélé une plus grande capacité de réduction et était assez semblable à l'extrait éthanolique. Ceci peut s'expliquer par la richesse en phénols (carvacrol 66 % et thymol 7,5 % comme mentionné ci-dessus dans les résultats GC/MS). Ces résultats sont en conformité avec les travaux de Christodouleas *et al.* (2014) qui ont déclarés que les extraits lipophiles contribuait à plus de 90% à la réduction totale de l'huile par la méthode de la phénanthroline-Fe.

III.1.2. Activité photo-protectrice :

Une multitude de produits de protection solaires de la peau ont été développés afin de réduire les conséquences des coups de soleil, le photo-vieillessement ainsi que l'apparition des cancers de peau. De ce fait, le but de cette présente recherche a été l'étude du pouvoir d'utilisation de produits à base d'extrait de plantes du genre *Thymus* afin d'augmenter la résistance contre les processus photo-destructeurs et d'assurer une protection solaire naturelle de la peau.

L'action dermo-protectrice des différents extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* a été évaluée *in vitro* par la détermination du facteur de protection solaire SFP (Sun Protection Factor). Ce dernier représente l'un des révélateurs le plus couramment utilisé dans la classification des niveaux de protection des produits anti-UVB délétères. Plus le facteur SFP est élevé, une meilleure protection contre les rayons UV par l'écran solaire est offerte.

Les résultats de cette présente étude représentent une contribution originale a la littérature du fait que sa n'a pas été étudié auparavant. Selon les résultats illustrés dans la figure 49, les valeurs des facteurs SFP des extraits phénoliques sont similaires. L'activité photo-protectrice la plus élevée a été enregistrés par l'AqTS et l'EETS avec des valeurs du facteur SFP (38.82 ± 2.23) et (38.34 ± 2.29) respectivement.

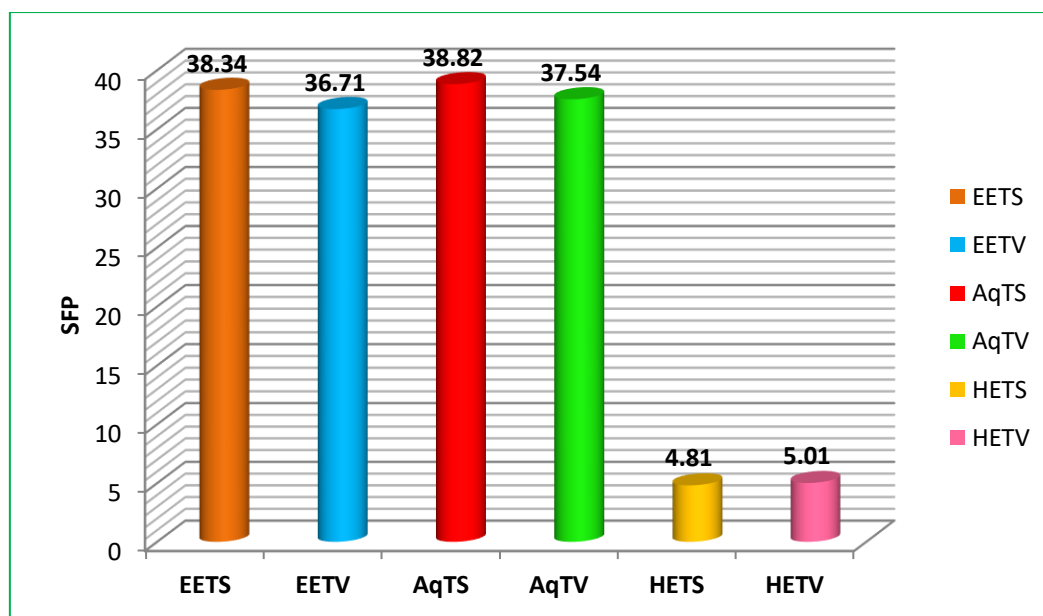


Figure 49 : Valeurs du facteur de protection solaire SFP des différents extraits et huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgare*.

Cette forte activité enregistrée par les extraits phénoliques peu être expliqué par la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes. Selon Stevanato *et al.*, (2014), les flavonoïdes présentent des avantages photo-protecteurs importants de par leurs propriétés antioxydantes et leur capacité d'absorption des rayons UV. La présence d'acide rosmarinique et acide benzoïque comme composants majeurs dans les extraits de la présente étude, peut expliquer l'effet photo-protecteur contre les UV et autres rayonnements. Ceci a été prouvé dans les travaux de (Sánchez-Campillo *et al.*, 2009 ;Johnson *et al.*, 2017). Selon Ratnasooriya *et al.*, (2016), les extraits présentant des valeurs SFP supérieurs a 30 sont considérés comme étant des filtres a rayons UV.

Les huiles essentielles HETS et HETV ont enregistrés les plus faibles valeurs de facteur SFP de l'ordre de 4.81 ± 0.25 et 5.01 ± 0.29 respectivement. Dans les travaux d'Hao *et al.*, (2017), le facteur de protection SFP de l'huile essentielle de thym est supérieur en

comparaison avec nos résultats avec une valeur SFP 12.80. D'après les travaux d'El Anachi *et al.*, (2021), des espèces de la famille des lamiacées possèdent un effet photoprotecteur avec des valeurs SFP supérieures à 30 similaires aux extraits de thym.

III.2 Activités *In vivo*

III.2.1. Etude de la toxicité aigue

Le test de toxicité aigue selon la méthode Lorke 1983 est déterminé en deux étapes qui consistent à déterminer approximativement et progressivement la toxicité des extraits. La première étape a consisté en l'administration des extraits par gavages aux souris des doses de 10 mg/kg, 100mg/kg et 1000mg/kg et dont les résultats sont représentés dans le tableau ci-après.

Tableau 13: Résultats du test de toxicité Lorke (Première étape)

Extraits administrés	Doses		
	10mg/kg	100mg/kg	1000mg/kg
Mortalité après 24 heures			
ETTS	0/3	0/3	0/3
AqTS	0/3	0/3	0/3
HETS	0/3	0/3	0/3
ETTV	0/3	0/3	0/3
AqTV	0/3	0/3	0/3
HETV	0/3	0/3	0/3

L'administration par voie orale des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* ainsi que leurs huiles essentielles aux doses de 10mg/kg, 100mg/kg et 1000mg/kg n'a entraîné aucun signe de toxicité visible (diarrhée) ni de troubles de comportement (convulsions) ainsi qu'absence de toute mortalité après 24 heures d'administration ce qui peut prouver l'absence de toxicité de ces extraits sur les souris test.

Après cette première étape de test de toxicité, une deuxième étape a été entamée avec des doses de 1600mg/kg, 2900mg/kg et 5000mg/kg. Ces doses sont choisies selon les résultats obtenus dans la première étape. Ainsi en l'absence de toute toxicité dans la première étape des doses très élevées ont été testées comme cité auparavant. Les résultats du test de la deuxième étape sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 14: Résultats du test de toxicité Lorke (deuxième étape)

Extraits administrés	Doses		
	1600mg/kg	2900mg/kg	5000mg/kg
	Mortalité après 24 heures		
ETTs	0/2	0/2	0/2
AqTS	0/2	0/2	0/2
HETS	0/2	0/2	0/2
ETTV	0/2	0/2	0/2
AqTV	0/2	0/2	0/2
HETV	0/2	0/2	0/2
Mortalité après 48 heures			
HETS	0/2	0/2	0/2
HETV	0/2	0/2	0/2
Mortalité après 72 heures			
HETS	0/2	0/2	1/2

Les résultats de la deuxième étape révèlent une absence de toxicité après 24 heures d'administration des doses élevées testées (1600 mg/kg, 2900mg/kg et 5000mg/kg). Ceci suggère que nos extraits étudiés ne sont pas toxiques avec une DL₅₀ supérieur à 5000 mg/kg. Nos résultats concordent avec les travaux d'Abdelli *et al.*, (2017), qui ont prouvés l'absence de toxicité des huiles essentielles de *T. vulgaris* d'Algérie.

Aussi Shaban *et al.* (2015) ainsi que Jiménez *et al.* (2006) ont constatés l'absence de toxicité pour l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* d'Égypte et de l'extrait méthanolique du thym commun du Mexique respectivement.

Les extraits ainsi que l'huile essentielle de *T. serpyllum* n'ont montrés aucun signes de toxicité ni mortalités après 24h d'administration. Ces résultats concordent avec les travaux de (Maheen *et al.*, 2015) qui prouvés la non toxicité des extraits éthanoliques et aqueux du *T. serpyllum* du Pakistan avec une DL₅₀ supérieur a 2000 mg/kg avec absence de changement de comportement ou de mortalité.

Après 72h d'observation, une mortalité a été enregistré pour l'HETS à la dose de 5000mg/kg avec absence de toute autre mortalité durant les 14 jours d'observation. Quelques symptômes ont été enregistrés sur la souris testée avec la dose 5000 mg/kg tel qu'une asthénie, une dyspnée, écartement du groupe et un manque d'appétit. Selon Stahl-Biskup et Venskutonis, (2012), ces effets enregistrés sont attribués au terpènes phénoliques thymol et carvacrol.

Suivant les résultats de la toxicité aigue, une dose curative a été choisie de 100mg/kg pour la réalisation des tests des activités biologiques ainsi de comparer l'effet du thym Algérien par rapport a d'autres travaux.

III.2.2. Activité anti-inflammatoire

L'induction de l'inflammation par la carraghénine est un test largement utilisé pour étudier l'activité anti-inflammatoire de bio-produits extrait généralement des plantes aromatiques et médicinales. La carraghénine est un polymère extrait d'algues rouge, couramment utilisé pour induire une inflammation aigue vasculo-exsudative.

L'effet des traitements administrés chez les souris a été prouvé par mesure de la différence des volumes de pattes enflammées du volume de la patte saine (V_0) avec un intervalle de mesure chaque heure pendant 5 heures (V_{1h} , V_{2h} , V_{3h} , V_{4h} et V_{5h}).

La plupart des études sur le *T. serpyllum* ont portés sur les propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydante aussi, sur sa composition chimique. Cependant très peu d'études ont été réalisées sur son effet anti-inflammatoire. Ainsi, nous avons étudié

l'effet anti-inflammatoire des extraits et de l'huile essentielle de *T. serpyllum* par le test d'œdème de la patte induit par la carraghénine.

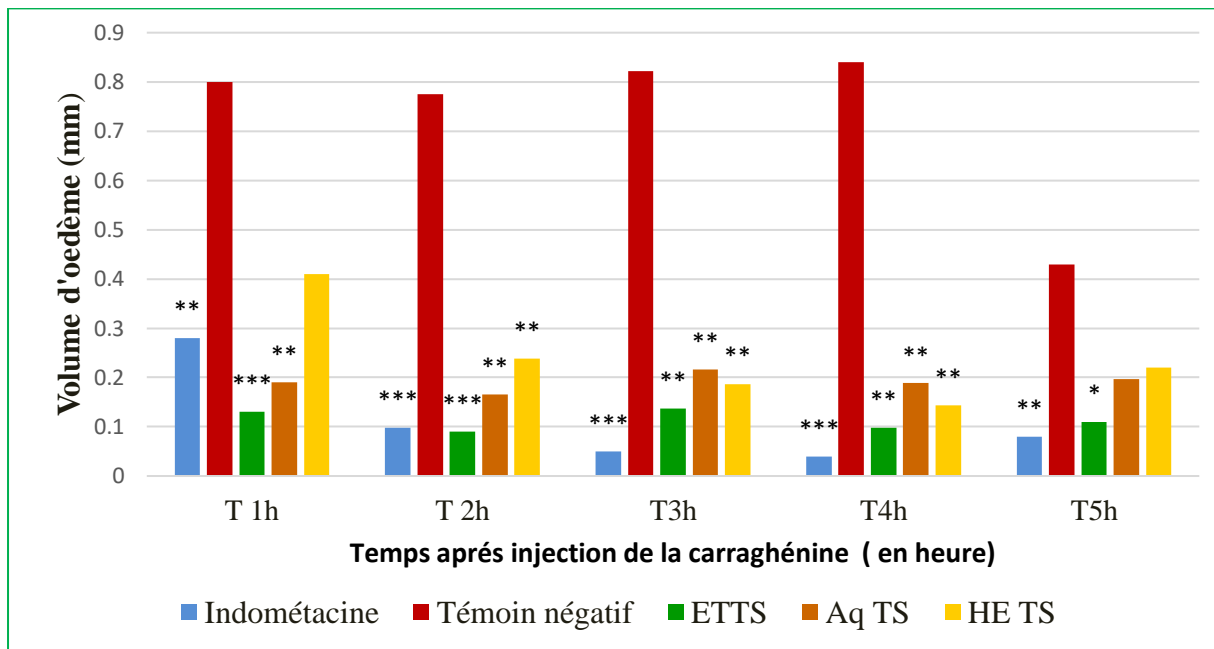


Figure50 : L'évolution de la taille de l'œdème (en mm) en fonction du temps sous l'effet des différents extraits de *T. serpyllum*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=6), *** $P \leq 0,001$ est considéré comme valeur très hautement significatif, ** $P \leq 0,01$ est considéré comme valeur hautement significative et * $P \leq 0,05$ est considéré comme valeur significative par rapport au témoin.

Les résultats exprimés dans la figure50 indiquent que l'injection sous-plantaire de la carraghénine pour le lot témoin a provoqué une augmentation du volume des pattes dès la première heure avec enregistrement d'un maximum de diamètre d'œdème de l'ordre de 0.84 ± 0.31 mm à la quatrième heure T_{4h} .

L'administration par gavage du traitement de référence indométacine à la dose de 10mg/kg a diminué l'œdème de manière très hautement significative ($p < 0.001$) dès la première heure jusqu'à la fin du temps d'expérimentation T_{5h} et où le volume d'œdème le plus faible a été enregistré à T_{4h} de l'ordre de 0.03 ± 0.02 mm.

L'extrait EETS a induit une diminution du volume de l'œdème de manière hautement significative ($P < 0.001$) et de manière plus rapide par comparaison avec l'indométacine dès la première heure (0.13 ± 0.06 mm). Cependant l'extrait aqueux a présenté une diminution hautement significative ($P < 0.01$) de la taille d'œdème au temps T_{2h} avec un diamètre d'œdème de 0.16 ± 0.16 mm.

En ce qui concerne l'HETS, la diminution du volume d'œdème a été enregistrée de manière hautement significative ($P < 0.01$) à T_{3h} mais plus tardive par rapport aux extraits

A fin d'apprécier l'activité anti-inflammatoire de l'indométacine ainsi que les extraits de *T. serpyllum*, les pourcentages d'inhibitions ont été calculés et les résultats sont illustrés dans la (Fig. 51).

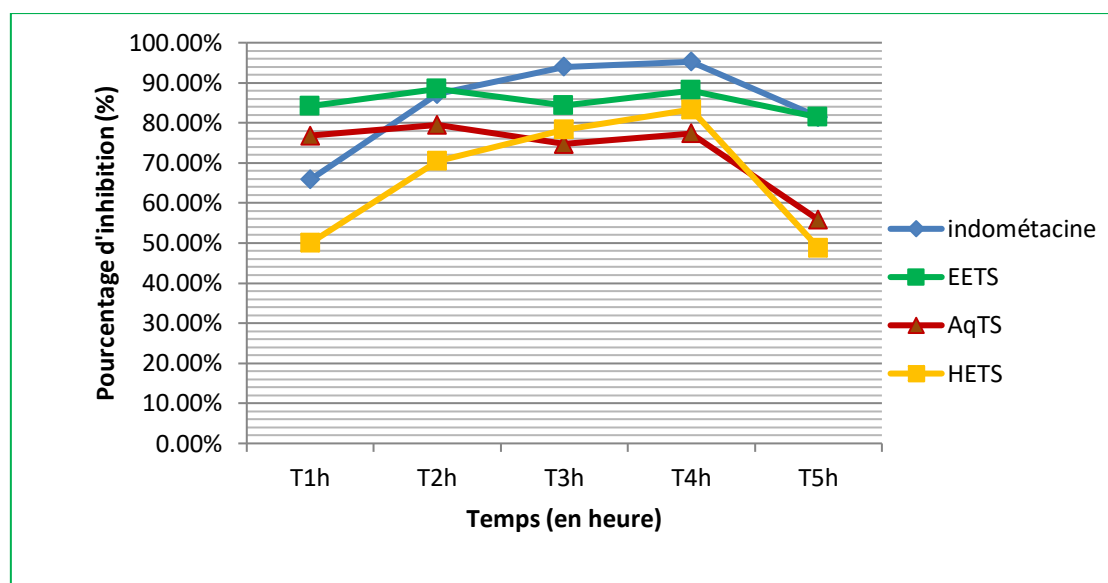


Figure 51: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle de *T. serpyllum*

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation pour l'indométacine a atteint son maximum à T_{4h} avec un pourcentage de 95.23%. Cependant l'extraire EETS a exprimé un effet inhibiteur d'œdème supérieur à l'indométacine dès la première heure (T_{1h}) de l'ordre de 84.14% et a atteint son maximum d'inhibition de 88.46% à T_{2h}. L'extraire AqTS a présenté un effet inhibiteur similaire à EETS cependant son maximum d'effet inhibiteur a été enregistré de l'ordre de 79.48% à la deuxième heure T_{2h}.

L'HETS a montré un faible pourcentage d'inhibition dès la première heure 14.63% et a atteint son maximum d'inhibition avec un pourcentage de 69.97% à la quatrième heure (T_{4h}). A travers les résultats obtenus dans cette présente étude, nous avons constaté que les extraits EETS et AqTS testés à la dose de 100 mg/kg possédaient un effet anti-inflammatoire supérieur même à l'indométacine et qui leur a permis d'inhiber l'inflammation dès la première heure avec un effet inhibiteur supérieur à 84%. Ces résultats sont similaires aux travaux rapportés par Maheen *et al.*, (2015), où ils ont enregistré des résultats hautement significatifs sur l'effet inhibiteur de l'extraire éthanolique et l'extraire aqueux de *T. serpyllum* du Pakistan.

Dans l'étude de Chandra *et al.*,(2016), l'extrait hydro-alcoolique et l'huile essentielle de *T. linearis* ont exprimés des réductions peu significatives de l'œdème avec juste 14.60% d'effet inhibiteur pour l'huile essentielle et 25.58% pour l'extrait a la dose de 100mg/kg. Aussi Pavel *et al.*, (2011) ont rapportés que l'extrait éthanolique de *T. pulegioides* a enregistré un effet inhibiteur de l'œdème de la patte des rats de l'ordre de 51.7% a T_{4h}. Ces résultats mentionnés restent inférieurs à ceux exprimés dans notre étude.

Pour le *T. vulgaris*, les données dans la figure 52 indiquent que les différents extraits ainsi que l'huile essentielle a la dose de 100mg/kg ont diminués le volume d'œdème dès la première heure (T_{1h}) de façon plus rapide que celle de l'indométacine. L'extrait aqueux a exprimé une diminution progressive très hautement significative ($p < 0.001$) du volume d'œdème à partir de la deuxième heure (T_{2h}) avec enregistrement du plus faible volume d'œdème a la troisième heure (T_{3h}) de l'ordre de 0.03 ± 0.04 mm.

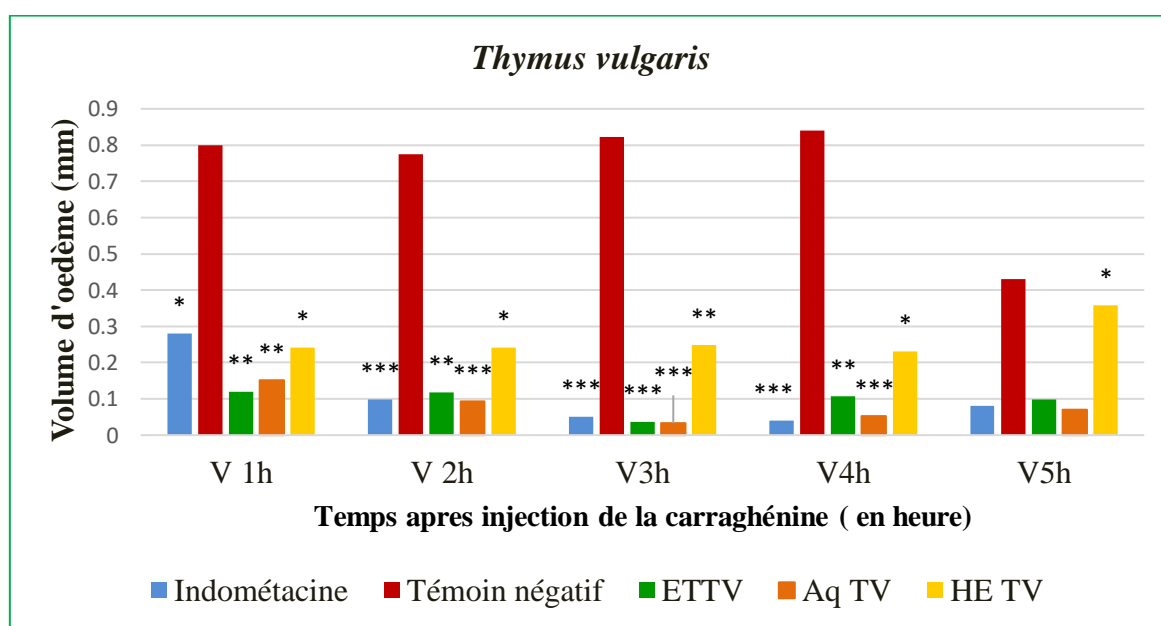


Figure 52 :Evolution de la taille de l'œdème (en mm) en fonction du temps sous l'effet des différents extraits de *T.vulgaris*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=6), *** $P \leq 0,001$ est considéré comme valeur très hautement significatif, ** $P \leq 0,01$ est considéré comme valeur hautement significative et * $P \leq 0,05$ est considéré comme valeur significative par rapport au témoin

L'extrait éthanolique de *T. vulgaris* a prévenu l'évolution de l'inflammation de manière très hautement significative ($p < 0.001$) a T_{3h} avec un volume d'œdème de 0.03 ± 0.04 mm similaire a celui de l'extrait aqueux.

L'administration de l'HETV a révélée des résultats hautement significatifs ($p < 0.01$) à T_{3h} . La diminution du volume d'œdème a débuté à T_{1h} , avec stabilité de ce volume jusqu'à T_{4h} (0.23 ± 0.31 mm).

Le pourcentage d'inhibition des extraits ainsi que l'huile essentielle de *T. vulgaris* sont représentés dans la (Fig. 53).

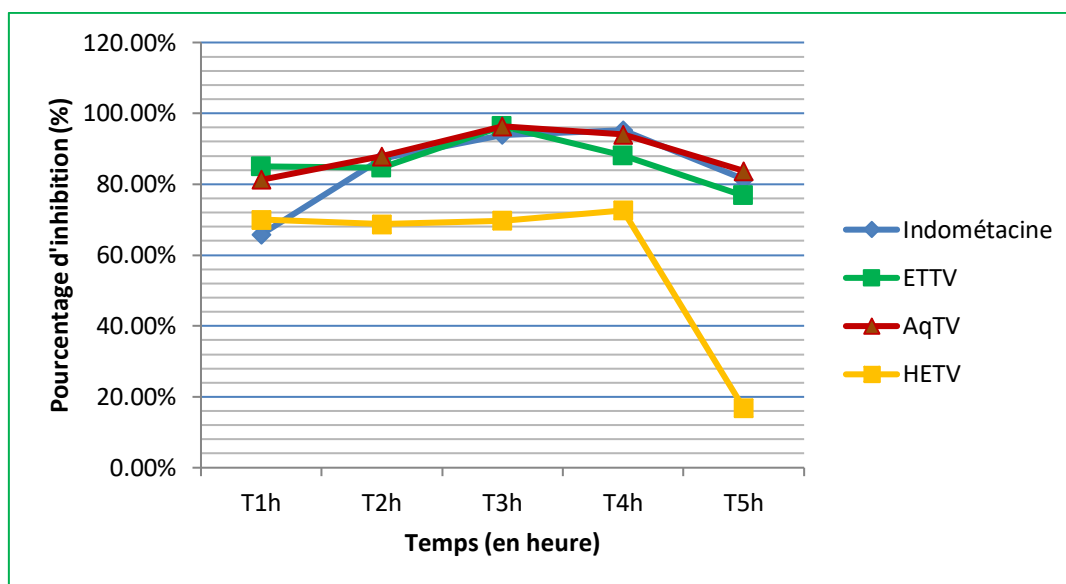


Figure 53: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'huile essentielle de *T. vulgaris*

Les extraits EETV et AqTV ont donnés des pourcentages d'inhibition plus élevés que l'indométacine après 1h d'injection de la carraghénine de l'ordre de 85% et 81.25 % respectivement. Les deux extraits ont prouvés un pourcentage maximum similaire à T_{3h} de l'ordre de 96.34% supérieur au traitement de référence qui est l'indométacine.

L'HETV a montré un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 70% d'inhibition dès la première heure T_{1h} et qui s'est maintenu en stabilité jusqu'à son effet inhibiteur maximale à T_{4h} . A T_{5h} l'inflammation a repris son évolution et a enregistré un faible pourcentage d'inhibition de l'ordre de 16.74 %.

Peu de travaux qui se sont consacrés sur l'activité anti-inflammatoire des extraits phénoliques de *T. vulgaris* par le test d'œdème plantaire par la carraghénine. Selon Cheurfa et Allem, (2022) l'extrait hydroalcoolique de *T. vulgaris* a exprimé un pourcentage d'inhibition de l'inflammation maximum de l'ordre de 86.88%. Ces résultats sont inférieurs à ceux

enregistrés dans notre travail ou l'extrait éthanolique et l'infusé ont enregistré un pourcentage d'inhibition supérieure de l'ordre de 96.34% à T_{3h}.

Concernant les huiles essentielles, l'HETV a révélé un pourcentage d'inhibition similaire à l'indométacine dès la première heure et un pourcentage d'inhibition maximum à T_{4h} de 72.61%. Ces résultats sont supérieurs à ceux d'Abdelli *et al.*, (2017) qui ont étudiés l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *T. Vulgaris* de Tlemcen et de Mostaganema la dose de 100mg/kg et dont le pourcentage d'inhibition n'a pas dépassé les 30% à T_{5h}. Aussi Juhás *et al.*, (2008) ont travaillé sur l'effet anti-inflammatoire de l'HE de *T. vulgaris* et ont obtenus des résultats significatifs ($p < 0.01$) pour les souris traités à la dose de 5000 mg/kg après 4 heures d'injection de la carraghénine.

Plus récemment Vetvicka et Vetvickova, (2016) ont réalisés une étude sur 7 huiles essentielles de *T. vulgaris* de chémotypes différents. Ces derniers ont indiqués dès réduction d'inflammations qui diffèrent avec le temps d'exposition où les échantillons à linalool et thymol sont restés actifs de manière significative ($p < 0.05$) après T_{4h} tandis que, le reste des échantillons leurs plus grand effet inhibiteur a été enregistré à T_{1h}.

D'après tous les résultats de l'activité anti-inflammatoire, les différents extraits et huiles essentielles de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* de la région de Mascara ont prouvés un grand effet inhibiteur de l'évolution de l'œdème plantaire chez les souris testés par rapport au témoin.

Les extraits éthanoliques de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* ont montrés une activité anti-inflammatoire dès la première heure T_{1h} (première phase), plus importante que celle de l'indométacine. Cependant, par comparaison les extraits EETV et AqTV ont montrés des pourcentages d'inhibition maximum à T_{3h} supérieurs à ceux de l'extrait EETS et AqTS. Ceci peut être argumenté par les résultats d'analyses chromatographiques HPLC cités auparavant où les extraits EETV et AqTV ont enregistré des taux d'acide benzoïque de 22.89 mg/g ES et 30.45mg/g ES supérieurs à ceux de l'extrait EETS et AqTS qui sont de l'ordre de 2.45 mg/g et 5.20 mg/g ES respectivement.

Selon Necas et Bartosikova, (2013) le développement de l'œdème après injection de la carraghénine à 1% a été décrit comme bi-phasique. La phase précoce résulte de la libération des premiers médiateurs qui sont l'histamine, la sérotonine, tandis que la phase retardée est caractérisés par les prostaglandines PG qui sont détectables à la fin de l'inflammation et qui

sont impliqués dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire avec induction de la cyclogénase (COX-2). Cette réaction inflammatoire locale est associée à des niveaux élevés des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 et IL-6.

Afonso *et al.*, (2020) rapportent que plusieurs études révèlent que les extraits de thym, riches en acides phénoliques et flavonoïdes ont la capacité de réduire les événements inflammatoires par inhibition de divers médiateurs pro-inflammatoires, comme les cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, INF- γ , TNF- α), les enzymes (iNOS, COX-2) et d'autres, qui sont principalement régulées par le facteur transcriptionnel NF- κ B, dont l'activation est également associée à une génération accrue de ROS. L'action anti-inflammatoire selon Hirasawa *et al.*, (1991), peu être traduite par l'effet inhibiteur sur la synthèse de l'histamine et la sérotonine en phase précoce (première heure) tandis que pour la phase retardée par inhibition de la COX et production de PG (T_{3h} et T_{4h}).

Aussi l'acide phénolique 2-hydroxybenzoïque connu sous la nomination d'acide salicylique, est l'un des plus anciens médicaments utilisés en médecine pour ses propriétés antipyrétique, analgésiques et rhumatismales. Outre ces propriétés, il révèle une puissante activité antioxydante due à la présence d'un groupe phénol qui aide à réduire la réaction inflammatoire Velika et Kron, (2012).

Par comparaison, les huiles essentielles ont exercés un effet inhibiteur inférieur par rapport aux extraits phénoliques. Cependant l'huile essentielle de *T. serpyllum* a montré une activité anti-inflammatoire plus importante que l'huile essentielle de *T. vulgaris*. Ceci peu être traduit par la présence du carvacrol comme composant majeur dans l'HETS

Selon Da-Silva Lima *et al.*, (2013), le traitement au carvacrol a atténué l'œdème de la patte des souris et inhibé des événements clés liés à l'inflammation, à savoir l'augmentation locale des niveaux d'IL-1 β et de PGE2 et l'induction de l'expression de la COX-2. De plus sa capacité a amélioré la libération locale de cytokines IL-10. Ces derniers agissent en supprimant l'activation et le fonctionnement des cellules immunitaires. Ainsi leur capacité réside dans le blocage sélectif de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-1 β . Aussi Guimarães *et al.*, (2012) ont rapportés que le carvacrol a montré un effet inhibiteur sur la migration cellulaires des neutrophiles et des cellules mononucléaires ainsi la réduction du facteur de nécrose tumorale α .

III.2.3. Evaluation de l'activité analgésique

Le soulagement d'une douleur sans perte de conscience peut être apporté par l'usage d'analgésiques. Ces derniers agissent de diverses façons sur le système nerveux périphérique et central Deshmukh *et al.*,(2014).

III.2.3.1. Test de la plaque chauffante

Le test de la plaque chauffante est couramment utilisé pour étudier la nociception et l'analgésie chez les rongeurs. La méthode standard décrite par Eddy et ses collègues, (1953) enregistre la latence des réponses nociceptives des animaux placés sur une plaque à température constante. L'effet de l'administration de l'ibuprofène et les différents extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* sont représentés par la figure n°54 et figure n°55 respectivement et où les temps de latences sont mesurés en secondes.

Les extraits des deux espèces de thym étudiées ont augmentés le temps de latence de manière significative par rapport au témoin négatif. L'ibuprofène a enregistré un maximum d'augmentation de temps de latence à T_{2h} puis une diminution à T_{3h}. Cependant l'extrait éthanolique EETS a augmenté au maximum le temps de latence de manière très hautement significative (P<0.001) à T_{30min} puis de manière hautement significative (P<0.01) et supérieur par rapport à l'ibuprofène après deux heures d'administration de l'ordre de 18.8± 3.70 s et où l'augmentation a persisté à T_{3h}. (Fig. 54).

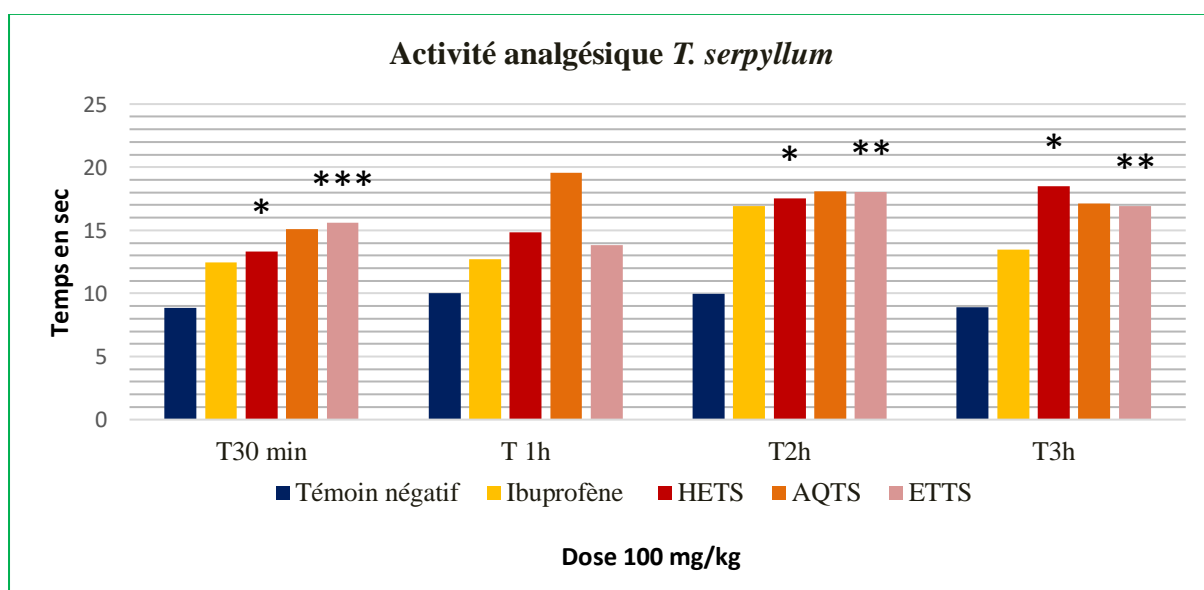


Figure 54 : Temps de latence des souris traités par les extraits et l'huile essentielle de *T. serpyllum*

L'HETS a enregistré des résultats significatives ($p < 0.05$) à $T_{30 \text{ min}}$, T_{1h} et T_{3h} . L'extrait AqTS a donné des valeurs très proches avec un temps de latence plus élevé à la première heure (T_{1h}).

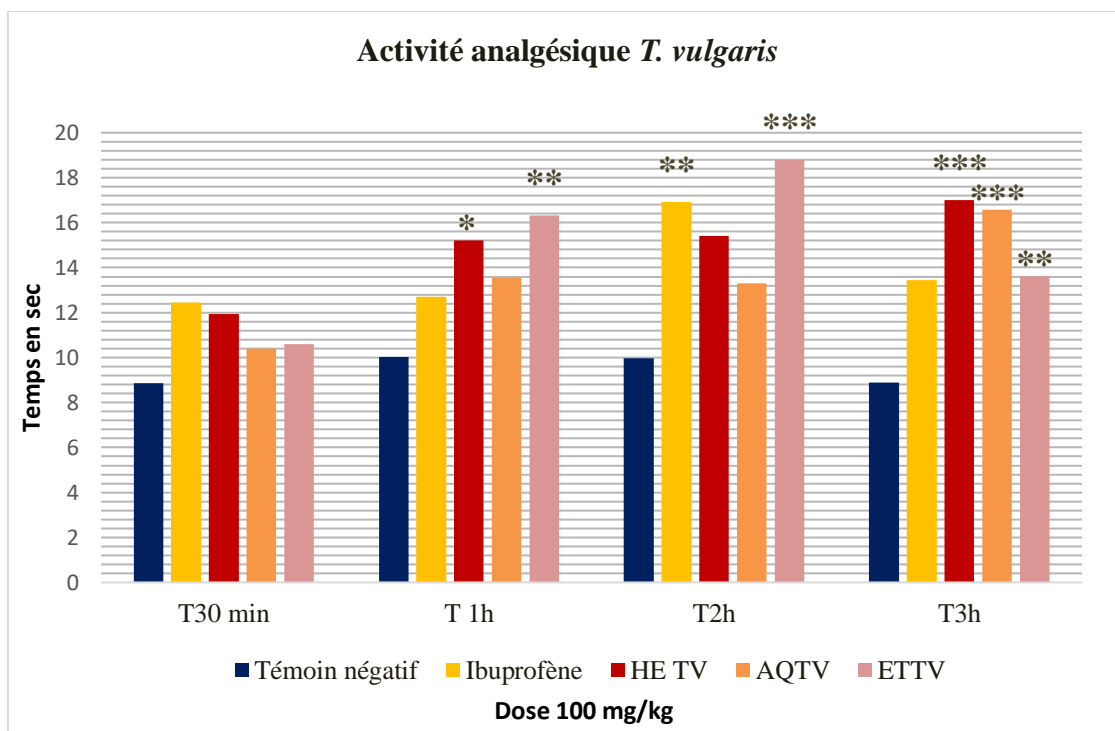


Figure 55: Temps de latence des souris traités par les extraits et l'huile essentielle *T. vulgaris*.

Par comparaison des résultats représentés dans la figure 55 l'extrait EETV a enregistré des valeurs de temps de latence très hautement significatives ($P < 0.001$) à T_{2h} similaires à ceux de l'EETS. Alors que l'AqTV et HETV ont révélés des valeurs inférieures à ceux de l'AqTS et HETS.

Tous les extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* présentaient des propriétés analgésiques comme le démontre le modèle de nociception sur la plaque chauffante pour les souris testés. Ces résultats peuvent être supportés par les travaux cités ci-dessous. Autres espèces du genre thymus tel que *T. broussonetti* et *T. kotschyanus* ont exercés une activité antinociceptive dans divers modèles de douleurs expérimentales (Elhabazi *et al.*, 2006 ; Nikoui *et al.*, 2016).

Il se présente toujours la question sur quelle des composants actifs des extraits étudiés d'une plante médicinale est responsable de l'effet pharmacologique observé. Selon

Rašković *et al.*, (2021), le *T.vulgaris* par ces molécules bioactives le thymol et le carvacrol a exercé une forte activité analgésique par ces deux formulations, sirops et teinture dans le model de la douleur sur plaque chauffante.

Aussi Khan *et al.*, (2016) ont rapportés que de faibles doses quotidiennes d'acides hydroxybenzoïques sont efficaces dans la suppression de l'hypersensibilité centrale à la douleur induite par exposition a un stimulus nocif.

Peana *et al.*,(2003) ont rapportés que le (-) linalool a montré un effet analgésique sur le système nerveux central a la dose de 100mg/kg. Ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus dans la présente étude sur l'effet antinociceptif de l'huile essentielle de *T. vulgaris* de la région de Mascara et dont le composant majeur a été le linalool.

Le test réalisé dans notre présente étude est une évaluation du pouvoir anti-nociceptif. La nociception peut être définie comme une perception de la douleur par une série de codage et traitements par le système nerveux des stimulus nocifs. En cas d'un stimulus thermique, ces derniers activent les fibres (δ et C). Les neurones nociceptifs stimulés se transmettent sur la moelle épinière jusqu'au SNC. Le réflexe de la douleur par la plaque chauffante est noté comme un saut et léchage des pattes des souris. Par conséquent l'anti-nociception des extraits de *T. serpyllum* et *T. vulgaris* peut être exercée par des mécanismes opioïdes. L'autre possibilité d'action pourrait être due aux activités agonistes directes des constituants opioïdes dans les extraits et à l'augmentation de libération de peptides opioïdes endogènes. Selon Rossi *et al.*, (1993), l'effet anti-nociceptif pourrait être due à une diminution directe de l'activité évoquée par les fibres C dans les axones ascendants, ou à une diminution de la production de prostaglandines responsables de la stimulation de la fibre C.

L'effet analgésique des extraits étudiés par l'augmentation de latence des souris sur la plaque chauffante est traduit par inhibition de la perception de la douleur qui est soutenu par les analgésiques opioïdes (morphine, codéine...). En conclusion, les résultats de ce model expérimentale indiquent que les différents extraits testés produisent une analgésie par des mécanismes centraux du système nerveux au niveau du mécanisme supra-rachidien.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le savoir et le traitement par les plantes médicinales représentent un héritage transmis de générations en générations. Au cours de ces dernières années, les recherches se sont accentuées sur les molécules bioactives isolés à partir d'extraits de ces plantes médicinales et qui leurs confèrent les vertus thérapeutiques pour la santé publique.

Le présent travail a permis une investigation sur le pouvoir thérapeutique de deux espèces de thym *T. vulgaris* et *T. serpyllum* de la région de Mascara par un ensemble de tests phytochimiques et chromatographiques afin de pouvoir déterminer les composés bioactifs responsables des activités biologiques et d'évaluer le potentiel antioxydant par différentes méthodes.

L'enquête ethnobotanique réalisée dans cette étude a rapporté plusieurs informations sur les deux plantes qui sont fortement marqués par leur grande utilisation par la population locale dans le domaine médicale. D'après les réponses du questionnaire de nos informateurs, les valeurs des niveaux de fidélité (FL) révèlent leur usage surtout dans le traitement des maladies rhumatismales et respiratoires.

Le dosage phytochimique des différents extraits et huiles essentielles des deux plantes sélectionnées a révélé la présence de divers types de métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les terpènes, les acides phénoliques et les tanins.

L'identification chromatographique des huiles essentielles par GC/MS a permis d'identifier deux chemotypes. Le *T. serpyllum* chémotype à carvacrol (66%), tandis que l'huile essentielle de *T. vulgaris* est une huile chémotype à linalool avec un pourcentage de (64.2%). Aussi l'identification des extraits phénoliques par HPLC/DAD a permis de révéler la présence en forte quantités d'acide benzoïque, hydroxybenzoïques et acide rosmarinique.

L'évaluation des activités antioxydante a été effectuée par plusieurs méthodes *in vitro* DPPH, GOR, CUPRAC, pouvoir réducteur du fer et par la méthode phénanthroline. Les résultats obtenus ont révélés le fort pouvoir antioxydant par piégeage des radicaux libres, pouvoir réducteur des ions de Fer et une puissante capacité de chélation des ions de cuivre. Les valeurs IC₅₀ enregistrés dans ces tests *in vitro* très proches des antioxydants standards.

Conclusion et perspectives

L'étude de l'activité photo-protectrice des différents extraits a été évaluée par mesure du facteur de protection solaire SFP et dont les résultats ont montrés une forte capacité de protection contre les rayons UV par des valeurs SFP supérieur à 38. A la base de ces résultats les deux espèces de thym étudiées peuvent être utilisées dans les applications cosmétiques comme facteur de photoprotection avec effet anti-inflammatoire et réponse antioxydante vis avis des rayons UV.

L'investigation pharmacologique des différents extraits a révélée une absence de toxicité par administration orale avec une DL₅₀ supérieur à 5000mg/kg. Concernant l'activité anti-inflammatoire, les résultats obtenus ont dévoilés une grande capacité contre le développement de l'œdème induit par la carraghénine où l'extrait éthanolique de *T. serpyllum* EETS a présenté un maximum d'inhibition de l'ordre de 88.46% tandis que les extraits éthanoliques et aqueux de *T. vulgaris* ont révélés un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 96.34%. L'étude de l'effet analgésique des différents extraits contre la douleur a dévoilé de forts pouvoirs par analgésie centrale. Les résultats de ces deux tests *in vivo* révèlent de grands effets thérapeutiques en comparaison avec des traitements de référence (indométacine et ibuprofène).

Les deux espèces *T. serpyllum* et *T. vulgaris* témoignent de forts capacités antioxydante et activités biologiques *in vivo* (anti-inflammatoire et analgésique). Ces études peuvent être approfondies avec les perspectives suivantes :

- Isolement et purification des molécules bioactives responsables des activités thérapeutiques.
- Evaluation des activités biologiques sur les molécules bioactives isolées avec étude de leur effet isolés et ou en synergie.
- Elargissement du spectre d'activités biologique par réalisation d'autre tests biologiques *in vivo* et *in vitro*.
- L'étude l'activité antioxydante par plusieurs méthodes a révélé un grand pouvoir antioxydant des différents extraits des deux espèces de thym étudiés. Ces résultats peuvent êtres prises en considération par l'industrie agroalimentaire afin d'utiliser ces molécules bioactives soit isolés soit en synergie avec d'autres molécules comme agents conservateurs et aromatisants.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdallah, I., Quax, W. (2017).** A glimpse into the biosynthesis of terpenoids. *KnE Life Sciences*, 81-98.
- Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., Jirovetz, L. (2017).** Chemical composition and anti-inflammatory activity of Algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural product communications*, 12(4), 1934578X1701200435.
- Abdel-Rahman, R.(2017).** Natural products as a source for novel analgesic compounds. *Pain Relief-from Analgesics to Alternative Therapies. IntechOpen*, 277-299.
- Abdulqadir, A., Cakmak, Y. S., Zengin, G. (2018).** Phenolic Compounds, Antioxidant Properties and Enzyme Inhibition Ability of *Adiantum capillus veneris* L. linked to Alzheimer's Disease, Diabetes Mellitus and Skin Disorders. *Current Organic Chemistry*, 22(17), 1697-1703.
- Abu-Darwish, M., Abu-Dieyeh, Z., Mufeed, B., Al-Tawaha, M., Al-Dalain, S. (2009).** Trace element contents and essential oil yields from wild thyme plant (*Thymus serpyllum* L.) grown at different natural variable environments, Jordan. *J. Food Agric. Environ*, 7(3-4), 920-924.
- AFNOR. (1999).** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyses. Monographie relative aux huiles essentielles. 2: 663.
- AFNOR, (2000) :** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.
- Ahmad, A., Khokhar, I., Ahmad, I., Kashmiri, M., Adnan, A., Ahmad, M. (2006).** Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, 5, 56-60.
- Ajila, C., Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Godbout, S., Valero, J. (2011).** Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249
- Albuquerque, U. (2009).** Quantitative ethnobotany or quantification in ethnobotany?. *Ethnobotany Research and Applications*, 7, 001-003.
- Amamra, S., Cartea, M., Belhaddad, O., Soengas, P., Baghiani, A., Kaabi, I., Arrar, L. (2018).** Determination of total phenolics contents, antioxidant capacity of *Thymus*

- vulgaris extracts using electrochemical and spectrophotometric methods. *Int. J. Electrochem. Sci*, 13(8), 7882-7893.
- Ambriz-Pérez, D., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E., Heredia, J. (2016).** Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1).
- Anwar, F., Mehmood, T., Qadir, R., Riaz, M. (2022).** Phenolics profiling and biological activities of different solvent extracts from aerial parts of wild thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(1), 610-618.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Özyurt, D. (2007).** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Araruna, M., Serafim, C., Alves Júnior, E., Hiruma-Lima, C., Diniz, M., Batista, L. (2020).** Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Terpenes in Experimental Models (2010–2020): A Review. *Molecules*, 25(22), 5430.
- Arce-Amezquita, P., Beltrán-Morales, F., Manríquez-Rivera, G., Cota-Almanza, M., Quián-Torres, A., Peralta-Olachea, R. (2019).** Nutritional value of conventional, wild and organically produced fruits and vegetables available in Baja California Sur markets. *Terra Latinoamericana*, 37(4), 401-406.
- Atti-Santos, A., Pansera, M., Paroul, N., Atti-Serafini, L., Moyna, P. (2004).** Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 294-295.
- Ayoub, Z., Mehta, A. (2018).** Medicinal plants as potential source of antioxidant agents: a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(6), 50-56.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Azwanida, N. (2015).** A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.
- Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F., Benmehdi, H. Belkacem, N. (2012).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of

- diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 2041-2050.
- Bajaj, S., & Khan, A. (2012).** Antioxidants and diabetes. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 2), S267.
- Baliki, M., Apkarian, A. (2015).** Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. *Neuron*, 87(3), 474-491.
- Ballantyne, J., Mao, J. (2003).** Opioid therapy for chronic pain. *New England Journal of Medicine*, 349(20), 1943-1953.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O., Pintado, M., Sarmiento, B. (2020).** The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4), 279-295.
- Barnes, J., Anderson, L., Phillipson, J. (2007).** *Herbal medicines* (No. 3rd Edition). pharmaceutical press.p3-4.
- Barra, A. (2009).** Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1934578X0900400827.
- Beaulieu, P. (2005).** *Pharmacologie de la douleur*. PUM.
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., Božin, B. (2018).** Potential of selected Lamiaceae plants in anti (retro) viral therapy. *Pharmacological research*, 133, 301-314.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018).** Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44). Woodhead Publishing.
- Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pluchtová, M., Tali-Maama, H., Assaous, F., Ben-Mahdi, M. (2019).** Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla ESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. *Natural product research*, 33(18), 2647-2654.
- Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi, A., & Zidane, L. (2014).** Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya). *Journal of applied biosciences*, 78, 6771-6787.
- Bennett, B. (2002).** Ethnobotany and Economic Botany: Subjects in search of definitions. *Encyclopedia of Life Support Systems*.
- Bennett, B., Balick, M. (2014).** Does the name really matter? The importance of botanical nomenclature and plant taxonomy in biomedical research. *Journal of ethnopharmacology*, 152(3), 387-392.

- Berliocchi, L., Russo, R., Levato, A., Fratto, V., Bagetta, G., Sakurada, S., Corasaniti, M. (2009).** (-)-Linalool Attenuates Allodynia in Neuropathic Pain Induced by Spinal Nerve Ligation in C57/Bl6 Mice. *International review of neurobiology*, 85, 221-235.
- Bistgani, Z., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M. (2019).** Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320.
- Biswas, S. K. (2016).** Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Biswas, S., Das, R., & Banerjee, E. R. (2017).** Role of free radicals in human inflammatory diseases. *Aims Biophysics*, 4(4), 596-614.
- Blain, H., Jouzeau, J. Y., Netter, P., Jeandel, C. (2000).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne*, 21(11), 978-988.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., & Richardson, A. (2004).** The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of ageing and development*, 125(10-11), 811-826.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014).** *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7(Spec Iss 3), 56.
- Bouguerne, B. (2012).** Conception et synthèse des dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE.
- Bouguerra, N., Tine-Djebbar, F., Soltani, N. (2017).** Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research*, 4(1), 37-42.
- Boukhatem, M. N., Darwish, N. H., Sudha, T., Bahlouli, S., Kellou, D., Benelmouffok, A. B., Mousa, S. A. (2020).** In vitro antifungal and topical anti-inflammatory properties of essential oil from wild-growing *thymus vulgaris* (Lamiaceae) used for medicinal purposes in algeria: A new source of carvacrol. *Scientia Pharmaceutica*, 88(3), 33.
- Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.

- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., Mohamed, C. (2016).** Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Menthapulegium* L. and *Mentharotundifolia* (L.) Hudsgrowing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.
- Brezoiu, A. M., Prundeanu, M., Berger, D., Deaconu, M., Matei, C., Oprea, O., Danciu, C. (2020).** Properties of *Salvia officinalis* L. and *Thymus serpyllum* L. extracts free and embedded into mesopores of silica and titania nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(5), 820.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Butterfield, D. A., Halliwell, B. (2019).** Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-160.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T. (1999).** Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209.
- Cervantes Gracia, K., Llanas-Cornejo, D., Husi, H. (2017).** CVD and oxidative stress. *Journal of clinical medicine*, 6(2), 22.
- Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković., Satovic, Z. (2016).** Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—a review. *Czech journal of food sciences*, 34(5), 377-390.
- Cavero, R., Akerreta, S., Calvo, M. (2011).** Pharmaceutical ethnobotany in the middle Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 844-855.
- Chandra, M., Prakash, O., Bachheti, R. K., Kumar, M., Pant, A. K. (2016).** Essential oil composition, phenolic constituents, antioxidant and pharmacological activities of *Thymus linearis* Benth. collected from Uttarakhand region of India. *Journal of essential oil bearing plants*, 19(2), 277-289.
- Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat : Institut national polytechnique de LORRAINE
- Cheurfa, M., Allem, R. (2022).** Screening phytochimique et détermination du pouvoir anti-inflammatoire in vivo des extraits de *Thymus vulgaris* L., d'*Olea europaea* L. et de *Pistacia lentiscus* L. *Phytothérapie*.
- Chirinos, R., Campos, D., Costa, N., Arbizu, C., Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2008).** Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 106(3), 1285-1298.

- Chomel, M., Guittonny-Larchevêque, M., Fernandez, C., Gallet, C., DesRochers, A., Paré, D., Baldy, V. (2016).** Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology*, 104(6), 1527-1541.
- Christodouleas D., Fotakis C., Papadopoulos K, Calokerinos A. (2014).** Evaluation of total reducing power of edible oils. *Talanta*. 130: 233-240.
- Cushnie, T., Cushnie, B., Lamb, A. (2014).** Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International journal of antimicrobial agents*, 44(5), 377-386.
- Da Silva Lima, M., Quintans-Júnior, L., de Santana, W., Kaneto, C., Soares, M., Villarreal, C. (2013).** Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European journal of pharmacology*, 699(1-3), 112-117.
- Dai, J., Mumper, R. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das, A., Islam, M., Faruk, M., Ashaduzzaman, M., Dungani, R. (2020).** Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70.
- Das, V. (2015).** An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Progress in molecular biology and translational science*, 131, 1-30.
- Dauqan, E., Abdullah, A. (2017).** Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris L.*) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 017-022.
- D'Auria M, Racioppi R. (2015).** The effect of drying of the composition of volatile organic compounds in *Rosmarinus officinalis*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis* and *Thymus serpyllum*: A HS-SPME-GC-MS study. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*. 18: 1209-1223.
- Delgado, A., Issaoui, M., Chammem, N. (2019).** Analysis of main and healthy phenolic compounds in foods. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1356-1364.
- Deshmukh, A., Morankar, P., Kumbhare, M. (2014).** Review on Analgesic Activity and Determination Methods. *Pharmtechmedica*, 3(1), 425-428.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., & Maïga, A. (2004).** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1073-1080.
- Djahafi, A., Taïbi, K., Abderrahim, L. (2021).** Aromatic and medicinal plants used in traditional medicine in the region of Tiaret, North West of Algeria. *Mediterranean Botany*, (42), 23.

- Dobignard, L., Chatelain, C. (2010).** Index synonymique de la flore d'Algérie du nord. Volume 1. Conservatoire et jardin botanique. Genève. 452 P.
- Dugo, G., Tranchida, P., Cotroneo, A., Dugo, P., Bonaccorsi, I., Marriotti, P., Mondello, L. (2005).** Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 20(3), 249-264.
- DW :** Direction de la wilaya de Mascara. <http://wilayamascara.dz/index.php>.
- Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal science*, 44(3), 236-251.
- Ed-Dra, A., Nalbone, L., Filali, F., Trabelsi, N., El Majdoub, Y., Bouchrif, B., Giuffrida, A. (2021).** Comprehensive evaluation on the use of *Thymus vulgaris* essential oil as natural additive against different serotypes of *Salmonella enterica*. *Sustainability*, 13(8), 4594.
- Eddy, N. B., Leimbach, D. (1953).** Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 107(3), 385-393.
- El Aanachi S, Gali L, Rammali S, Bensouici C, Aassila H, Dari K (2021).** In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan Lamiaceae. *J. Food Meas. Charact.* 15: 1785-1795.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Elaissari, A. (2015).** Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
- Eldeen, I., Effendy, M., Tengku-Muhammad, T. (2016).** Ethnobotany: challenges and future perspectives. *Research Journal of Medicinal Plants*, 10(6-7), 382-387.
- Elhabazi, K., Aboufatima, R., Benharref, A., Zyad, A., Chait, A., Dalal, A. (2006).** Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*, 107(3), 406-411.
- Evans, P., Halliwell, B. (2001).** Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British journal of nutrition*, 85(S2), S67-S74.
- Evans, W. C. (2009).** *Trease and evans' pharmacognosy E-book*. Elsevier Health Sciences. Matsuura,
- Ewané, C., Lepoivre, P., De Lapeyre de Bellaire, L., Lassois, L. (2012).** Involvement of phenolic compounds.

- Eweis, M., Imhemmed, A., Gad, A. (2012).** Influence of *Thymus serpyllum* essential oil on *Aspergillus parasiticus* morphology and aflatoxins production. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 3(2), 322-332.
- Fachini-Queiroz, F., Kummer, R., Estevao-Silva, C., Carvalho, M., Cunha, J., Grespan, R., Cuman, R. (2012).** Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Ferhat, M., Meklati, B., Chemat, F. (2007).** Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494-504.
- Fett-Neto, A. (2015).** Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 2(7), 1-15.
- Fullerton, J. N., Gilroy, D. W. (2016).** Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews Drug discovery*, 15(8), 551-567.
- Gallelli, C. A., Calcagnini, S., Romano, A., Koczwara, J. B., De Ceglia, M., Dante, D., Gaetani, S. (2018).** Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues. *Antioxidants*, 7(7), 93.
- Gali, L., Bedjou, F. (2019).** Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 163-169.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.
- Genestra, M. (2007).** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
- Gholijani, N., Gharagozloo, M., Kalantar, F., Ramezani, A., Amirghofran, Z. (2015).** Modulation of cytokine production and transcription factors activities in human Jurkat T cells by thymol and carvacrol. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(Suppl 1), 653.
- Giovinazzo, G., Ingrosso, I., Paradiso, A., De Gara, L., Santino, A. (2012).** Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. *Plant foods for human nutrition*, 67(3), 191-199.

- Godic, B. Poljsak, M. Adamic, R. Dahmane. (2014).** The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Article ID 860479, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/860479>
- Guimarães, A. G., Quintans, J. S., & Quintans-Júnior, L. J. (2013).** Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytotherapy research*, 27(1), 1-15.
- Guimarães, A., Xavier, M., de Santana, M., Camargo, E., Santos, C., Brito, F., Quintans-Júnior, L. (2012).** Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 385(3), 253-263.
- Habashy, N., Serie, M., Attia, W., Abdelgaleil, S. (2018).** Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *Journal of Functional Foods*, 40, 317-328.
- Halliwell, B. (1995).** How to characterize an antioxidant: an update. In *Biochemical Society Symposium* (Vol. 61, pp. 73-101)
- Hao, I., Qi, J., Yeh, C. (2017).** Comparative Sun Protection Factors of Essential Oils in Formulation of Natural Sunscreens.
- Harborne, A. (1998).** *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. springer science & business media.
- Hassanpour, S., MaheriSis, N., Eshratkhah, B. (2011).** Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. 47-53.
- Heinrich, M. (2013).** Ethnopharmacology and drug discovery. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Development & Modification of Bioactivity*, 3, 351-381.
- Heinrich, M. (2014).** Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 99-102.
- Heinrich, M., Gibbons, S. (2001).** Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(4), 425-432.
- Hirasawa, N., Watanabe, M., Mue, S., Tsurufuji, S., Ohuchi, K. (1991).** Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in air-pouch-type carrageenin inflammation in rats. *Inflammation*, 15(2), 117-126.

- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R. (2015).** The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- Houehanou, T., Assogbadjo, A., Chadare, F., Zanzo, S., Sinsin, B. (2016).** Approches méthodologiques synthétisées des études d'ethnobotanique quantitative en milieu tropical. *Annales des Sciences Agronomiques*. 20. 187-205.
- Houicher, A., Hechachna, H., Teldji, H., Ozogul, F. (2016).** In vitro study of the antifungal activity of essential oils obtained from *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris*, and *Laurus nobilis*. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 8(2), 99-106.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, M., Lu, J., Huang, M., Bao, J., Chen, X., Wang, Y. (2012).** Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 21(12), 1801-1818.
- Hussain, A., Anwar, F., Chatha, S., Latif, S., Sherazi, S., Ahmad, A., Sarker, S. (2013).** Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 185-192.
- Ifeanyi, O. E. (2018).** A review on palm oil supplemented diet and enzymatic antioxidants in aging. *Int J Curr Res Med Sci*, 4(4), 43-52.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. (2011).** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jalas, J. (1970).** *Thymus sectio Serpyllum* in the Southern French Alps (Alpes françaises du Sud). *Veröff Geobot Inst ETH* 43:186–203.
- Jamison, R., & Mao, J. (2015).** Opioid analgesics. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 90, No. 7, pp. 957-968). Elsevier.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018).** Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmedpharmacology*, 7(1).
- Janiak, M., Slavova-Kozakova, A., Kancheva, V., Ivanova, M., Tsrunchev, T., Karmac, M. (2017).** Effects of γ -irradiation of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the phenolic compounds profile of its ethanolic extract. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(4).
- Jarić, S., Mitrović, M., Pavlović, P. (2015).** Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2015.

- Jiménez-Arellanes, A., Martínez, R., García, R., León-Díaz, R., Luna-Herrera, J., Molina-Salinas, G., Said-Fernández, S. (2006).** *Thymus vulgaris* as a potencial source of antituberculous compounds. *Pharmacologyonline*, 3, 569-574.
- Johnson R.J, Sautin Y., Oliver W., Roncal C, Mu W, Gabriela S., Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner S. (2009).** Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *J Comp Physiol B*, 179, (1) 67-76.
- Jorite, S. (2015).** La phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel, Thèse de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie, Univ. de Bordeaux 2, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 2015. HAL Id : dumas-01188820.
- Jovanović, A., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Pljevljakusić, D., & Bugarski, B. (2016).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. *Hemijska industrija*, 70(4), 391-398.
- Jovanović, A., Skrt, M., Petrović, P., Častvan, I., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2019).** Ethanol *Thymus serpyllum* extracts: Evaluation of extraction conditions via total polyphenol content and radical scavenging activity. *Lekovite sirovine*, (39), 23-29.
- Jovanović, A., Djordjević, V., Petrović, P., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2021).** The influence of different extraction conditions on polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of wild thyme. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 100328.
- Juhás, Š., Bujňáková, D., Reháč, P., Čikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., Koppel, J. (2008).** Anti-inflammatory effects of thyme essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno*, 77(3), 327-334.
- Juhé-Beaulaton, D. (2020).** Les enquêtes ethnobotaniques de Germaine Dieterlen (1903-1999). Nouveau regard sur une ethnologue. *Revue d'ethnoécologie*, (17).
- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M. J., Portugal, H. (2005).** Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2437-2444.
- Khan, S., Chatterjee, S., Kumar, V. (2016).** Low dose aspirin like analgesic and anti-inflammatory activities of mono-hydroxybenzoic acids in stressed rodents. *Life sciences*, 148, 53-62.
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

- Khouya, T., Ramchoun, M., Hmidani, A., Amrani, S., Harnafi, H., Benlyas, M., FilaliZegzouti, Y., Alem, C. (2015).** Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueousextracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 636-644.
- Kim, D., Chun, O., Kim, Y, Moon, HY., Lee, c. (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 516:509-6515
- Kindl, M., Blazekovic, B., Bucar, F., Vladimir-Knezevic, S. (2015).** Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Six Thymus Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 403950, P.10.
- Kirillov V, Stikhareva T, Mukanov B, Chebotko N, Ryazantsev O, Atazhanova G, Adekenov S (2016).** Composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. from Northern Kazakhstan. *Essent. Oil-Bear. Plants.* 19: 212-222.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A. C., Alwasel, S. H. (2017).** Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 514-525.
- Koolman J, Rohm K.H (1999).** Atlas de Poche de Biochimie. Flammarion: Paris
- Kosakowska, O., Bączek, K., Przybył, J. L., Pawelczak, A., Rolewska, K., Węglarz, Z. (2020).** Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of ‘Standard Winter’ Cultivar. *Agronomy*, 10(6), 909.
- Koubaa, M., Mhemdi, H., Barba, F., Roohinejad, S., Greiner, R., Vorobiev, E. (2016).** Oilseed treatment by ultrasounds and microwaves to improve oil yield and quality: An overview. *Food Research International*, 85, 59-66.
- Külcü, D. B., Gökışık, C. D., Aydın, S. (2019).** An investigation of antibacterial and antioxidant activity of nettle (*Urtica dioica* L.), mint (*Mentha piperita*), thyme (*Thyme serpyllum*) and *Chenopodium album* L. plants from Yaylacık Plateau, Giresun, Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(1), 73-80.
- Kulišić, T., Dragović-Uzelac, V., & Miloš, M. (2006).** Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technology & Biotechnology*, 44(4).
- Lanzotti, V. (2013).** Diterpenes for therapeutic use. In *Natural Products* (pp. 3173-3191).

- Larsen, G. L., & Henson, P. M. (1983).** Mediators of inflammation. *Annual review of immunology*, 1(1), 335-359.
- Le Bars D, Plaghki L. (2001).** Douleurs : bases anatomiques, physiologiques
- Le Bars, D., Willer, J. (2004).** Physiologie de la douleur. *EMC-Anesthésie-Réanimation*, 1(4), 227-266.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food chemistry*, 125(2), 288-306.
- Lewis, N., Davin, L., Sarkanen, S. (1998).** Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. P 1-27.
- Li, X., He, T., Wang, X., Shen, M., Yan, X., Fan, S., She, G. (2019).** Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*. *Chemistry & biodiversity*, 16(9), e1900254.
- Liang, C., Lee, C., Sung, H., Chen, Y., Wang, S., Wu, P., Chen, Y. (2014).** Magnolol reduced TNF- α -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via JNK/p38 and NF- κ B signaling pathways. *The American Journal of Chinese Medicine*, 42(03), 619-637.
- Liang, X., Liu, R., Chen, C., Ji, F., Li, T. (2016).** Opioid system modulates the immune function: a review. *Translational perioperative and pain medicine*, 1(1), 5.
- Lipinski, K., Mazur, M., Antoszkiewicz, Z., & Purwin, C. (2017).** Polyphenols in monogastric nutrition-A review. *Annals of Animal Science*, 17(1), 41.
- Liu, Y., Wang, L., Jung, J. H., Zhang, S. (2007).** Sesterterpenoids. *Natural product reports*, 24(6), 1401-1429.
- Lorke, D. (1983).** A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*, 54(4), 275-287.
- Löhnert, A., Löhnert, S., Mogilevskaya, V., Schick, S. (2014).** Ethnopharmacology and phytotherapy. In *Biodiversity, Natural Products and Cancer Treatment* (pp. 251-287).
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev, M. (2017).** Terpenoids. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- Maares, M., Haase, H. (2016).** Zinc and immunity: An essential interrelation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 611, 58-65.
- Macheix, J. J. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Actabotanica gallica*, 143(6), 473-479.

- Maheen, s., Malik, m. N. H., Ahmad, t., Latif, f., Tabassum, n., Khan, a. Q., & Ali, h. (2015).** Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Thymus serpyllum* Linn. in mice. *Acta poloniae pharmaceutica*, 72(1), 113.
- Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., &Azulay, R. D. (1986).** Determinação do fator de proteção solar porespectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-4.
- Mardafkan, N., Iranmanesh, M., Larijani, K., Mahasti, P., Nazari, F., Zojaji, M. (2015).** Chemical components and antibacterial activities of essential oils obtained from Iranian local *Lavandula officinalis* and *Thymus vulgaris* against pathogenic bacteria isolated from human. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 5(1), 31-36.
- Marhold, K., Martonfi, P. (1998).** Typification of the name *Thymus serpyllum* L.(Lamiaceae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 128(3), 271-276.
- Martin, G. J. (1995).** A methods manual. *Chapaman and Hill, London*, 1-251.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., Ferreira, I. C. (2015).** Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food chemistry*, 167, 131-137.
- Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., Araújo, M. (2007).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food chemistry*, 103(3), 778-786.
- McCall M., Frei B. (1999).** Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. Pp1034-1053
- Mehmood, T., Shafique, S., Tabassam, Q., Afzal, M., Ahmad, S. (2015).** Variation in antioxidant attributes, individual phenolic acids composition and biological activities of *Thymus vulgaris*: effects of extraction solvents. *International Journal of Biosciences*, 6(11), 73-86.
- Mera, I., Falconí, D., Córdova, V. M. (2019).** Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Rev Bionatura*, 4, 1000-9.
- Mikou, K., Rachiq, S., & Oulidi, A. J. (2016).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans la ville de Fès au Maroc. *Phytothérapie*, 14(1), 35-43.
- Moghaddam, M., Mehdizadeh, L. (2017).** Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft chemistry and food fermentation* (pp. 379-419). Academic Press.

- Morales, R. (2002).** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme* (pp. 15-57). CRC Press.
- Morris, C. J. (2003).** Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation protocols*, 115-121.
- Mosquera, M., Jiménez, G., Tabernero, V., Vinueza-Vaca, J., García-Estrada, C., Kosalková, K., Valera, M. Á. (2021).** Terpenes and Terpenoids: Building Blocks to Produce Biopolymers. *Sustainable Chemistry*, 2(3), 467-492.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A., Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- Musialik, M., Litwinienko, G. (2005).** Scavenging of dpph• radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Organic Letters*, 7(22), 4951-4954.
- Muster, D. (2005).** Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
- Nabavi, S., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S. (2015).** Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*, 173, 339-347.
- Necas, J., Bartosikova, L. (2013).** Carrageenan: a review. *Veterinarni medicina*, 58(4).
- Nemati, Z., Barzegar, R., Khosravinezhad, M., Talebi, E., Safaei, H. (2018).** Chemical composition and antioxidant activity of Shirazi *Thymus vulgaris* essential oil. *Future Natural Products*, 4(2), 26-32.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Soković, M. (2014).** Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. And Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Nikoui, V., Ostadhadi, S., Imran Khan, M., Allahverdi, A. (2016).** Evaluation of the analgesic effect of *Thymus kotschyanus* hydroalcoholic extract in male mice by formalin and tail flick tests. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology*, 4(1), 1-6.
- Nkhili, E.Z. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant (Thèse de Doctorat). Université de Montpellier.
- Noack, M., Kolopp-Sarda, M. (2018).** Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018 (499), 28-37.

OCDE: Organisation pour la coopération et le développement économiques. (2008).

Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Toxicité orale aigüe
Méthode de l'ajustement des doses.

OMS World Health Organization (WHO). (1977). Resolution-promotion and development of training and research in traditional medicine. *WHO document*, 30, 49-50.

Oszagyan, M., Simandi, B., Sawinsky, J., & Kery, A. (1996). A comparison between the oil and supercritical carbon dioxide extract of Hungarian wild thyme (*Thymus serpyllum* L.). *Journal of essential oil research*, 8(3), 333-335.

Otterness, I. G., Gans, D. J. (1988). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: An Analysis of the Relationship between Laboratory Animal and Clinical Doses. Including Species Scaling. *Journal of pharmaceutical sciences*, 77(9), 790-795.

Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K., Erçağ, E., Çelik, S. E., Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.

Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395-400.

Pateiro, M., Barba, F., Domínguez, R., Sant'Ana, A., Khaneghah, A., Gavahian, M., Lorenzo, J. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156-166.

Pavel, M., Ristić, M., Stević, T. (2010). Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(1), 27-34.

Peana, A., Paolo, S., Chessa, M., Moretti, M., Serra, G., Pippia, P. (2003). (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European journal of pharmacology*, 460(1), 37-41.

Perron, N., Brumaghim, J. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*, 53(2), 75-100.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.

Pitman, V. (2004). *Aromatherapy: a practical approach*. Nelson Thornes.

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Bitto, A. (2017).** Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., Valko, M. (2017).** Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592-607.
- Portères, R. (1961).** L'ethnobotanique: place-objet-méthode-philosophie. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 8(4), 102-109.
- Prakash, V. E. D. (2017).** Terpenoids as source of anti-inflammatory compounds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(3), 68-76.
- Prinsloo, G., Nogemane, N. (2018).** The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochemistry Reviews*, 17(4), 889-902.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Pruteanu, A., Popescu, C., Vladut, V., Gageanu, G. (2018).** Biochemical analysis of some vegetal extracts obtained from indigenous spontaneous species of (*Thymus serpyllum* L.). *Romanian Biotechnological Letters*, 23(5), 14013-14024.
- Qaid, E., Zakaria, R., Sulaiman, S., Yusof, N., Shafin, N., Othman, Z., Al-Rahbi, B. (2020).** Role of Antioxidants in Hypoxia-Induced Learning and Memory Deficit. *International Medical Journal*, 27(1), 62-66.
- Radnovich, R., Chapman, C., Gudin, J., Panchal, S., Webster, L., Pergolizzi Jr. (2014).** Acute pain: effective management requires comprehensive assessment. *Postgraduate medicine*, 126(4), 59-72.
- Raja, N., Carr, B., Cohen, M. (2020).** The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises *Pain* , 161(9), P 1976.
- Ramana, K. V., Srivastava, S., Singhal, S. S. (2017).** Lipid peroxidation products in human health and disease 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Rasool, M., Malik, A., Butt, T., Ashraf, M., Rasool, R., Zahid, A., Karim, S. (2019).** Implications of advanced oxidation protein products (AOPPs), advanced glycation end products (AGEs) and other biomarkers in the development of cardiovascular diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 334-339.
- Rašković, A., Kvrđić, M., Tomas, A., Stilinović, N., Čabarkapa, V., Stojšić-Milosavljević, A., Rakić, D. (2021).** Antinociceptive activity of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and

interactions with neurotropics and analgesics. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.

- Ratnasooriya, W., Pathirana, R., Dissanayake, A., Samanmali, B., Desman, P. (2016).** Evaluation of invitro sun screen activities of salt marshy plants Suaeda monoica, Suaeda maritima and Halosarcia indica. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 5(2).
- Raut, J., Karuppayil, S. (2014).** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Aggarwal, B. (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Revathi, P., Parimelazhagan, T., Manian, S. (2013).** Ethnomedicinal plants and novel formulations used by Hooralis tribe in Sathyamangalam forests, Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(28), 2083-2097.
- Rhattas, M., Douira, A., Zidane, L. (2016).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*, 97, 9187-9211.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Roby, M., Sarhan, M., Selim, K. A., Khalel, K. (2013).** Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., del Mar Contreras, M. (2019).** Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(8), 1212-1229.
- Rossi, G., Pasternak, G., Bodnar, R. (1993).** Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia. *Brain research*, 624(1-2), 171-180.
- Roy, A. (2017).** A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *IJPB*, 3(2), 1-9.
- Ryan, A., Hewitt, C., Possell, M., Vickers, C. Purnell, A., Mullineaux, P., Dodd, I. (2014).** Isoprene emission protects photosynthesis but reduces plant productivity during drought in transgenic tobacco (*Nicotianatabacum*) plants. *New phytologist*, 201(1), 205-216.

- Salehi, B., Abu-Darwish, M., Tarawneh, A., Cabral, C., Gadetskaya, A., Salgueiro, L., del Mar Contreras, M. (2019).** Thymus spp. plants-Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 287-306.
- Sammes, P. G., Yahiolu, G. (1994).** 1, 10-Phenanthroline: a versatile ligand. *Chemical Society Reviews*, 23(5), 327-334.
- Sánchez-Campillo, M., Gabaldon, J. A., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M. J., Alcaraz, M., Lozano, J. A. (2009).** Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 386-392.
- Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. R. (2016).** Free radicals: From health to disease. *React. Oxyg. Species*, 2, 245-263.
- Sany J, 2003,** Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : Conception actuelle. *John LibbeyEurotext*, 298p.
- Sarfaraz, D., Rahimmalek, M., Saeidi, G. (2021).** Polyphenolic and molecular variation in Thymus species using HPLC and SRAP analyses. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
- Satyral, P., Murray, B. L., Mc Feeters, R. L., Setzer, W. (2016).** Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70.
- Schaible, H. G., Richter, F. (2004).** Pathophysiology of pain. *Langenbeck's archives of surgery*, 389(4), 237-243.
- Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A. (2002).** Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. *Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries*. Rome. P 142– 167.
- Schmidt, E., Wanner, J., Höferl, M., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Gochev, V., Geissler, M. (2012).** Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Natural Product Communications*, 7(8), 1934578X1200700833.
- Scholz, J., Woolf, C. J. (2002).** Can we conquer pain?. *Nature neuroscience*, 5(11), 1062-1067.
- Sefidkon, F., Dabiri, M., Mirmostafa, S. (2004).** The composition of *Thymus serpyllum* L. oil. *Journal of Essential OilResearch*, 16(3), 184-185.
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A. (2010).** Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273-278.
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., ... & Wallace, J. L. (2007).** Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms. *The FASEB journal*, 21(2), 325-332.

- Sezgin, Y. (2020).** The approach to phytotherapy applications: a case report of hyperkalemia. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 16(1), 95.
- Shaban, N., Tohamy, M., El-Banna, H., Abeer, M., El-Gendy, A., Asmaa, O. (2015).** Phytochemical and pharmacological studies of ethanolic extract of *Thymus vulgaris*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(10), 1988-2001.
- Shabnum, S., Wagay, M. (2011).** Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *J. Res. Dev*, 11, 83-94.
- Shang, Y. J., Liu, B. Y., & Zhao, M. M. (2015).** Details of the antioxidant mechanism of hydroxycinnamic acids. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(3), 210-216.
- Sharif, K., Rahman, M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M., Sahena, F., Zaidul, I. (2014).** Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. *Journal of Food Engineering*, 124, 105-116.
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N., Zucca, P., Varoni, E., Dini, L., Panzarini, E., Sharifi-Rad, J. (2020).** Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in physiology*, 11, 694.
- Sharma, O., Bhat, T. (2009).** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shi H., Noguchi N. et Niki E., (2001)** Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*, 335 : 157-166.
- Singh, G. (2007).** *Chemistry of terpenoids and carotenoids*. Discovery Publishing House.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. (2019).** Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583.
- Singla, R., Dubey, A., Garg, A., Sharma, R., Fiorino, M., Ameen, S., Al-Hiary, M. (2019).** Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures.
- Singleton, V., Rossi, J. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Skulachev, V. P. (2012).** Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 283-289.
- Smelcerovic, A., Djordjevic, A., Lazarevic, J., Stojanovic, G. (2013).** Recent advances in analysis of essential oils. *Current Analytical Chemistry*, 9(1), 61-70.

- Souilah, N., Zekri, J., Grira, A., Akkal, S., & Medjroubi, K. (2018).** Ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants used by the population National Park of El Kala (north-eastern Algeria). *International Journal of Biosciences*, 12, 55-77.
- Stahl-Biskup, E., Venskutonis, R. (2012).** Thyme. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 499-525). Woodhead Publishing.
- Stevanato, R., Bertelle, M., Fabris, S. (2014).** Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71-77.
- Stevenson, D. E., & Hurst, R. D. (2007).** Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900-2916.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- Suresha, N., Amoghmath, S., Vaibhavi, S., Shruthi, L., Jayanthi, K., Kalabharathi, L. (2014).** Evaluation of analgesic activity of perindopril in albino mice. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 5(3), 129.
- Świeboda, P., Filip, R., Prystupa, A., & Drozd, M. (2013).** Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Pain*, 2(7).
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- Taïbi, K., AitAbderrahim, L., Ferhat, K., Betta, S., Taïbi, F., Bouraada, F. Boussaid, M. (2020)a.** Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. *Saudi Pharm. J.* 28(11): 1451–1465. doi:10.1016/j.jsps.2020.09.011.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 521p.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Murata, M. (2014).** Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 193-217.
- Tholl, D. (2015).** Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Biotechnology of isoprenoids*, 63-106.
- Thompson, J., Chalchat, J., Michet, A., Linhart, Y., Ehlers, B. (2003).** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical ecology*, 29(4), 859-880.

- Tirzitis, G., Bartosz, G. (2010).** Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta biochimica polonica*, 57(2).
- Tiwari, R., & Rana, C.. (2015).** Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Tréchet, P., Jouzeau, J. (2014).** Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue Française d'Allergologie*, 54(3), 212-217.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T., Vernieri, P., Pardossi, A. (2016).** Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Industrial Crops and Products*, 83, 241-254.
- Trouvin, A. P., Perrot, S. (2019).** New concepts of pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 33(3), 1014-15.
- Tsao, R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C., Telser, J. (2004).** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.
- Velika, B., Kron, I. (2012).** Antioxidant properties of benzoic acid derivatives against superoxide radical. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 62-67.
- Venkateswara Rao, P., Kiran, S., Rohini, P., Bhagyasree, P. (2017).** Flavonoid: A review on Naringenin. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6, 2778-2783.
- Verma, R. S., Verma, R. K., Chauhan, A., & Yadav, A. K. (2011).** Seasonal variation in essential oil content and composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. cultivated in Uttarakhand Hills. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 233.
- Vetvicka, V., Vetvickova, J. (2016).** Essential oils from Thyme (*Thymus vulgaris*): chemical composition and biological effects in mouse model. *Journal of medicinal food*, 19(12), 1180-1187.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008).** Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International journal of food science & technology*, 43(3), 526-531.
- Wang, X., Quinn, P. J. (2006).** The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* 88, 1883-1888.

- Wang, Z., Li, S., Ge, S., Lin, S. (2020).** Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(11), 3330-3343.
- Weidinger, A., Kozlov, A. V. (2015).** Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472-484.
- Weil B., Batteux F, 2003,** Immunopathologie et réactions inflammatoires. *1ère édition, De Boeck Supérieur, Bruxelles, Belgique*, 312p.
- White, N., Duarte, R., Raphael, J. (2017).** An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology international*, 37(1), 29-42.
- Wiersema J H (2019).** *Thymus vulgaris L.* in .GRIN Taxonomy. US National Plant Germplasm System. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/ao14ppGBIF> Backbone Taxonomy. *Thymus vulgaris L.* Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>.
- Woolf, C. J. (2010).** What is this thing called pain?. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3742-3744.
- Yang, L., Yang, C., Li, C., Zhao, Q., Liu, L., Fang, X., Chen, X. (2016).** Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. *Science bulletin*, 61(1), 3-17.
- Yef R., Hamzar S., Admin A., Mai E., Hermansyah A.(2018).** Modification of phenanthroline method to determine antioxidant content in tropical fruits methanolic extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 22(4) : 28-35.
- Yuan, G., Wahlqvist, M. L., He, G., Yang, M., Li, D. (2006).** Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 15(2).
- Zantar, S., El Garrouj, D., Pagán, R., Chabi, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Zerrouk, M. H. (2015).** Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(2), 69-77.
- Zhou, F., Pichersky, E. (2020).** More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Current opinion in plant biology*, 55, 1-10.

Annexes

Annexe 1

Questionnaire de l'enquête ethnobotanique

Commune.....

Profil de personne enquêté

- Age :.....
- Sexe : Masculin Féminin
- Situation familiale : Célibataire Marié
- Niveau académique : Analphabète Primaire Secondaire Universitaire
- Origine de l'information : Lecture Herboriste Expérience des autres

Matériel végétal :

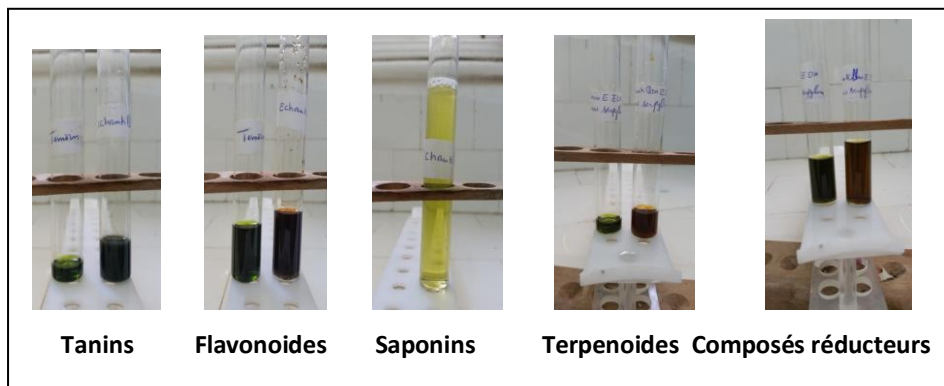
- Nom local :
- Type de plante : Sauvage Cultivée
- Moment de récolte : saison :
- Etat de la plante : Fraiche Desséchée
- Partie utilisée : Tige Feuilles Fleurs Racine Plante entière
- Méthodes de conservation : A l'abri de la lumière Exposé dans a la lumière
- Usage de la plante : Thérapeutique Cosmétique Alimentaire
- Mode de préparation : Infusion Décoction Cataplasme
- Mode d'administration : Orale Massage Autres
- Types de maladies :

- Affections dermatologiques	<input type="checkbox"/> Affections génito-urinaires
- Affections respiratoires	<input type="checkbox"/> Affections du tube digestif
- Affections cardio-vasculaires	<input type="checkbox"/> Affections ostéo-articulaires
- Affections neurologiques	<input type="checkbox"/> Affections métaboliques
- Résultats : Guérison Amélioration

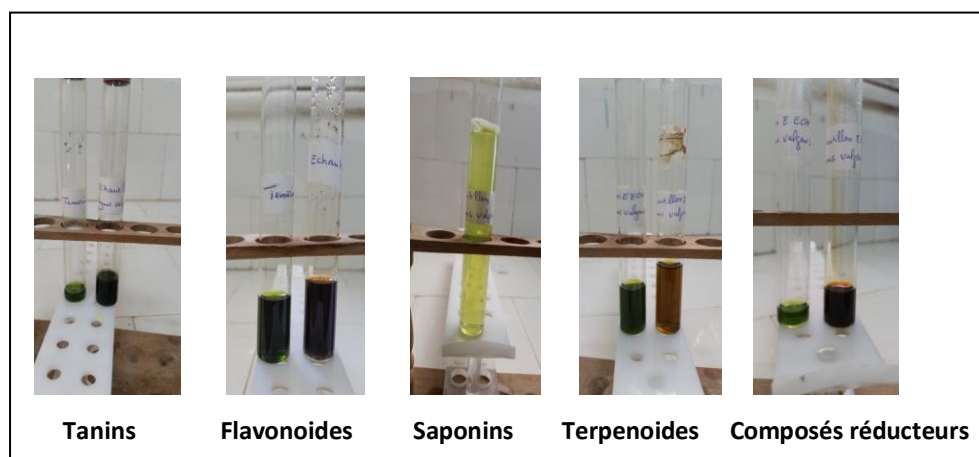
Annexe 2

Screening phytochimique

a) *T. serpyllum*

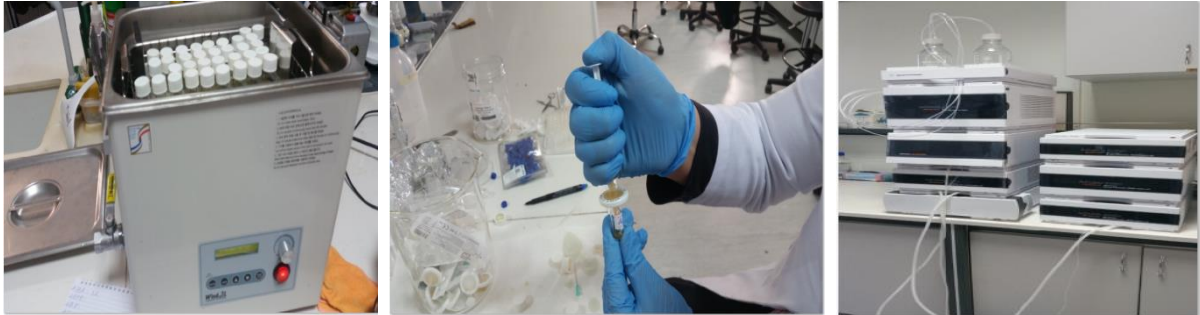


a) *T. vulgaris*



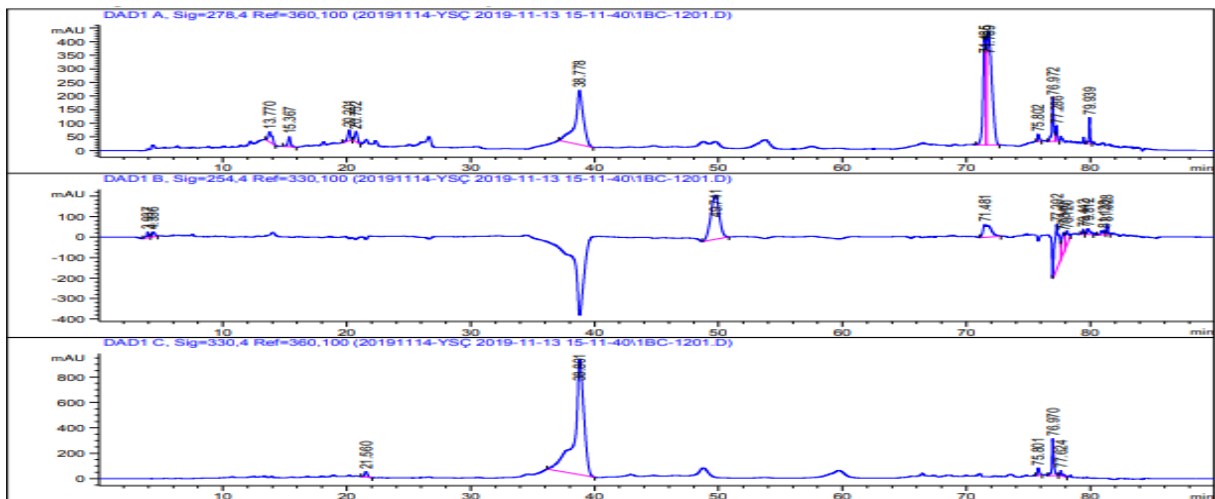
Annexe 3

Préparation des échantillons pour HPLC

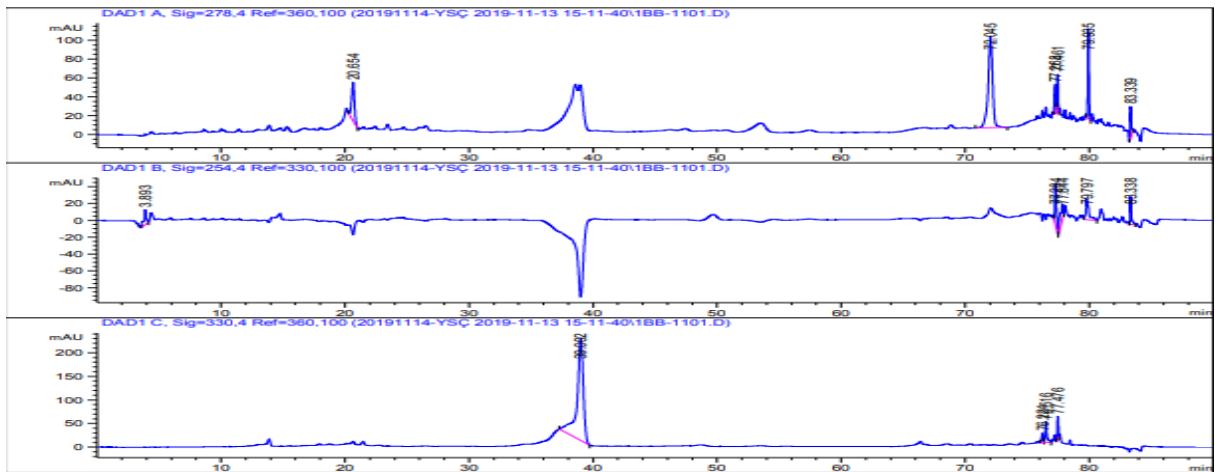


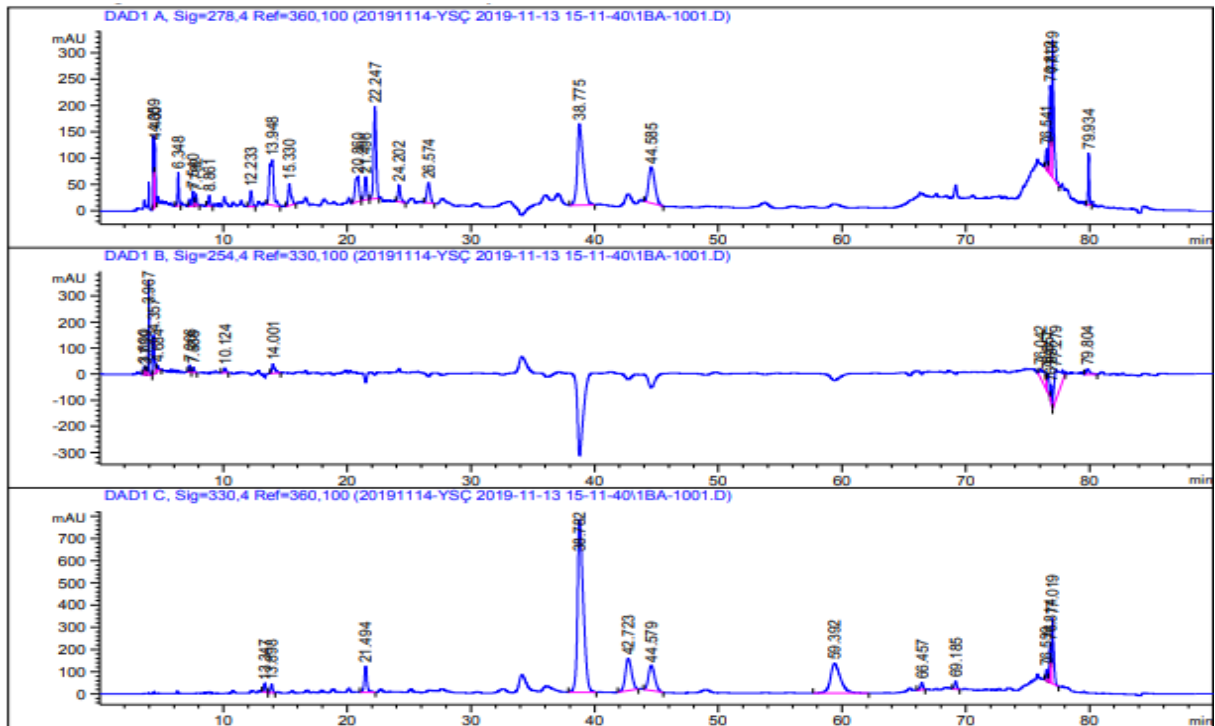
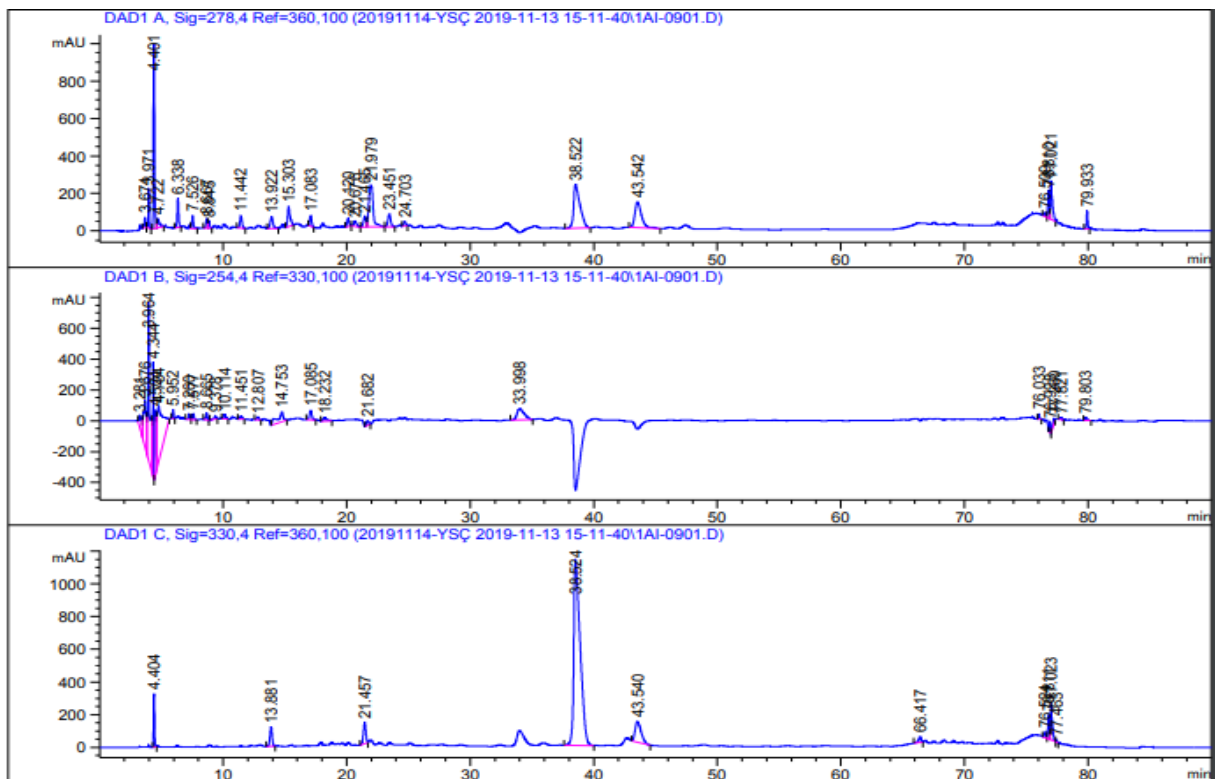
Annexe 4: Profil chromatographique des extraits phénoliques HPLC:

Extrait éthanolique de *T. serpyllum* (ETTS):



Extrait éthanolique de *T. vulgaris* (ETTV):



Extrait aqueux (infusé) de *T. serpyllum* AqTS:Extrait aqueux (infusé) de *T. vulgaris* AqTV:

Annexe 4

Absorbances des activités anti-oxydantes par le lecteur microplaque 96 puits

Test DPPH :

a) *T. serpyllum* :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,201	0,184	0,194	0,093	0,097	0,097	0,179	0,190	0,182	0,196	0,197	0,204
B	0,112	0,115	0,114	0,084	0,081	0,084	0,106	0,117	0,123	0,274	0,289	0,279
C	0,094	0,099	0,099	0,078	0,080	0,080	0,090	0,094	0,092	0,367	0,373	0,364
D	0,134	0,125	0,121	0,078	0,076	0,077	0,084	0,085	0,085	0,440	0,432	0,438
E	0,303	0,299	0,298	0,091	0,089	0,089	0,113	0,107	0,112	0,476	0,498	0,487
F	0,414	0,415	0,412	0,294	0,292	0,258	0,307	0,285	0,291	0,515	0,515	0,537
G	0,494	0,483	0,478	0,430	0,419	0,415	0,447	0,454	0,444	0,528	0,547	0,543
H	0,529	0,508	0,437	0,383	0,576	0,546	0,588	0,583	0,581	0,570	0,568	0,585

b) *T. vulgaris* :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,274	0,258	0,286	0,131	0,146	0,146	0,178	0,186	0,180	0,404	0,463	0,456
B	0,373	0,392	0,379	0,104	0,105	0,115	0,224	0,176	0,151	0,480	0,493	0,481
C	0,449	0,461	0,459	0,091	0,093	0,092	0,122	0,118	0,119	0,530	0,502	0,492
D	0,499	0,497	0,534	0,084	0,080	0,079	0,112	0,115	0,118	0,520	0,512	0,513
E	0,528	0,531	0,516	0,088	0,089	0,090	0,124	0,127	0,124	0,556	0,514	0,533
F	0,520	0,531	0,510	0,184	0,168	0,158	0,263	0,278	0,262	0,487	0,527	0,456
G	0,628	0,553	0,534	0,372	0,349	0,339	0,439	0,442	0,438	0,563	0,418	
H	0,369	0,552	0,556	0,555	0,561	0,543	0,595	0,587	0,595	0,363	0,369	

Test GOR :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,064	3,091	3,121	0,993	0,994	0,955	0,969	0,957	0,961	3,304	3,329	3,361
B	3,222	3,314	3,287	0,991	0,983	0,981	0,951	0,964	0,939	3,388	3,366	3,267
C	3,311	3,403	3,373	1,058	1,166	1,174	1,119	1,072	1,090	3,366	3,392	3,359
D	3,373	3,395	3,422	2,241	2,233	2,294	2,174	2,190	2,161	3,323	3,443	3,377
E	3,388	3,403	3,407	2,921	2,940	2,997	2,799	2,752	2,831	3,346	3,399	3,384
F	3,329	3,403	3,430	3,253	3,177	3,219	2,925	2,968	3,053	3,414	3,422	3,395
G	3,399	3,411	3,395	3,336	3,349	3,317	3,165	3,172	3,181	3,388	3,267	3,377
H	3,119	3,272	3,290	3,301	3,359	3,329	3,165	3,168	3,219	3,336	3,359	3,295

Test CUPRAC :

a) *T. serpyllum* :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,409	1,234	1,237	1,943	1,992	1,980	1,745	1,725	1,712	1,142	0,836	0,772
B	0,754	0,707	0,709	1,089	1,155	1,082	0,964	0,954	0,956	0,646	0,622	0,569
C	0,462	0,439	0,445	0,645	0,664	0,677	0,546	0,536	0,539	0,434	0,427	0,369
D	0,244	0,257	0,251	0,384	0,389	0,392	0,315	0,326	0,320	0,256	0,285	0,240
E	0,185	0,185	0,176	0,244	0,249	0,243	0,200	0,216	0,206	0,184	0,191	0,178
F	0,135	0,137	0,133	0,164	0,170	0,175	0,138	0,139	0,142	0,142	0,149	0,139
G	0,104	0,108	0,110	0,120	0,128	0,129	0,108	0,108	0,114	0,107	0,112	0,110
H	0,071	0,071	0,072	0,071	0,070	0,075	0,078	0,077	0,067	0,074	0,087	0,071

a) *T. vulgaris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,355	0,387	0,387	2,192	2,140	2,119	2,322	2,238	2,250	0,324	0,367	0,361
B	0,220	0,236	0,242	1,191	1,280	1,258	1,297	1,292	1,317	0,223	0,224	0,222
C	0,148	0,159	0,161	0,664	0,698	0,713	0,732	0,710	0,719	0,164	0,166	0,167
D	0,121	0,130	0,123	0,368	0,397	0,406	0,403	0,401	0,407	0,124	0,126	0,127
E	0,148	0,105	0,103	0,238	0,245	0,239	0,240	0,244	0,240	0,105	0,105	0,105
F	0,092	0,103	0,103	0,172	0,164	0,165	0,159	0,159	0,160	0,096	0,101	0,094
G	0,090	0,093	0,097	0,124	0,123	0,124	0,118	0,118	0,117	0,085	0,093	0,092
H	0,071	0,074	0,074	0,077	0,076	0,077	0,078	0,076	0,076	0,077	0,075	0,075

Test du pouvoir réducteur :

a) *T. serpyllum*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,591	0,783	0,670	0,969	1,078	0,996	1,100	1,122	1,007	0,471	0,555	0,553
B	0,482	0,511	0,464	0,708	0,745	0,801	0,623	0,919	1,041	0,399	0,634	0,411
C	0,314	0,290	0,264	0,661	0,665	0,772	0,677	0,755	0,704	0,249	0,287	0,310
D	0,197	0,201	0,233	0,515	0,445	0,523	0,433	0,404	0,412	0,156	0,157	0,149
E	0,138	0,159	0,154	0,283	0,273	0,275	0,273	0,270	0,283	0,125	0,123	0,128
F	0,108	0,103	0,110	0,207	0,195	0,203	0,143	0,144	0,144	0,103	0,113	0,105
G	0,098	0,089	0,090	0,113	0,133	0,135	0,112	0,098	0,109	0,096	0,103	0,101
H	0,062	0,063	0,064	0,057	0,063	0,071	0,055	0,047	0,049	0,066	0,060	0,069

b) *T. vulgaris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,236	0,288	0,294	1,193	0,794	1,048	0,740	0,679	1,037	0,208	0,198	0,228
B	0,154	0,134	0,167	0,758	1,173	1,143	0,766	1,189	0,730	0,121	0,135	0,136
C	0,093	0,117	0,104	0,817	0,762	0,738	0,912	0,626	0,711	0,104	0,110	0,111
D	0,082	0,082	0,080	0,497	0,533	0,489	0,534	0,530	0,536	0,064	0,090	0,082
E	0,074	0,074	0,073	0,266	0,305	0,312	0,309	0,323	0,336	0,062	0,072	0,071
F	0,063	0,068	0,074	0,203	0,196	0,182	0,200	0,201	0,186	0,074	0,073	0,067
G	0,064	0,068	0,074	0,112	0,129	0,131	0,146	0,119	0,151	0,068	0,066	0,060
H	0,063	0,067	0,059	0,060	0,066	0,065	0,050	0,051	0,053	0,064	0,059	0,058

T est phenanthroline :

a) *T. serpyllum*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,309	2,466	2,597	3,386	3,504	3,543	2,814	3,017	2,602	3,569	3,574	3,538
B	1,262	1,360	1,319	1,056	1,281	1,228	1,736	1,905	1,915	2,530	2,463	2,697
C	0,840	1,096	0,909	1,216	1,320	1,280	1,120	1,213	1,255	1,655	1,286	2,298
D	0,514	0,506	0,499	0,797	0,734	0,736	0,472	0,464	0,496	0,835	0,829	0,731
E	0,386	0,399	0,396	0,502	0,476	0,466	0,362	0,368	0,379	0,449	0,589	0,479
F	0,338	0,326	0,311	0,359	0,354	0,371	0,311	0,299	0,324	0,332	0,335	0,369
G	0,286	0,272	0,290	0,319	0,305	0,305	0,357	0,329	0,344	0,252	0,270	0,281
H	0,257	0,234	0,244	0,240	0,256	0,244	0,255	0,258	0,272	0,188	0,203	0,219

a) *T. vulgaris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,473	0,441	0,291	3,155	3,368	2,900	3,571	3,555	3,505	0,418	0,357	0,358
B	0,321	0,334	0,242	1,876	2,132	1,529	2,675	2,648	2,719	0,386	0,257	0,291
C	0,282	0,317	0,231	1,225	1,214	1,164	1,751	1,765	1,800	0,332	0,282	0,285
D	0,300	0,258	0,223	0,772	0,675	0,673	1,951	0,739	0,887	0,294	0,255	0,245
E	0,263	0,287	0,249	0,519	0,515	0,484	0,733	0,907	1,010	0,292	0,259	0,253
F	0,275	0,276	0,232	0,364	0,398	0,343	0,716	0,790	0,756	0,285	0,226	0,254
G	0,264	0,261	0,262	0,311	0,320	0,314	0,323	0,340	0,327	0,267	0,268	0,268
H	0,278	0,273	0,272	0,270	0,282	0,302	0,289	0,284	0,269	0,289	0,276	0,290

Annexe 5

Pourcentages d'inhibition des activités antioxydante

Tableau 1 : Pourcentages d'inhibition DPPH des extraits phénoliques

	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	IC ₅₀
EETS	0.8±0.89	6.9±0.79	11.26±1.84	28.21±0.41	54.65±0.81	85.06±0.11	85.12±0.2	25.12±0.23
EETV	05,2±1.23	11,49±0.42	21,45±2.38	42,24±1.12	75,93±1.12	82,95±0.35	84,16±0.2	15.78±0.09
AqTS	05,8±3.47	08,72±0.63	09,5±2.83	24,12±0.30	44,39±2.08	79,8±0.64	81,61±0.3	29.14±0.4
AqTV	4,87±2.47	9,68±1.75	15,36±0.72	28,33±1.30	53,8±0.95	73,86±0.61	75,26±0.12	23.14±0.45
Trolox	13,33±2.1	30,19±0.67	61,48±2.98	87,16±0.28	87,72±0.11	88,46±0.47	92.13±0.1	5.12±0.2
Ac ascor	12,9±0.28	29,69±0.39	76,67±0.38	84,94±0.84	86,36±0.49	87,78±0.22	90.21±0.2	4.39±0.1

Tableau 2: Pourcentages d'inhibition DPPH des huiles essentielles

	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
HETS	0,23±1.86	2,82±0.12	9,45±2.05	18,81±0.77	31,58±0.85	47,82±1.42	63.00±0.81	530.4±6.04
HETV	/	/	4.45±0.68	11.57±0.37	16,03±0.85	24.82±0.80	51,89±0.12	783.09±4.74
Trolox	87,16±0.28	87,72±0.11	88,46±0.47	92.13±0.1	NT	NT	NT	5.12±0.21
Ac ascor	84,94±0.84	86,36±0.49	87,78±0.22	90.21±0.2	NT	NT	NT	4.39±0.01

NT : Non testé.

Tableau 3: Pourcentages d'inhibition GOR des extraits phénoliques

	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	IC ₅₀
EETS	0.15±0.58	3.47±1.19	10.30±1.95	28.65±0.96	62.71±1.30	70.45±0.37	71.55±0.12	24.56±1.69
EETV	/	1.57±1.17	9.64±1.21	30.96±1.02	65.34±1.98	69.86±0.16	69.99±0.68	23.26±1.10
AqTS	3.99±1.18	7.38±0.41	12.12±1.05	29.29±0.65	61.58±1.58	71.51±0.45	71.30±0.24	25.13±0.82
AqTV	2.91±0.25	8.74±1.99	14.50±1.22	33.44±0.44	66.53±0.73	70.89±0.38	70.55±0.19	21.29±0.34
Trolox	13.93±0.35	41.22±1.88	71.32±0.08	71.82±0.44	72.42±0.35	89,36±0.37	91.32±0.02	4.31±0.05
Ac ascor	14.11±0.81	20.40±0.47	69.24±0.10	69.42±0.10	70.99±0.00	85,18±0.12	90.23±0.87	5.02±0.01

Tableau 4: Pourcentages d'inhibition GOR des huiles essentielles

	12,5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀
HETS	/	/	/	2.40±0.51	12.60±0.32	14.53±0.45	62.30±0.24	443.40±1.47
HETV	/	/	/	1.34±0.47	5.98±0.53	15.12±0.38	59.87±0.47	521.27±3.75
Trolox	71.82±0.44	72.42±0.35	89.36±0.37	91.32±0.02	NT	NT	NT	4.31±0.05
Ac ascorb	69.42±0.10	70.99±0.00	85.18±0.12	90.23±0.87	NT	NT	NT	5.02±0.01

Annexe 6

Absorbances des différentes concentrations des activités antioxydante

Tableau 1 : Pouvoir réducteur des extraits phénoliques et des huiles essentielles

Concentration	Absorbance							A0.5
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
EETS	0.13±0.01	0.20±0.01	0.28±0.01	0.49±0.04	0.70±0.06	0.75±0.05	1.01±0.06	31.69±2.30
EETV	0.12±0.01	0.19±0.01	0.29±0.02	0.51±0.02	0.77±0.04	1.02±0.23	1.01±0.20	28.25±0.16
AqTS	0.11±0.01	0.14±0.0	0.28±0.01	0.42±0.01	0.71±0.04	0.86±0.21	1.08±0.06	33.04±1.85
AqTV	0.14±0.02	0.20±0.01	0.32±0.01	0.53±0.0	0.70±0.07	0.77±0.12	0.99±0.23	28.01±4.07
HETS	0.10±0.0	0.11±0.0	0.13±0.01	0.15±0.0	0.28±0.03	0.48±0.07	0.58±0.05	262.73±2.26
HETV	0.06±0.0	0.07±0.0	0.07±0.01	0.08±0.01	0.11±0.0	0.25±0.03	0.49±0.09	248.57±3.24
Trolox	0.28±0.05	0.60±0.04	0.84±0.12	0.93±0.30	1.18±0.34	1.37±0.20	1.44±0.21	5.25±0.20
Ac ascorbique	0.47±0.03	0.79±0.29	0.96±0.02	1.37±0.08	1.51±0.03	1.79±0.01	1.92±0.01	3.62±0.29

Tableau 2: Absorbances pour le test CUPRAC

Concentration	Absorbance							A0.5
	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	
EETS	0.13±0.0	0.17±0.01	0.25±0.00	0.39±0.0	0.66±0.02	1.11±0.04	1.97±0.03	17.83±0.53
EETV	0.12±0.01	0.17±0.00	0.24±0.01	0.39±0.02	0.69±0.03	1.21±0.05	2.15±0.04	17.38±1.09
AqTS	0.11±0.01	0.14±0.0	0.21±0.01	0.32±0.01	0.54±0.01	0.96±0.01	1.73±0.02	23.25±0.45
AqTV	0.12±0.01	0.16±0.00	0.24±0.01	0.40±0.0	0.72±0.01	1.30±0.01	2.27±0.05	16.70±0.39
HETS	0.11±0.0	0.14±0.01	0.18±0.01	0.26±0.02	0.41±0.04	0.64±0.01	0.92±0.20	37.87±2.49
HETV	0.09±0.01	0.10±0.0	0.11±0.01	0.13±0.00	0.17±0.01	0.36±0.03	0.63±0.00	78.22±0.42
Trolox	0.18±0.01	0.25±0.00	0.40±0.01	0.67±0.02	1.34±0.13	NT	NT	8.69±0.14
Ac ascorbique	0.18±0.03	0.24±0.01	0.41±0.01	0.71±0.02	1.38±0.11	NT	NT	8.31±0.15

Tableau 3: Absorbances pour le test phenanthroline

Concentration	Absorbance							A0.5
	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	
EETS	0.31±0.01	0.36±0.01	0.48±0.02	0.76±0.04	1.27±0.05	1.19±0.12	3.48±0.08	13.40±0.72
EETV	0.32±0.01	0.37±0.03	0.51±0.02	0.71±0.06	1.20±0.03	1.85±0.30	3.14±0.23	13.45±1.21
AqTS	0.34±0.01	0.31±0.01	0.37±0.01	0.48±0.02	1.20±0.07	1.85±0.10	2.81±0.21	24.27±5.40
AqTV	0.33±0.01	0.75±0.04	0.88±0.14	1.19±0.66	1.77±0.03	2.68±0.04	3.54±0.03	4.89±1.15
HETS	0.27±0.01	0.35±0.02	0.51±0.07	0.80±0.06	1.75±0.51	2.56±0.12	3.56±0.02	12.76±1.18
HETV	0.20±0.02	0.27±0.01	0.35±0.02	0.51±0.07	0.80±0.06	0.96±0.01	1.56±0.02	26.69±2.58
Trolox	0.32±0.01	0.38±0.01	0.56±0.02	0.73±0.02	1.24±0.01	NT	NT	5.21±0.27
Ac ascorbique	0.37±0.01	0.50±0.01	0.80±0.02	0.91±0.02	1.33±0.02	NT	NT	3.08±0.02

Annexe 8

Conditions d'élevage des souris



Travaux scientifiques

Chemical profile, antioxidant and photoprotective activities of essential oil and crude extracts of Algerian *Thymus serpyllum*

Nariman Madouni¹, , Boumediene Meddah¹, Tir Touil Aicha¹, Chawki Bensouici², Yavuz S Cakmak³, Alessandra Piras⁴, Danilo Falconieri⁴, Pascal Sonnet⁵

¹Bioconversion, Microbiological Engineering and Health Safety, SNV Faculty, Mustapha Stambouli University Sidi Said, Mascara 29000, Algeria

²Centre de Recherche en Biotechnologie, Ali Mendjli, Nouvelle Ville UV 0.3, Constantine BP E73, Algeria

³Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of science and Letters, Aksaray University, Aksaray 68100, Turkey

⁴Department of Chemical and Geological Sciences, University of Caligari, Citadella Universitaria, SP 8, Monserrato-Sestu Km 0.700, Monserrato (CA) 09042, Italy

⁵AGIR Laboratory: Agents Infectieux, Résistance et Chimiothérapie, EA4294 UFR de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens 80037, France

 Corresponding author: nariman.madouni@univ-mascara.dz

Article info

Article history:

Received: 20th March 2021

Accepted: 16th August 2021

Keywords:

Antioxidant
Essential oil
GC/MS
HPLC
Phenolic extracts
Thymus serpyllum

Abstract

Thymus serpyllum L. is an aromatic and medicinal plant widely used in Algerian folk medicine. It was collected from the Mascara region in the North-West of Algeria and studied with the aim to provide more knowledges and update about chemical composition, antioxidant and skin-protective activities of essential oil, ethanolic and infusion extracts. The chemical analysis of investigated *T. serpyllum* essential oil (EO) was performed for the first time in this research work. It was carried out by GC/MS for identifying of 25 components where the dominated compounds were carvacrol (66 %) and γ -terpinene (11.5 %). Ethanolic and infusion extracts were analyzed using HPLC/DAD detector type chromatography and revealed that benzoic acid and rosmarinic acid were found as the major compounds. The antioxidant activity was determined using the DPPH, galvinoxyl radical (GOR), CUPRAC, reducing power, and *O*-phenanthroline methods. All extracts showed a significant antioxidant capacity with different mechanisms. However, ethanol and infusion extracts showed stronger capacity than EO. Moreover, the photo-protective (skin-protective) activity of *T. serpyllum* extracts was explored for the first time in our study. Extracts exhibited high values of Sun Protective Factors (SPF) with 38.34 ± 2.29 and 38.82 ± 2.23 for ethanol and infusion extract, respectively. These results suggest a potential use of *Thymus serpyllum* as a source of bioactive compounds with antioxidant and skin-protective properties.

© University of SS. Cyril and Methodius in Trnava

Introduction

A permanent exposure to various stimulus and aggressors can generate the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) with higher concentrations. These

reactive species are produced by a variety of biochemical processes (e.g. production of energy ATP, biosynthetic and detoxification reactions) and can be neutralized by molecules called “antioxidants” (Martins *et al.* 2015; Yang *et al.* 2018). An excess of production with a low level of

antioxidants can lead to the appearance of almost all pathologies such as inflammations, cancer, Alzheimer, aging and skin diseases (Kindl *et al.* 2015). Therefore, some studies are in quest for natural products that can be applied orally or topically to ameliorate skin reactions, reverse and block UV radiations (Korać and Khambholja 2011). In food processing, one of the main problems is lipid oxidation that can occur especially during storage and distribution, leading to the development of disagreeable flavors and potential occurrence of toxic substances (Shahidi and Ho 2007). As a preventive strategy the antioxidants are remarkably used as additives. Therefore, an increasing interest in natural antioxidants provides aromatic and medicinal plants as an alternative (Zehiroglu and Sarikaya 2019). Among these plants, those belonging to *Thyme* genus comprising of 215 species, mainly prevalent in Mediterranean regions, North Africa, South Europe, and Asia (Jarić *et al.* 2015). *Thymus serpyllum* L. known as wild thyme and called “Zaatar” in regional language, grows naturally in the Mascara Mountains. Since antique times, infusions and decoctions of wild thyme were used in folk medicine. Fresh and dry leaves are used in Mediterranean kitchen as flavoring and preservative food agent (Nikolić *et al.* 2014). Based on the bioactivity of wild thyme reported in literature and no such investigations were performed about *T. serpyllum* of the Mascara region, the aim of this study was to explore the chemical profile and to determinate different mechanisms of antioxidant potential of EO, ethanol and infusion extracts. Further a skin-protective activity was investigated to estimate the sun protection factor (SPF).

Experimental

Plant material and reagents

The aerial parts of investigated *Thymus serpyllum* L. were gathered during the flowering stage (May – July 2019) in the North-West of Algeria (Mascara region). Botanical identification was achieved by Prof. Benhassaini Hachemi and the voucher specimen (E01/LBV/UDL/2019) has been deposited at the Herbarium. The collected material

(leaves and flowers) was dried in shade at a temperature 28 – 30 °C for 10 days, then grinded into fine powder.

The chemical products and reagents used in all experiments were: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), neocuproine, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), trichloroacetic acid (TCA), 1,10-phenanthroline, potassium ferricyanide, ethanol, methanol, acetone (all were obtained from Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany. The iron (III) chloride (FeCl₃), ammonium acetate, and copper (II) chloride (CuCl₂) were obtained from Biochem Chemopharma (Cosne-Cours-sur-Loire, France). Magnetic stirrer and Clevenger were used for preparation of crude extracts and essential oil respectively. Antioxidant and photoprotective activities were carried out on a 96-well microplate reader EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Inc., Waltham, USA).

Extracts preparation

Essential oil (EO) was isolated by hydro-distillation using Clevenger apparatus for 3 h. The yield (%) was given as weight of EO on weight of 100 g plant powder (w/w). In order to prepare an ethanolic extract, 20 g of plant powder was extracted by 200 mL of ethanol for 24 h under stirring in the dark. Taking in consideration that wild thyme is traditionally used as a tea infusion; 200 mL of boiling distilled water is poured over 20 g of plant powder. The mixture was left for 30 min with occasional agitation. Extracts were filtered and evaporated under reduced pressure until dryness. The obtained EO, ethanol and infusion extracts were stored in dark glass bottles in the freezer (-20 °C) until characterizations (GC/MS, HPLC) and antioxidant evaluations.

GC/MS analysis

Extracted EO was analyzed using gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Analytical gas chromatography-flame ionization detector (GC/FID) was performed using an Agilent chromatograph fitted with the Agilent 7683B autosampler (Agilent Technologies, Inc., Santa

Clara, USA) (1 : 20 split ratio), fused silica column and dual flame ionization detectors (FID). The operation conditions were as follows: volume of 1 μ L sample (diluted in n-hexane 1 : 100, w/w) was injected and helium was used as a carrier gas. EO analysis was carried out by GC/MS system consisted of a gas chromatograph (Agilent Model 6890N, Santa Clara, CA) with HPL capillary column and connected to a quadruple mass spectrometer detector. The operating conditions for GC analysis were the same as described above for GC/FID. The MS conditions were as follows: ionization energy voltage 70 eV; quadruple temperature 150 °C; interface temperature 205 °C and mass spectra scan at a rate of 5 scan/S. Identification of sample compounds was performed by making comparison of their mass spectra with NIST 02 data and Adams mass spectra libraries. Premised on GC/FID peak areas without FID response factor correction, the percentage of each component was estimated.

HPLC characterization

Phenolic characterization was achieved following the method described by [Caponio et al. \(1999\)](#). With minor modifications qualitative and quantitative evaluation were performed using the HPLC instrument HP-Agilent 1292 infinity on C18 column with DAD diode array detector. Extracts were prepared in a concentration of 20 mg.mL⁻¹ and the injected volume into the column was 10 μ L. The mobile phase used was a 3 % acetic acid (v/v) in (A) water and (B) methanol. Elution gradient was used as follows: 93 % A/ 7 % B for 0.1 min, 72 % A/ 28 % B for 20 min, 75 % A/ 25 % B for 8 min, 70 % A/ 30 % B for 7 min and 15 min a similar gradient was 67 % A/ 33 % B for 10 min, 58 % A/ 42 % B for 2 min, 50 % A/ 50 % B for 8 min, 30 % A/ 70 % B for 3 min, 20 % A/ 80 % B for 2 min and 100 % B in 5 min till the end of the run [Abdulqadir et al. \(2018\)](#). Detection of eluates was carried out at 278 nm and retention times of analyzed phenolic compounds were compared with the following available pure standards: gallic acid, (+)-catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid, epicatechin, syringic acid, coumaric acid, transferrulic acid, sinapic acid, benzoic acid, hesperidin, rosmarinic acid, cinnamic

acid and quercetin. The quantitative analysis was determined using external calibration curve of each standard and the results were expressed as μ g.g⁻¹ of extract.

DPPH free radical scavenging assay

The antioxidant effect of extracts in scavenging DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical was evaluated according to [El Aanachi et al. \(2020\)](#). About 40 μ L of sample ranging at different concentrations was added to 160 μ L DPPH methanol solution (0.1 mM). After 30 min of incubation, absorbances were read at 517 nm. The antioxidant standard used is Trolox. The results were expressed as 50 % inhibition concentration (IC₅₀) and mentioned as means \pm SD data.

Galvinoxyl free radical scavenging activity (GOR)

GOR scavenging assay was determined according to the described method of [Shi et al. \(2001\)](#). A volume of 40 μ L of sample at different concentrations was added to 160 μ L of methanolic solution of galvinoxyl (0.1 mM). After 120 min incubation, the absorbance was evaluated at 428 nm. Methanolic galvinoxyl solution was used as a control and Trolox as a standard.

Reducing power assay

The reducing power of tested samples was performed according to [Gali and Bedjou \(2019\)](#), with minor modifications. 10 μ L of sample was mixed with 40 μ L of phosphate buffer 0.2 M (pH 6.6), 50 μ L of 1 % K₃Fe(CN)₆ and then the plate was incubated at 50 °C for 20 min. 50 μ L of 10 % TCA (trichloroacetic acid), 40 μ L H₂O and 10 μ L of 0.1 % FeCl₃ (ferric-chloride) were added. The absorbance of the resulting mixture was measured at 700 nm and results were expressed as absorbance A_{0.50} μ g.mL⁻¹ which represented the concentration producing 0.5 absorbance.

CUPRAC assay

The cupric reducing antioxidant ability was performed according to the CUPRAC method of [Apak et al. \(2004\)](#). In each well of the microplate a

mixture was constituted with 40 μL of sample, 60 μL ACNH_4 (ammonium acetate) buffer, pH 7.50, 50 μL neocuproine and 50 μL of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (copper II chloride solution). The absorbance was measured at 450 nm after 60 min of incubation. Results had been given as absorbance $A_{0.5} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Phenanthroline assay

The evaluation of phenanthroline activity was carried out in accordance with the method described by Szydłowska-Czerniaka *et al.* (2008). Briefly, into 96 well round-bottomed plate 10 μL of extract at various concentrations were placed, then 30 μL of *O*-phenanthroline (0.5 %), 50 μL of FeCl_3 (0.2 %), and 110 μL of methanol were added. After 20 min of incubation in the dark at 30 $^\circ\text{C}$, the absorbance was measured at 510 nm. The values of the measurements have been expressed as $A_{0.5} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Photoprotective (skin-protective) activity

The photoprotective activity was achieved following Mansur *et al.* (1986) and El Aanachi *et al.* (2021). The samples were prepared at a concentration of 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ diluted in absolute ethanol and then analyzed at wavelengths from 290 to 320 nm (UV) with spans of 5 nm, using ethanol as a blank. SPF was calculated using the formula (Eq. 1):

$$\text{SPF}_{\text{spectrophotometric}} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad (1)$$

Where: $\text{EE}(\lambda)$ is the erythemal effect spectrum.

$\text{I}(\lambda)$ is solar intensity spectrum.

$\text{Abs}(\lambda)$ is absorbance.

CF is the correction factor (= 10).

$\text{EE}(\lambda)$ and $\text{I}(\lambda)$ are steady values.

Statistical analysis

Experimental tests were achieved in triplicate ($n = 3$) and results were given as means with standard deviation (mean \pm SD). Values of IC_{50} and $A_{0.5}$ for *in vitro* antioxidant activities were estimated by linear regression analysis and statistical significances were established at $P \leq 0.05$ using

variance analysis ANOVA One-way and Tukey test (multiple range comparison).

Results

Chemical composition of essential oil

The chemical profile of *T. serpyllum* EO from the Mascara region was described for the first time in this research and the chromatogram is presented in (Fig. 1). The obtained EO was light yellow in color, had a strong smell and yielded at 5.66 % (w/w).

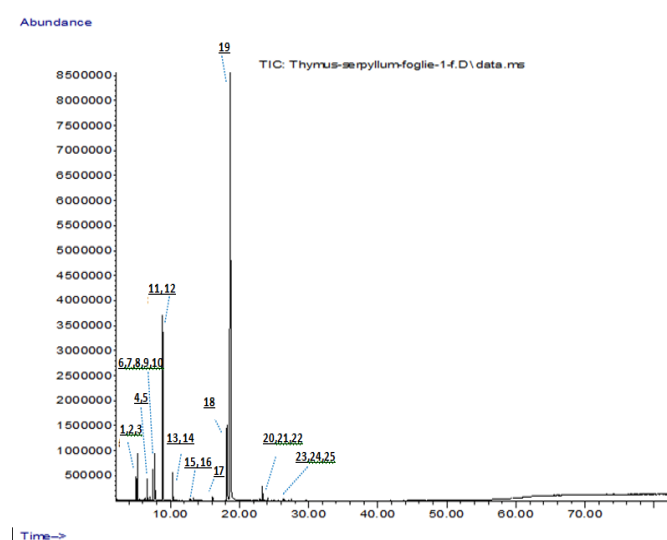


Fig. 1. Chromatogram of *Thymus serpyllum* essential oil.

Identified compounds with relative amounts and retention times are illustrated in Table 1 where, twenty-five compounds were found. Carvacrol was detected as the main component at 66 % of the essential oil. The γ -terpinene was detected at (11.5 %), thymol (7.5 %) and *p*-cymen (3.9 %). In lower percentages, other components were present as α -pinene, linalool, myrcene, and α -thujene.

Determination of phenolic profile

Ethanollic and infusion extracts of *T. serpyllum* were analyzed by HPLC-DAD detector type. The investigation of the phenolic pattern was performed using 15 phenolic standards. Results are in Table 2 and were expressed in $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of extract. Rosmarinic acid was the main component of infusion (17,250 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), followed by benzoic acid (5,200 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

and hydroxybenzoic acid ($1,020 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Besides the abundant compounds in ethanolic extract were benzoic acid and hydroxybenzoic ($2,450 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $1,340 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Syringic acid, coumaric acid, and sinapic acid were detected ($50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $60 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and $70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively) in the ethanolic extract and not identified in the infusion. Quercetin was not found in both extracts.

Antioxidant activities

For the anti-radical scavenging ability test, the DPPH and galvinoxyl free radicals were used. According to results of the DPPH scavenging assay mentioned in Table 3, the ethanolic and infusion extracts proved that both presents an excellent scavenging activity with an IC_{50} values of (25.12 ± 0.23 and $29.14 \pm 0.41 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). The EO have shown the lowest radical scavenging activity with IC_{50} ($>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). These results are

less than antioxidant standard Trolox ($5.12 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). For GOR free radical assay, the results are indicated in Table 3, where ethanolic and infusion extract revealed a similar activity with values of IC_{50} (24.56 ± 1.69 and $25.13 \pm 0.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The results of the ferric reducing power presented in Table 3 showed that the ethanolic extract exhibited the lower $A_{0.5}$ ($31.70 \pm 2.31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in meaning, the highest activity in comparison with infusion extract and EO (33.04 ± 1.84 and $>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). Analysis data of CUPRAC assay mentioned in Table 3 indicated that ethanolic extract showed the best reducing copper transition metals with an $A_{0.5}$ ($17.83 \pm 0.54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) close moderately to Trolox ($8.69 \pm 0.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and ascorbic acid ($8.31 \pm 0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Infusion and EO presented $A_{0.5}$ values of (23.25 ± 0.46 and $37.30 \pm 2.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) respectively.

Table 1. Chemical composition in (%) of essential oil from *Thymus serpyllum* by GC/MS with retention indices on HP-5MS capillary column.

Peak	Tr [sec]	Tr [min]	RI [log. Kovats]	Compound	Formula	Class	Area [%]
1	303	5.0422	929	α -Thujene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	1.0
2	313	5.2171	937	α -Pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	2.0
3	335	5.5843	952	Camphene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.1
4	378	6.3056	979	β -Pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.1
5	400	6.6685	991	Myrcene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	1.1
6	425	7.0838	1005	γ -Phellandrene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.2
7	436	7.2630	1012	iso-Sylvestrene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.1
8	448	7.4597	1018	α -Terpinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	1.7
9	463	7.7089	1027	p-Cymene	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}$	MH	3.9
10	471	7.8444	1031	Limonene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.6
11	509	8.4827	1050	(E)- β -Ocimene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.1
12	532	8.8717	1062	γ -Terpinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	11.5
13	594	9.9034	1089	Terpinolene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	MH	0.1
14	61	10.3187	1099	Linalool	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	MO	2.0
15	771	12.8542	1167	Borneol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	MO	0.2
16	801	13.3439	1178	Terpinene-4-ol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	MO	0.2
17	966	16.1023	1246	Carvacrol methyl ether	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	Phpr	0.3
18	1090	18.1701	1293	Thymol	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	MO	7.0
19	1121	18.6903	1305	Carvacrol	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	MO	66.0
20	1376	22.9395	1407	α -Gurjunene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	SH	0.1
21	1399	23.3242	1418	(E)-Caryophyllene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	SH	1.1
22	1446	24.1023	1438	Aromadendrene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	SH	0.1
23	1582	26.3668	1493	Viridiflorene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	SH	0.2
24	1650	27.5034	1522	δ -Cadinene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	SH	0.1
25	1772	29.5318	1572	Spathulenol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	SO	0.1

Notes: Total identified = 99.9%; MH: monoterpenes hydrocarbons = 22.5 %; MO: oxygenated monoterpenes = 75.4 %; SH: sesquiterpene hydrocarbons = 1.6 %; SO: sesquiterpene oxygenated = 0.1 %; Phpr: phenylpropanoids = 0.3%; Tr: retention time; RI: retention indices.

Table 2. Qualitative and quantitative phenolic composition of *T. serpyllum*.

Phenolic compounds	Ethanol extract [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Infusion extract [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
Gallic acid	80	80
(+)-Catechin	630	680
Chlorogenic acid	60	170
Caffeic acid	100	20
Hydroxybenzoic acid	1340	1020
Epicatechin	130	630
Syringic acid	50	ND
Coumaric acid	60	ND
Trans-ferrulic acid	250	110
Sinapic acid	70	ND
Benzoic acid	2450	5200
Hesperidin	300	610
Rosmarinic acid	480	17250
Cinnamic acid	10	190
Quercetin	ND	ND

ND: Not Determined

As seen in the Table 3 for the phenanthroline assay, the EO expressed the best antioxidant capacity with value of ($12.77 \pm 1.19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) followed by

ethanol extract $A_{0.5}$ ($13.40 \pm 0.73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and infusion with ($21.42 \pm 0.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Table 3. Antioxidant activity of *T. serpyllum* extracts.

Extracts	DPPH	GOR	Reducing power	CUPRAC	Phenanthroline
	IC ₅₀ [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	IC ₅₀ [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	A _{0.5} [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	A _{0.5} [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	A _{0.5} [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Ethanol extract	25.12 ± 0.23^b	24.56 ± 1.69^a	31.70 ± 2.31^a	17.83 ± 0.54^c	13.40 ± 0.73^b
Infusion extract	29.14 ± 0.41^a	25.13 ± 0.82^a	33.04 ± 1.84^a	23.25 ± 0.46^b	24.27 ± 5.40^a
Essential oil	>100	>100	>200	37.30 ± 2.20^a	12.77 ± 1.19^b
Trolox	5.12 ± 0.21^c	4.31 ± 0.05^b	5.25 ± 0.20^b	8.69 ± 0.14^d	5.21 ± 0.27^c
Ascorbic acid	4.39 ± 0.01^d	5.02 ± 0.01^b	3.62 ± 0.29^b	8.31 ± 0.15^d	3.08 ± 0.02^c

Notes: A_{0.5} and IC₅₀ are mentioned as concentrations at 0.5 absorbances and concentration making 50 % inhibitions percentages respectively. Values of A_{0.5} and IC₅₀ are indicated as Means \pm SD of three tests and the values stated in the unchanged column with different superscripts (**a, b, c, d**) presents significant differences at ($P < 0.05$).

(>100) indicates that values of IC₅₀ and A_{0.5} are higher than $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

The photo-protective (skin-protective) activity

The dermoprotective activity of *T. serpyllum* extracts is investigated for the first time by measuring of the Sun Protection Factor (SPF). The SPF values for wild thyme extracts are presented in Table 4. Infusion and ethanolic extracts showed similar values with SPF (38.82 ± 2.23 and 38.34 ± 2.29 , respectively). EO exhibited a weak activity with (4.81 ± 0.25).

Table 4. SPF values of *T. serpyllum* extracts.

Extracts	SPF
Ethanolic	38.34 ± 2.29
Infusion	38.82 ± 2.23
Essential oil	4.81 ± 0.25

Values of SPF are indicated as means \pm SD of three tests.

Discussion

Essential oils extracted from aromatic and medicinal plants are constituted of various volatile and lipophilic compounds, obtained from various chemical classes (Turek and Stintzing 2013).

The yield of extracted essential oil by hydrodistillation from *T. serpyllum* was in accordance to the [European Pharmacopoeia \(2010\)](#) (a minimum of 0.3 % (w/w)) as mentioned by ([Wesołowska et al. 2012](#)). Reported yields from Poland and Jordan were 2.5 % and 1.05 %, respectively, according to studies of [Abu-Darwish et al. \(2009\)](#) and [Wesolowska et al. \(2014\)](#). Comparing these results with ours, the content (5.66 %) of extracted EO was higher. The chemical composition after analysis by GC/MS revealed that carvacrol was the main component. Thus, it agreed with those reported by [Kirillov et al. \(2016\)](#). However, the amount of carvacrol detected (66 %) was higher in comparison with other studies. Significant differences were observed about a major component of *T. serpyllum* where it was found p-cymene in the Italian wild *Thyme* ([D'Auria and Racioppi 2015](#)). The difference in percentages of carvacrol, γ -terpinene, and p-cymene in *T. serpyllum* can be affected by climatic factors following reports of [Wesołowska et al. \(2012\)](#). The results of the GC/MS analysis showed a wide variation in main components and their amount from those mentioned in other works. According to [Banaeva et al. \(1998\)](#), these variations can be attributed to the geographical source, collecting season, climatic conditions and extraction methods. Polyphenol compounds such as phenolic acids, flavonoids, tannins, and coumarins can be extracted from plants using several techniques and different solvents ([Perron and Brumaghim 2009](#)). The chromatographic analysis in the conducted study detected the rosmarinic acid, hydrobenzoic acid, and benzoic acid as the main components. Our results are similar to those of [Janiak et al. \(2017\)](#) who have reported that rosmarinic acid is the main component in aqueous extract of wild thyme. Furthermore, it was found with higher amounts than their results. Quercetin was not found in both extracts which is in conformity with [Miron et al. \(2011\)](#) studies. According to [Jovanović et al. \(2016\)](#) the concentration of phenolic compounds and their structure can influence their bioactive properties. Studies reported by [Jovanović et al. \(2019\)](#) confirmed that the phenolic pattern of thyme species can be influenced by variability of experimental extraction methods including solvent

type (polarity, ratio and mixture), temperature also bound and free phenolic extracts.

Evaluation of antioxidant ability for crude extracts must be performed using more than one method due to the complexity of the antioxidant process ([Aruoma 2003](#)). For the anti-radical scavenging ability test, DPPH and galvinoxyl free radicals were used. The GOR and DPPH radical scavenging power were evaluated in term of hydrogen atom and/or electron donating capacity and determined by IC₅₀ where low values represent high antioxidant capacities.

The infusion presented a high amount of rosmarinic acid in the HPLC analysis than ethanol extract but slightly low antioxidant potential. This can be explained by reports of [Kulišić et al. \(2006\)](#) who mentioned that the power of compounds in water infusions may decrease a little due to their dilution and combination with other substances in the mixture of infusion. The ethanolic and infusion extracts showed the best free radical scavenging activity using the galvinoxyl free radical than DPPH. These results are consistent with works of [Tirzitis et al. \(2010\)](#) who revealed that galvinoxyl is more reactive against phenolics and tightly allied to physiological oxygen radical action than DPPH. The CUPRAC and reducing power antioxidant assays were assessed in order to associate properties of *T. serpyllum* bioactive compounds with their antioxidant potential (iron binding capacity). Obtained results about the reducing power of iron indicated the ability of *T. serpyllum* polyphenols to act as electron donors. [Eghbaliferiz \(2016\)](#) mentioned that polyphenols are able to form a stable complex with transition metals. Regarding the CUPRAC, the antioxidant activity is determined on measurement of absorbance for a yellow-orange complex (copper (I)-neocuproine) obtained by reduction of copper (II) into copper (I) in the presence of antioxidant compounds at 450 nm. This method was developed by [Apak et al. \(2004; 2007\)](#) who reported that this reaction can estimate lipophilic and hydrophilic antioxidants (α -tocopherol and β -carotene) at the same time. [Külcü et al. \(2019\)](#) reported a lower cupric reducing activity than our results for ethanolic extract of Turkish *T. serpyllum*. Basing on our results and according to [Apak et al. \(2004\)](#) the CUPRAC reagent was sensitive against thiol-kind oxidants

and entails faster kinetics than reducing power method. Furthermore, [Kim and Choe \(2018\)](#) stated that the metal chelating activity depended on structure, location and number of hydroxyl groups, pH, and the concentration of polyphenols. Evaluation of antioxidant activity with phenanthroline method is based on the iron chelating ability of extracts by reacting with formed complex ferrous-*O*-phenanthroline and reducing the Fe (III) to Fe (II) ([Berker et al. 2007](#)). This method was used for extracts and edible oils as reported by [Szydłowska-Czerniak et al. \(2008\)](#) but as far as we could possibly know that was not tested for essential oils. Depending on our results, essential oil revealed the higher reducing ability and was quite similar to ethanolic extract. This can be explained by its richness of phenols (carvacrol 66 % and thymol 7.5 % as mentioned above in GC/MS results). These results can be in conformity with [Christodouleas et al. \(2014\)](#) who reported that lipophilic extracts contributed more than 90 % to the total reducing of whole oil using phenanthroline-Fe method.

The sunburn, skin inflammation and skin cancer may appear as a result of regular exposure to UV radiation. These UV rays can promote photochemical reactions that induce the generation of free radicals such as O_2^- , HOO^- , and OH^\cdot ([Batista et al. 2021](#)). Some studies are in quest for natural sunscreen products to reverse and block these UV radiations. The photo-protective capacity of plant extracts is investigated by measuring the sun protection factor (SPF). The levels of protection were mentioned by [Schalka et al. \(2011\)](#) where SFP values were minimum (2-12), moderate (12-30), high (30-50), and maximum at >50. SPF values of ethanolic and infusion extracts indicates high skin-protective activity due to their polyphenols that can absorb at wavelength between 280nm and 320nm. These results can make the *T. serpyllum* extracts as potential skin-protective agents that can be used as additives in dietary and in the production of sunscreens for better photo-protection.

Conclusion

Thymus serpyllum extracts were evaluated for their chemical profile, antioxidant, and skin-protective

activities. Experimental results of antioxidant assays (DPPH, GOR, CUPRAC, Reducing power, and phenanthroline) revealed that both of ethanol and infusion extracts showed high antioxidant activities. Although the richness of infusion extract with phenolic acids was mainly by rosmarinic acid, the active compounds of infusion can be slightly affected by dilution and their reaction with other compounds in mixture and this has been proven by other studies. In this study, we reported for the first time the good potential of *T. serpyllum* as a photo-protective agent which can offer an initiation point for therapeutic research to use these extracts in a formulation of dermo-protective products for skin disorders. Basing on our results, it can be concluded that *T. serpyllum* from the Mascara region represented an effective source of antioxidant components that may be used as an alternative to synthetic antioxidants for treatment of pathologies associated with free radical damages and in food industries as additives to retard food deterioration and to upgrade the storage length of food products.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Benhassaini Hachemi (Laboratory of Plant Biodiversity, Conservation and Enhancement, Faculty of Natural and Life science, University of Djillali Liabes Sidi Bel Abbes, Algeria) for identification of plant material of *Thymus serpyllum* L.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [Abdulqadir A, Cakmak YS, Zengin G \(2018\) Phenolic compounds, antioxidant properties and enzyme inhibition ability of *Adiantum capillus veneris* L. linked to Alzheimer's Disease, *Diabetes Mellitus* and Skin Disorders. *Cur. Org. Chem.* 22: 1697-1703.](#)
- [Abu-Darwish MS, Abu-Dieyeh ZH, Mufeed B, Al-Tawaha ARM, Al-Dalain SYA \(2009\) Trace element contents and essential oil yields from wild thyme plant \(*Thymus serpyllum* L.\) grown at different natural variable environments, *J. Food Agric. Environ.* 7: 920-924.](#)
- [Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE \(2004\) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols](#)

- and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Agric. Food Chem.* 52: 7970-7981.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik S E, Bektaşoğlu B, Özyurt D (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.* 12: 1496-1547.
- Aruoma OI (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* 523: 9-20.
- Banaeva YA, Pokrovsky LM, Tkachev AV (1998). Chemical composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L.s.l. growing wild in Altai region. *In International conference on natural products and physiologically active substances (ICNPAS-98)*, Novosibirsk. Russia, pp. 59.
- Batista JS, Salatino A, Negri G, Jara CEP, de Paiva KAR, dos Santos WLA, Rodrigues VHV (2021) Photoprotective activity of geopropolis produced by *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponinae) in the semiarid of the Brazilian Northeast. *Res. Soc. Dev.* 10: e11210212305.
- Berker KI, Güçlü K, Tor İ, Apak R (2007) Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta.* 72: 1157-1165.
- Caponio F, Alloggio V, Gomes T (1999) Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* 64: 203-209.
- Christodouleas DC, Fotakis C, Papadopoulos K, Calokerinos AC (2014). Evaluation of total reducing power of edible oils. *Talanta.* 130: 233-240.
- D'Auria M, Racioppi R (2015) The effect of drying of the composition of volatile organic compounds in *Rosmarinus officinalis*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis* and *Thymus serpyllum*: A HS-SPME-GC-MS study. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 18: 1209-1223.
- European Pharmacopoeia 7.0, 1267-1268 (2010).
- Eghbaliferiz S, Iranshahi M (2016) Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother Res.* 30: 1379-1391.
- El Aanachi, S, Gali L, Nacer SN, Bensouici C, Dari K, Aassila H (2020). Phenolic contents and in vitro investigation of the antioxidant, enzyme inhibitory, photoprotective, and antimicrobial effects of the organic extracts of *Pelargonium graveolens* growing in Morocco. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 29: 101819.
- El Aanachi S, Gali L, Rammali S, Bensouici C, Aassila H, Dari K (2021). In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan Lamiaceae. *J. Food Meas. Charact.* 15: 1785-1795.
- Gali L, Bedjou F (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *S. Afr. J. Bot.* 120: 163-169.
- Janiak MA, Slavova-Kazakova A, Kancheva VD, Ivanova M, Tsrunchev T, Karamać M (2017) Effects of γ -irradiation of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the phenolic compounds profile of its ethanolic extract. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 67: 309-316.
- Jarić S, Mitrović M, Pavlović P (2015) Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. *Evid. Based Complement. Alter. Med.* 2015: 101978.
- Jovanović AA, Đorđević V, Zdunić GM, Šavikin KP, Pljevljakušić D, Bugarski BM (2016) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. *Hem. Ind.* 70: 391-398.
- Jovanović A, Skrt M, Petrović P, Častvan I, Zdunić G, Šavikin K, Bugarski B (2019) Ethanol *Thymus serpyllum* extracts: evaluation of extraction conditions via total polyphenol content and radical scavenging activity. *Lekovite sirovine.* 39: 23-29.
- Kim J, Choe E (2018) Effect of the pH on the lipid oxidation and polyphenols of soybean oil-in-water emulsion with added peppermint (*Mentha piperita*) extract in the presence and absence of iron. *Food Sci. Biotechnol.* 27: 1285-1292.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S (2015) Antioxidant and anticholinesterase potential of six thymus species. *Evid. Based Complement. Alter. Med.* 2015:403950.
- Kirilov V, Stikhareva T, Mukanov B, Chebotko N, Ryazantsev O, Atazhanova G, Adekenov S (2016) Composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. from Northern Kazakhstan. *Essent. Oil-Bear. Plants.* 19: 212-222.
- Korać RR, Khambholja KM (2011) Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn. Rev.* 5: 164.
- Külcü DB, Gökışık CD, Aydın S (2019) An investigation of antibacterial and antioxidant activity of nettle (*Urtica dioica* L.), mint (*Mentha piperita*), thyme (*Thymus serpyllum*) and *Chenopodium album* L. plants from Yaylacık Plateau Giresun, Turkey. *Turk. J. Agric. Food Sci. Technol.* 7: 73-80.
- Kulišić T, Dragović-Uzelac V, Miloš M (2006) Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 485-492.
- Mansur JDS, Breder MNR, Mansur MCDA, Azulay RD (1986) Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 12: 1-4.
- Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Silva S, Henriques M, Ferreira IC (2015) Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chem.* 167: 131-137.
- Miron TL, Plaza M, Bahrim G, Ibáñez E, Herrero M (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Chromatography A.* 1218: 4918-4927.
- Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira I C, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T, Soković M (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L, *Thymus algeriensis* Boiss.

- and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Ind. Crops Prod. 52: 183-190.
- Perron NR, Brumaghim JL (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochem Biophys. 53: 75-100.
- Schalka S, Silva dos Reis VMR (2011) Sun protection factor: meaning and controversies. An. Bras. Dermatol. 86: 507-15.
- Shahidi F, Ho CT (2007) Antioxidant measurement and applications: an overview. In ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC.
- Shi H, Noguchi N, Niki E (2001) Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. Meth. Enzymol. 335: 157-166.
- Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E (2008) Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. Talanta. 76: 899-905.
- Tirzitis G, Bartosz G (2010) Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. Acta Biochim. Pol. 57:139-142.
- Turek C, Stintzing F (2013) Stability of essential oils: a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12: 40-53.
- Wesolowska A, Jadczyk D, Grzeszczuk M (2012) Influence of distillation time on the content and composition of essential oil isolated from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.). Herba Pol. 58: 40-49.
- Yang Ch-S, Ho Ch-T, Zhang J, Wan X, Zhang K, Lim J (2018) Antioxidants: Differing meanings in food science and health science. J. Agric. Food Chem. 66: 3063-3068.
- Zehiroglu C, Sarikaya SBO (2019) The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. Food Sci. Technol. 56: 4757-4774.