

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE
MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Identification, extraction de substances utiles de Thymus
Nummularius et Eucalyptus Globulus. Etude des bios activités
des extraits et application pharmaceutiques**

Présenté par : MOHAND SAIDI

Katia

TAFAT

Hanane

Soutenu publiquement, le

30 /06 /2019,

devant le Jury composé de :

MEZIANE	Dalila	Professeur	UMMTO	PRESIDENTE
AYATI	Fadila	MCB	UMMTO	ENCADREURE
AIT SALAH	Celia	Docteur Microbiologist	CHU	CO-ENCADREURE
KESSAL	Fetta	MAHU	UMMTO	EXAMINATRICE

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de chimie Organique du département de chimie de la faculté des sciences de l'UMMTO. Nous exprimons nos respectueux remerciements à notre aimable promotrice madame AYATI Fadila pour sa gentillesse, ses conseils précieux et surtout pour sa disponibilité, qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude, nous remercions notre Co-promotrice docteur AIT SALAH Célia pour nous avoir guidées, pour ces recommandations lors de l'élaboration de notre partie microbiologie.

Nous adressons notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à docteur Abdoun pharmacien spécialisé en microbiologie et Melle TOUZOUIRT Saida Maître de conférence à l'UMMTO, pour leurs aides, leurs conseils durant l'élaboration de notre travail.

Nous remercions vivement Madame Dalila Meziane, Professeur à l'UMMTO, nous sommes touchées de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Docteur KESSAL pharmacienne galéniste à l'UMMTO pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être examinatrice. Nous remercions profondément le Professeur AHMED ZAID Toudert de nous avoir accueillies au sein du Laboratoire génie chimique de l'école nationale polytechnique d'EL HARRACH et pour qui nous exprimons toute notre reconnaissance.

Nous désirons aussi remercier Mme BOUABDALLAH coordinatrice des laboratoires de chimie et Mr FETMOUCHE responsable du magasin des produits chimiques (UMMTO). Nos plus grands remerciements vont également aux ingénieures de Laboratoire de chimie organique (Mr A. KHECHIDI, Mme S. BOUHRAOUA, Mme C. KACI ainsi que ceux du laboratoire de chimie pharmaceutique (Mme D. KOULOUGLI et Mlle T. BENLAZIZ) qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de ce mémoire.

Notre immense gratitude s'étend également à Mme TAFAT IGOUDJILEN Ouahiba enseignante en thermodynamique au sein de l'USTHB et BOUDARENE Lynda, pour leurs autorisations à accomplir notre étude de CPG/SM au laboratoire de la police scientifique d'Alger.

Nos vifs remerciements vont à Mme ADDAD AMROUN Nachida pharmacienne galéniste pour son aide durant notre travail.

Nous remercions vivement tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science et tous les apports nécessaires pour l'accomplissement de notre formation.

Enfin, il nous est agréable de terminer en remerciant toutes les personnes qui de près ou de loin nous ont apporté leur soutien, leur conseil et leur contribution pour achever ce travail.

Dédicaces

Grâce au dieu, le tout puissant, nous avons pu terminer ce travail que je dédie :

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père, qui nous a quitté très tôt, et qui est toujours présent dans nos cœurs. J'espère que, du monde qui est le sien maintenant, il apprécie cet humble geste, preuve de reconnaissance de sa petite fille qui a toujours prié pour lui. Que Dieu, tout puissant, te garde dans son vaste paradis.

A la mémoire de ma belle mère «Yema Fatma» et de mon oncle «Saïd» que vos âmes reposent en paix.

A ma chère mère

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner. Tu as toujours été le père et la mère, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être. Que Dieu, tout puissant, te préserve et t'accorde la bonne santé, longue vie et bonheur.

A mes chères adorables frères Essaid et Atik.

A ma chère adorable sœur Chahrazad, et son fiancé Kamel

A mon oncle Smail et à sa famille.

A toute la famille TAFAT.

A mes amies

Ouardia, Thiziri, Leila, Katia, Katia, Dehbia, Ouiza, Lilya.

A mon binôme Katia et toute sa famille.

Hanane.

Dédicaces

*Grâce au dieu, le tout puissant, nous avons pu terminer ce travail
que je dédie :*

A la mémoire de ma très chère mère

*Quoi que je fasse quoi que je dise, je ne saurai point te remercier
comme il se doit, toi qui a toujours été ma source de force.*

A la mémoire de mon frère

Que dieu illumine ta tombe

A mon cher père

*Tu a toujours été a mes cotés pour me soutenir et m'encourager,
que ce travail traduit ma gratitude et mon affection*

A ma tante

Que dieu te préserve pour nous

A mes très chers frères et sœurs

*Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout
réussite.*

A HANI

Je te remercie énormément pour ton soutien

A mes amies adorées

*Hanane, Ouardia, Thiziri, Asma, Leila, Sanna, Katia, Kathia, Dehbia,
Ouiza, Lilya, Rosa,
Mélissa, Djouhere.*

Katia

Liste des abréviations

µg EAG/mL: microgrammes équivalent acide gallique par millilitre

µg EQ/mL: microgrammes équivalent de quercétine par millilitre

ADN: acide désoxyribonucléique

AFNOR: Association française de normalisation

ARN: acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

CMB: Concentration minimale bactéricides

CMI: Concentration minimale inhibitrice

Cp: centipoise

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

DL50: dose létale 50

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

HE : Huile Essentielle

HPLC: High performance liquid chromatography

IC₅₀: inhibition concentration

LDL: low density lipoprotein

M-H: Muller Hinton

NTU: Nephelometric Turbidity Unit

P.A : principe actif

Liste des figures

Figure 2.1 : Photo de la partie aérienne de thym Nummularis (a), d'Eucalyptus Globulus(b)	13
Figure 2.2 (a) : Hydro distillateur de type Clevenger ; (b) : Photo de distillat.....	14
Figure 2.3 : Réfractomètre Abbe.....	16
Figure 2.4 : Montage pour formulation d'un sirop simple	19
Figure 3-1 : Taux d'humidité (a) de Thymus N, (b) Eucalyptus G.....	26
Figure 3-2: Courbe d'étalonnage d'acide gallique	33
Figure 3-3: Histogramme des diamètres d'inhibition de E. coli et S.aureus pour les huiles essentielles étudiées.	35
Figure 3-4: Activité antioxydante de l'acide ascorbique en fonction des dilutions réalisées.....	40

Liste des tableaux :

Tableau 2.1 : Listes du matériel et équipements utilisés.	12
Tableau 2.2: Conditions géographiques des sites de récolte des deux plantes.	13
Tableau 2.3 : Protocoles et tests phytochimiques pour l'identification des métabolites secondaires. ..	17
Tableau 3-1 : Taux d'humidité pour les feuilles de Thym N et Eucalyptus G.	26
Tableau 3-2 : Rendements en huiles essentielles des plantes utilisées.	27
Tableau 3-3: Propriétés physicochimiques de l'HE des deux plantes.	28
Tableau 3-4 : Composition de l'HE de Thymus N.	29
Tableau 3-5: Composition de l'HE d'Eucalyptus G.	30
Tableau 3-6: Composition des deux plantes en polyphénols.	31
Tableau 3-7 : Standard et leurs temps de rétentions utilisé pour l'analyse par HPLC	32
Tableau 3-8: Dosage des polyphénols présents dans les feuilles d'Eucalyptus G. et Thymus N.	33
Tableau 3-9 : Classification des zones d'inhibition	34
Tableau 3-10: Diamètres des zones d'inhibitions des HEs extraits et commerciales.	34
Tableau 3-11 : Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et tanins.	35
Tableau 3-12: Résultats de la CMI et CMB	36
Tableau 3-13 : Caractéristiques des sirops formulés à base d'huiles essentielles.	37
Tableau 3-14 : Caractéristiques des sirops à base de polyphénols	38
Tableau 3-15: Résultats de l'activité antibactérienne des sirops formulés.	39
Tableau 3-16: Activité antioxydante de l'acide ascorbique	40
Tableau 3- 17: Activité antioxydante des HEs extraites des deux plantes	41
Tableau 3-18: Activité antioxydante des tanins des deux plantes	42
Tableau 3-19 : Activité antioxydante des flavonoïdes des deux plantes	42
Tableau 3-20: Valeurs d'IC50 des différents échantillons	43
Tableau 3-21 : Caractéristiques des pommades formulées à base de poly phénols	44

Glossaire

Glossaire

American Type Culture Collection (ATCC) : est une société privée américaine sans but lucratif, centre de ressources biologiques, dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation, le développement et la distribution de la norme de référence de micro-organismes.

Souche ATCC : est une souche de référence utilisée dans le contrôle microbiologique des antimicrobiens.

Antifongique ou antimycosique : Se dit d'un médicament qui agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites.

Antiseptique: ce qui détruit les microbes et évite l'infection.

Aromatogrammes : est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles.

Aseptique : empêche la contamination bactérienne, virale ou provenant d'autres microorganismes.

Bactéricide : se dit d'une substance qui inhibe et tue la bactérie.

Bactériostatique : se dit d'une substance qui bloque mais ne tue pas la bactérie

Chromatogramme: c'est l'image ou le diagramme obtenu par chromatographie

Inoculum : Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

MC Farland : est l'unité de mesure de la densité pour préparer les suspensions des microorganismes, il est utilisé lors de la préparation des inoculums bactériens pour les tests de sensibilité aux agents microbiens.

Membrane : structure biologique formée de feuilles comportant une bicouche lipidique où sont insérées diverses protéines.

Moisissure : Champignon microscopique, de couleur verdâtre ou blanchâtre, qui se développe à la faveur de l'humidité et le plus souvent de l'obscurité, à la surface des substances organiques dont il entraîne une altération.

Pouvoir rotatoire, également appelé activité optique est la propriété qu'ont certains milieux de faire tourner le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant.

Streptocoque : Les streptocoques regroupent un vaste ensemble de micro-organismes ubiquitaires et qui comprend de nombreuses espèces. En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes

Temps de rétention (Tr) : C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction générale	1
Chapitre 01: Synthèse bibliographique	
1. Médicament	3
1.1. Définition	3
1.2. Différentes formes des médicaments	3
1.2.1. Forme liquide.....	3
1.2.2. Forme semi-solide	3
2. Généralités sur les sirops.....	3
2.1. Définition	3
2.2. Composition du sirop	4
2.3. Préparation du sirop	4
2.3.1. A froid	4
2.3.2. A chaud :.....	4
2.4. Cuite du sirop	4
2.5. Avantages des sirops	4
2.6. Inconvénients des sirops	4
2.7. Contrôles de qualité du sirop.....	5
2.7.1. Densité.....	5
2.7.2. Stabilité	5
2.7.3. Viscosité	5
3. Généralités sur la pommade	5
3.1. Définition	5
3.2. Typologie	5
3.3. Avantage de la pommade	6

3.4. Inconvénients d'une pommade	6
4. Généralités sur les Huiles essentielles.....	6
4.1. Définition	6
4.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	6
4.3. Composition des huiles essentielles	6
4.3.1. Composés terpéniques	6
4.3.2. Composés aromatiques	7
4.4. Notion de chemotype	7
4.5. Méthodes d'extraction.....	7
4.5.1. Hydro distillation.....	7
4.6. Méthodes d'identification des huiles essentielles	7
4.7. Activité antibactérienne	8
4.8. Activité antioxydante	8
5. Généralités sur les plantes utilisées :.....	8
5.1. Thymus Nummularis.....	8
5.1.1. Présentation	8
5.1.2. Classification botanique	9
5.1.3. Origine et répartition géographique.....	9
5.1.4. Propriétés de l'huile essentielle de Thymus Nummularis	9
5.2. Eucalyptus Globulus	9
5.2.1. Présentation	9
5.2.2. Classification botanique	10
5.2.3. Propriétés de l'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus	10
6. Généralités sur les composés phénoliques.....	10
6.1. Présentation	10
6.2. Tanins.....	10
6.2.1. Définition.....	10
6.2.2. Classification des tanins	10
6.2.3. Activités biologiques et thérapeutiques des tanins.....	11
6.2.4. Activité antibactérienne des tannins	11
6.3. Flavonoïdes	11
6.3.1. Définition.....	11
6.3.2. Intérêt biologique des flavonoïdes.....	11

Chapitre 02: Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes	12
1.1. Matériel	12
1.2. Récolte et séchage de <i>Thymus Nummularis</i> et d' <i>Eucalyptus Globulus</i>	13
1.3. Identification des deux plantes	13
2. Méthodes	14
2.1. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal	14
2.2. Extraction des HEs de <i>Thymus Nummularis</i> et <i>Eucalyptus Globulus</i>	14
3. Analyse physique :.....	14
3.1. Evaluation du rendement en huile essentielle	14
3.2. Tests organoleptiques.....	15
3.3. Densité :	15
3.4. Indice de réfraction :	15
4. Analyse chimique :	16
4.1. Détermination de la composition chimique de l'HE de thym et d'eucalyptus par CPG/SM	16
4.2. Mesure de pH	16
4.3. Détermination de l'indice d'acide des deux huiles essentielles extraites	16
5. Tests phytochimiques	17
6. Extraction des polyphénols.....	18
6.1. Extraction des flavonoïdes	18
6.2. Extraction des tanins :	18
6.2. 1. Calcul de rendement des métabolites secondaires :	18
6.3. Dosage des polyphénols.....	19
6.3.1. Dosage des polyphénols totaux	19
6.3.2. Analyse des flavonoïdes et tanins par HPLC.....	19
7. Préparation du sirop simple	19
7.1. Caractérisation du sirop.....	20
7.1.1. Densité	20
7.1.2. Viscosité	20
7.1.3. Turbidité	20
8. Formulation d'une pommade	20
9. Etude antibactérienne	21

9.1. Repiquage des souches.....	21
9.2. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme).....	21
9.1.1. Choix de milieux de culture:	21
9.1.2. Préparation de l`inoculum bactérien.....	21
9.1.3. Ensemencement	21
9.1.4. Préparation des disques de l`aromatogramme.....	21
9.1.5. Incubation et lecture	22
9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	22
9.3.1. Préparation des pré-cultures et de l`inoculum.....	22
9.3.2. Préparation des dilutions d`huile essentielle	22
9.3.3. Dépôt des spots, incubation et lecture :	23
9.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB.....	23
10. Préparation des sirops pharmaceutiques :.....	23
11. Etude de l`activité antioxydante des huiles essentielles et polyphénols.....	23
11.1. Dosage de la solution mère de chaque extrait.....	24
11.2. Préparation des dilutions ou solutions filles :	24
11.3. Préparation de la solution témoin.....	24

Chapitre 03: Résultats et discussions

1. Taux d`humidité.....	26
2. Extraction des HEs Thymus Nummularis et Eucalyptus Globulus.....	27
2.1. Evolution du rendement de l`extraction des HEs Thymus N. et Eucalyptus G. .	27
3. Caractérisation des HEs de Thymus N. et Eucalyptus G.....	27
3.1. Caractérisation physique et organoleptique :	27
3.2. Paramètres physico-chimiques.....	27
4. Analyse des huiles essentielles des deux plantes par CPG/SM	28
4.1. HE de Thymus Nummularis.....	28
4.2. HE essentielle d`Eucalyptus Globulus	29
5. Tests phytochimiques :	30
6. Extraction des poly phénols (tanins et flavonoïdes).....	31
6.1. Extraction et détermination de la teneur des Tanins	31
6.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes.....	31

7. Analyse par HPLC des tanins et des flavonoïdes :.....	32
7.1. Tanins et flavonoïdes Eucalyptus Globulus.....	32
7.2. Tanins et flavonoïdes Thymus Nummularis	32
8. Dosage des poly phénols totaux.....	33
8.1. Dosage des poly phénols totaux des Thymus N. et Eucalyptus G.....	33
9. Etude antibactérienne des HEs extraites et commerciales et des polyphénols.....	34
9.1. Discussion des résultats obtenus par chromatogramme.....	34
9.2. Méthode des CMI et CMB.....	36
10. Formulation des sirops à base des HEs et polyphénols	37
10.1. Activité antibactérienne des sirops formulés	38
11. Activité anti-oxydante des extraits des deux plantes	39
11.1. Index IC ₅₀ des HEs extraites, des Flavonoïdes et des Tanins	43
12. Formulation des pommades à base des poly phénols extraits.....	43
Conclusion générale.....	45

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction générale

Introduction générale

Malgré l'essor de la médecine occidentale, la médecine traditionnelle occupe encore une place prépondérante dans le système de santé et demeure un recours incontournable pour les populations en matière de soins de santé primaires. Les médicaments à base de plantes sont largement utilisés de nos jours, aussi bien dans les pays en voie de développement où les « tradipraticiens » jouent un rôle considérable, que dans les pays industrialisés où ils sont surtout employés en automédication.

Les plantes médicinales, produits d'origine vivante, ont des caractères fondamentalement différents des produits chimiques de synthèse. Pour tirer un réel avantage de l'usage des plantes médicinales et contribuer à pallier à la problématique environnementale et sanitaire induite par l'industrie de la médecine conventionnelle, il devient impératif d'initier des travaux de recherches scientifiques pour l'exploitation rationnelle des vertus indiscutables des plantes de la pharmacopée. La finalité est de parvenir à la production de nouvelles préparations à base d'extraits naturels (des phytomédicaments) qui seraient efficaces contre tout type d'infections, à moindre coût, performantes et accessibles à tous.

Bien que l'Algérie soit dotée d'une biodiversité immense de nature hétérogène, renfermant une richesse inestimable de plantes, il y a peu d'efforts consacrés au développements et à la valorisation des agents thérapeutiques de ces plantes, leurs exploitations restent faibles et limitées.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à étudier *Thymus Nummularis* et *Eucalyptus Globulus*, plantes répandues et très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen.

L'objectif principal de notre travail vise d'abord, à démontrer la richesse de nos plantes en extraits actifs et utiles, puis à déterminer la bio activité des différents extraits. L'étape finale concerne la préparation de formulations pharmaceutiques (sirops et pommades). Des caractérisations et contrôles sont réalisés à chaque étape au moyen d'analyses d'échantillonnage, le tout pour assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des produits finis.

Ce mémoire est structuré en deux parties :

La première partie traite une synthèse bibliographique visant à présenter des généralités sur: Les médicaments, les plantes étudiées, les huiles essentielles et les polyphénols,

La deuxième partie concerne l'expérimentation et le traitement des résultats obtenus, elle est structurée en trois axes de recherche:

Le premier axe concerne l'extraction, le screening phytochimique et la caractérisation des extraits des deux plantes,

Le second axe est réservé à :

- L'étude de la bio activité (pouvoir antibactérien, activité antioxydant) des HEs et des métabolites secondaires de chacune des deux plantes.
- À la préparation et le contrôle de deux formulations pharmaceutiques (sirops antibactérien à base d'HEs et pommades antioxydante à base des polyphénols.

L'axe final est consacré au traitement des résultats obtenus.

Partie 1

synthèse bibliographique

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Médicament

1.1. Définition

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales.

Il est administré, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.

Un médicament est une composition de molécule biologiquement active dite « principe actif » avec d'autres substances appelées « excipients » qui permettent l'obtention de sa forme finale, sa diffusion dans l'organisme et sa conservation [1].

1.2. Différentes formes des médicaments

Plusieurs formes galéniques existent pour un médicament on distingue : les formes solides, liquides et semi solides.

1.2.1. Forme liquide

Les formes liquides peuvent être des solutions, des suspensions ou des émulsions. La stabilité est l'une des propriétés exigée pour les formes liquides. Si la substance est en solution dans un volume liquide important, on parle généralement d'un sirop ou d'une potion [1].

1.2.2. Forme semi-solide

Préparations semi-solides pour application cutanée, destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de P.A. Elles sont également utilisées pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène.

2. Généralités sur les sirops

2.1. Définition

Selon la pharmacopée européenne, un sirop est une forme galénique liquide qui contient un ou plusieurs principes actifs administré par voie orale. Les sirops sont des solutions aqueuses contenant du sucre (saccharose ou un autre sucre) et au moins un principe actif soluble dans l'eau. Ils sont préparés par une dissolution d'une forte proportion de sucre dans un liquide aqueux [2].

2.2. Composition du sirop

- **Le véhicule** : c'est le liquide dans lequel le sucre est dissous (ex : eau purifiée).
- **Le sucre** : le sucre utilisé est le saccharose (sucre blanc), selon la pharmacopée, un sirop doit avoir une concentration de 45% de sucre [2]. Le sucre joue un rôle important dans la conservation du sirop et même pour masquer le goût désagréable des principes actifs et excipients

2.3. Préparation du sirop

2.3.1. A froid :

Ce mode est préférable afin d'éviter les risques d'altération, utilisé généralement pour les matières premières qui sont facilement dissoutes dans l'eau purifiée. Les cuves utilisées sont généralement en inox. Ce mode nécessite une quantité de sucre estimée de 180g mélangée dans 100g d'eau [3].

2.3.2. A chaud :

Ce type de préparation est utilisé quand les matières premières sont difficilement solubles dans le solvant. On distingue, Préparation à chaud en vase clos qui consiste à introduire dans le récipient en vase clos le mélange de 165g de sucre dans 100mL d'eau distillée puis chauffer à 105°C jusqu'à ébullition. Lorsque le bouillant marque une densité de 1.26 le chauffage est arrêté. La densité du sirop après refroidissement doit être 1.32. Le sirop est légèrement coloré à cause d'un début de caramélisation.

2.4. Cuite du sirop

C'est l'opération qui permet d'amener le sirop à une concentration voulue. Un sirop doit avoir une densité de 1.32 à froid et de 1.26 à ébullition.

2.5. Avantages des sirops

- L'utilisation du sucre dans cette formulation lui procure une bonne conservation.
- Une administration aisée.
- Le sirop peut jouer le rôle d'un excipient (placebo) dont plusieurs principes actifs peuvent être incorporés à froid [2].

2.6. Inconvénients des sirops

- Décomposition possible par hydrolyse.
- Déconseillé pour les patients diabétiques [4].

2.7. Contrôles de qualité du sirop

2.7.1. Densité

La concentration joue un rôle prépondérant dans la formulation des sirops, une simple erreur de concentration peut induire une altération du sirop de sorte que : si la cuite du sucre n'est pas conforme cela entrainera l'élévation de la concentration du sucre donc le saccharose se cristallise et si le sirop est trop dilué cela influera sur la teneur en sucre ce qui peut causer une prolifération des micro-organismes.

2.7.2. Stabilité

La stabilité du sirop est vérifiée par la coloration, la formation de précipitation par la variation de pH et la séparation des composés [3].

2.7.3. Viscosité

La viscosité du sirop est l'une des propriétés qu'il faut prendre en considération lors de la formulation du sirop. C'est la résistance qu'opposent les différentes molécules entrant dans la composition du sirop au déplacement des molécules voisines. La détermination de la viscosité consiste à mesurer le temps nécessaire à l'écoulement, dans un tube capillaire convenablement choisi, d'un volume déterminé du sirop sous un régime de pression connu à une température déterminée.

3. Généralités sur les pommades

3.1. Définition

Préparations composées d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dissoutes ou dispersées des substances liquides ou solides [1,28].

3.2. Typologie

La pharmacopée européenne désigne trois types de pommade :

- **Hydrophobe** : ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau.
- **Hydrophile** : Les pommades hydrophiles sont des préparations dont l'excipient est miscible à l'eau
- **Absorbante de l'eau** : Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau et conduire à l'obtention d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau selon les agents émulsifiants employés [5].

3.3. Avantage de la pommade

- Hydratation et protection de la peau ;

3.4. Inconvénients d'une pommade

- Pénétration possible à travers l'épiderme si la peau est lésée
- Quantité de principe actif peu précise et incontrôlable.

4. Généralités sur les Huiles essentielles

4.1. Définition

Les huiles essentielles (essences huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexes renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [6].

4.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

De consistance liquide à température ambiante, les huiles essentielles se distinguent des huiles fixes par leur volatilité, ces liquides colorés (souvent) ont une densité inférieure à celle de l'eau dans la plupart des cas. Leurs indices de réfraction sont élevés. Solubles dans les solvants organiques usuelles, elles sont liposolubles.

4.3. Composition des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : Les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [7].

4.3.1. Composés terpéniques

Ce sont des composés issus de couplage de plusieurs unités isopréniques. On retrouve :

- **Mono terpènes** : tel que Myrcène, α et γ - terpinène ou sabinène.
- **Sesquiterpènes** : tel que : β -caryophyllène, α -humulène...etc.

Exceptionnellement quelques **di terpènes** peuvent se retrouver dans les huiles essentielles [8,9]

4.3.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les mono terpènes et sesquiterpènes. On retrouve aussi : **les alcools** : (géraniol, linalol, Bornéol...), **les aldéhydes** : le plus souvent sont acycliques (citronellal, géranial...), **les cétones** : acycliques (tagetone), monocycliques (menthone, carvone)...etc.

4.4. Notion de chemotype

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement est fondamentale car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité [10].

4.5. Méthodes d'extraction

On retrouve plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix dépend de la nature de la plante et des caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle à extraire. Parmi ces méthodes:

4.5.1. Hydro distillation

Cette méthode consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage. Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètre sur la qualité et le rendement et la production.

4.6. Méthodes d'identification des huiles essentielles

Parmi les multiples techniques d'identification des huiles essentielles existantes, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse est la plus remarquable [11] (Annexe 01).

4.7. Activité antibactérienne

L'action des huiles essentielles sur les bactéries a été bien observée du fait qu'elle perturbe la membrane cytoplasmique ainsi que la force motrice du proton, fuite des électrons et aussi coagulation du contenu protéiques des cellules. Le mode d'action des HE dépend en premier temps des caractéristiques de l'huile ; leurs propriétés hydrophobes leurs permettent de

pénétrer à l'intérieur de la double couche de la membrane cellulaire de la bactérie. Les HES peuvent altérer multiples composés tels que : les polysaccharides, les protéines l'ADN et l'ARN. Citant l'exemple du thymol et carvacrol qui peuvent se fixer à ces bactéries grâce aux protéines et lipopolysaccharides et ainsi pénétrer facilement à l'intérieur de la cellule [12].

4.8. Activité antioxydant

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Il peut prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles.

Les antioxydants jouent un rôle à différents niveaux du processus oxydatif en neutralisant les radicaux initiateurs. Les réactions radicalaires se déroulent en trois étapes : initiation, propagation terminaison. Le rôle des antioxydants est d'éviter la phase de propagation et de limiter l'oxydation.

La recherche sur les antioxydants a été croissante ces dernières décennies pour les huiles et les poly phénols en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives. Ils sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs [13].

5. Généralités sur les plantes étudiées :

5.1. Thymus Nummularis

5.1.1. Présentation

Le thym est un arbuste odorant qui pousse spontanément dans le Nord-Africain tel que : Maroc, Tunisie, Algérie, Libye, l'Égypte, ainsi qu'en Sibérie et en Europe Nordique. Cependant, la plupart des espèces se concentrent dans le pourtour du bassin Méditerranéen [14]. Le thym est une plante pouvant atteindre plus de 25 cm de long, d'une odeur forte, aromatisant et très agréable.

5.1.2. Classification botanique

- Règne: Plante
- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida

- Sous-classe : Asteridae
- Famille: Lamiaceae
- Genre: *Thymus Nummularis*

5.1.3. Origine et répartition géographique

Thym proviendrait du mot latin "Thymus" qui signifie "Parfumé", à cause de l'odeur agréable que la plante dégage. Le thym fait partie du genre *Thymus* défini comme un ancien groupe tertiaire, ayant son origine dans le Sud-est de l'Espagne. Le thymus comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides [15].

5.1.4. Propriétés de l'huile essentielle de *Thymus Nummularis*

- Antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures.
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoïques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose).

5.2. Eucalyptus Globulus

5.2.1. Présentation

Le mot « Eucalyptus » vient du grec : **Eu** « bien » et **kaluptos** « couvert » appelé aussi Gommier, gommier bleu, arbre au koala, arbre à la fièvre.

L'eucalyptus est l'un des hauts arbres qui peut pousser plus haut que 20 mètres possédant un tronc lisse et cendré, des feuilles dont la plupart sont persistantes. Comme les autres membres de la famille des Myrtacées, les feuilles d'eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. Ces feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes.

5.2.2. Classification botanique

- Règne : Plante.
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida

- Sous - Classe : rosidae
- Ordre : Myrtales
- Espèce : Eucalyptus Globulus

5.2.4. Propriétés d'huile essentielle d'Eucalyptus Globulus

- L'HE d'eucalyptus est utilisé dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour ses multiples vertus sur l'arbre respiratoire. C'est un Antiseptique pour les voies urinaires, elle est aussi antirhumatismale, stimulante et tonifiante.
- Elle Facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (balsamique, fluidifiant, expectorant), anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus.

6. Généralités sur les composés phénoliques

6.1. Présentation

Les composés phénoliques, ou poly phénols participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. Ils occupent une place majeure au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. Les poly phénols forment une large famille contenant plus de 8000 composés naturels divisés en plusieurs catégories citant en première place : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des poly phénols, juste après viennent les tanins comme produits résultant de la polymérisation des flavonoïdes [16].

6.2. Tanins

6.2.1. Définition

Le terme " tanin" vient du mot tannage, un procédé datant du moyen âge et permettant la formation de cuir imputrescible par la création de liaisons entre les fibres de collagène de la peau fraîche [5]. Les tanins sont des métabolites secondaires poly phénoliques solubles dans l'eau, leur structure chimique leur confère une capacité très développée à se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides et essentiellement les protéines [17].

6.2.2. Classification des tanins

On distingue deux grandes familles de tanins dont les structures sont distinctes : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables (tanins condensés) [18].

6.2.3. Activités biologiques et thérapeutiques des tanins

Douées d'activité pharmacologique remarquable, les tanins sont des molécules biologiquement actives. Ce sont des composés poly phénoliques permettant de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure. Les tanins réagissent aussi comme anti-inflammatoire et anti-cancérogène. Leur potentiel peut être lié aux propriétés anti oxydantes qui semblent importantes pour la protection cellulaire des dommages oxydatifs [19].

6.2.4. Activité antibactérienne des tannins

Les tanins ont été qualifiées de bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes. En effet, il semble que l'acide tannique inhibe la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines comme : *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudo fluorescents*, *Salmonella enteritidis*, et *Salmonella typhimurium* [20].

6.3. Flavonoïdes

6.3.1. Définition

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonoïdes. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes [21]. Tous les flavonoïdes (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C [5].

6.3.2. Intérêt biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités : anti oxydantes, anti-inflammatoires, Inhibitrices d'enzymes. Certains ont des Activités hepatoprotectrices, diurétiques, vasodilatatrices, antibactériennes, chimoprotectrices, antidiabétiques, antiallergiques. La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant et chélateur. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé. Grace à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, les flavonoïdes ont démontré des effets cardio-protecteurs importants [22].

Partie 2

Etude Expérimentale

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Dans cette partie nous présentons 02 axes de recherche : Le premier axe, est consacré à :

- Un screening phytochimique des deux plantes, l'extraction et la caractérisation des HEs et des métabolites secondaires (flavonoïdes et tanins) de thymus N. et de l'eucalyptus G.

Le second axe est réservé à :

- À la préparation de deux formulations pharmaceutiques (sirops à base d'HEs et pommades à base des poly phénols (tanins et flavonoïdes).
- L'étude de la bio activité (pouvoir antibactérien, activité antioxydant) des HEs et des métabolites secondaires de chacune des deux plantes.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

Le matériel et produits utilisés pour conduire nos expériences sont regroupés dans le tableau

2.1. Le matériel chimique (solvants et réactifs) utilisé est donné en annexe 02.

Tableau 2.1 : Listes du matériel et équipements utilisés.

Equipements et dispositifs	Clevenger, balance analytique, chauffe ballon, hôte, étuve, bain marie, réfrigérateur, mini-réacteur, bain thermostat		
Matériels de mesure et d'analyse	Pied à coulisse, Turbidimètre (EUTECH INSTRUMENTS) Viscosimètre BROOKFIELD DV-I		
	Chromatographie en phase gazeuse de type Perkin Elmer (Clarus580), HPLC : VP Shimadzu Liouis Chromatographe UV visible (ZUZI spectrophotometer)		
Matériel végétal	<i>Thymus Nummularis</i> <i>l'Eucalyptus Globulus</i>		
Matériel microbiologique	Fourni par : Laboratoire microbiologique du CHU de Tizi-Ouzou		
Nom de la souche	Gram	Référence ATCC	Famille
Escherichia Coli	Négatif	25922	Enterobacteriaceae
Staphylococcus aureus	Positif	25923	Micrococaceae
Pseudomonas aeruginosa	Négatif	27853	Pseudomonaceae
Le milieu utilisé est Mueller-Hinton gélosé (M-H).			

1.2. Récolte et séchage de *Thymus Nummularis* et d'*Eucalyptus Globulus*

La plante *Thymus Nummularis* est récoltée dans la région TIROURDA commune IFARHOUNEN, daïra de AIN EL HAMMAM. Tandis qu'*Eucalyptus Globulus* est cueillie dans la région NEZLA commune d'AZZAZGA, Daïra d'AZZAZGA.les deux plantes sont récoltées lors de la période Mars-Avril. Les conditions géographiques des sites de récolte des deux plantes sont regroupées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2: Conditions géographiques des sites de récolte des deux plantes.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Climat
Nezla	500 m	36°34'13''N	4°18'40''E	Climat méditerranéen / été chaud
Michelet	1800 m	36°36'45''N	4.383°26'38''E	Climat méditerranéen été sec / hiver rigoureux

Les plantes (figure2-1) sont nettoyées et séchées à une température allant de 21 à 24 °C à l'abri de la lumière, pendant une semaine pour le thym et dix jours pour l'eucalyptus.



(a)



(b)

Figure 2.1 : Photo de la partie aérienne de thym *Nummularis* (a), d'*Eucalyptus Globulus*(b)

1.3. Identification des deux plantes

L'identification et la reconnaissance des plantes est faite par le professeur SMAIL Noria enseignante au sein du Département de Biologie De La Faculté Des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

2. Méthodes

2.1. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal

La plupart des plantes fraîches renferment environ 60 à 80 % d'eau. La détermination de la teneur en eau de la plante est réalisée par séchage à température ambiante. Le suivi du taux d'humidité est réalisé sur une plante fraîche jusqu'à son séchage complet. La révélation du taux d'humidité est réalisée toutes les 24h, il est évalué par :

$$H(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100 \dots \dots \dots (2-1)$$

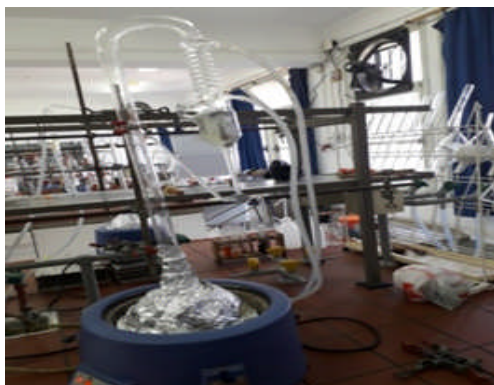
H% : Teneur en eau.

m_1 : masse de l'échantillon avant séchage (g).

m_2 : masse de l'échantillon après séchage (g).

2.2. Extraction des HEs de *Thymus N.* et *Eucalyptus G.*

L'extraction d'HE de *Thymus N.* ainsi que celle de *Eucalyptus G.* est effectuée par hydro distillation type Clevenger (figure 2.2. (a)). Le processus consiste à immerger 100g de matière dans un volume d'eau approprié. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3h. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles sont condensées dans le réfrigérant. Le distillat est recueilli dans l'ampoule à décanter du Clevenger (figure 2.2.(b)). Le mélange eau /HE se sépare par différence de densité. Les fractions d'HE extraites sont récupérées dans des tubes en verre couvert en aluminium et conservées au réfrigérateur à 4°C pour analyse et études.



(a)



(b)

Figure 2.2 (a) : Hydro distillateur de type Clevenger ; (b) : Photo de distillat.

3. Analyse physique :

3.1. Evaluation du rendement en HE.

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue par extraction et la masse totale du matériel végétal traité. Il est calculé par:

$$R_{HE}(\%) = \frac{M_{HE}}{M_S} \times 100 \dots\dots\dots (2-2)$$

Avec :

M_{HE} : masse en HE (g).

R_{HE} : rendement en HE (%)

M_S : masse de la matière végétale (g)

3.2. Tests organoleptiques

L'aspect, la couleur et l'odeur de l'HE sont déterminés par l'examen sensoriel de celle-ci.

3.3. Densité :

La densité relative d'une HE à 20 °C est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau à la même température. La mesure de densité est réalisée à l'aide d'un eppendorf à une température de 23°C. La relation suivante permet de calculer la densité :

$$D = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} + 0.0012 \dots\dots\dots (2-3)$$

Avec :

M_2 : masse de l'eppendorf rempli de 0.1mL d'HE

M_0 : masse de l'eppendorf vide.

M_1 : masse de l'eppendorf rempli de 0.1mL d'eau

3.4. Indice de réfraction :

Il s'agit du nombre qui caractérise le pouvoir de la matière à ralentir et à dévier la lumière.

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre

D'Abbe (figure 2-3), l'indice est déterminé pour une température égale à 20°C [23]. Une formule de correction est appliquée pour une température différente :

$$n_d = n_t + 0.0045(T - 20) \dots\dots\dots (2-4)$$

n_d : indice de réfraction recherchée

n_t : indice de réfraction lu à la température ambiante

T : température ambiante

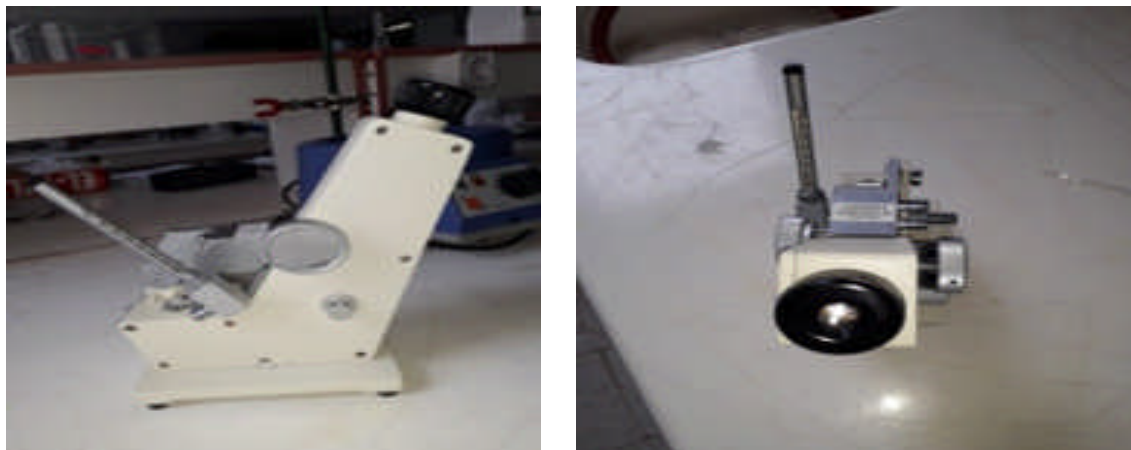


Figure 2.3 : Réfractomètre Abbe.

4. Analyse chimique :

4.1. Détermination de la composition chimique de l'HE. de thym et d'eucalyptus par CPG/SM:

L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés. La colonne est de 25m de longueur et de 0.25mm de diamètre. Le gaz employé est l'azote ayant un débit de 0.3mL/min. (plus de détail est donné en annexe 01)

4.2. Mesure de pH

La mesure de pH des huiles essentielles *Thymus N. et Eucalyptus G.* a été réalisée en utilisant le papier pH.

4.3. Détermination de l'indice d'acide des HEs extraites

Une quantité d'HE d'eucalyptus et de thym (0.5g pour l'Eucalyptus *G.* et 0.2 g pour le Thymus *N.*) est ajoutée à un volume d'éthanol (5mL) et quelques gouttes d'indicateur coloré phénolphthaléine (3 gouttes). L'ensemble est neutralisé avec une solution d'hydroxyde de potassium (0.1N). Le titrage est arrêté lors de l'apparition d'une coloration rose. L'indice d'acide est calculé selon la relation :

$$I_A = \frac{M \times N \times V}{m} \dots \dots \dots (2-5)$$

M : masse de KOH

N : molarité de KOH

V : volume de KOH

m : masse d'huile

5. Tests phytochimiques

Ces tests sont réalisés sur l'extrait de l'infusé des deux plantes dans le but de déterminer la nature des métabolites existants. Les composés à identifier ainsi que les protocoles [25] correspondants sont regroupés dans le tableau (2.3). L'infusé est préparé en immergeant 10g de matière végétale dans 20mL d'eau distillée bouillante

Tableau 2.3 : Protocoles et tests phytochimiques pour l'identification des polyphénols

Tests phytochimiques Protocoles	
Poly phénols	1mL d'extrait + quelques gouttes de FeCl ₃ (2%). L'apparition d'une couleur vert noirâtre indique la présence des composés phénoliques.
Flavonoïdes	Un volume l'alcool chlorhydrique (4mL éthanol + 1mL HCL concentré) + 2mL d'extrait. Après agitation 2 ou 3 morceaux de magnésium sont ajoutés. La formation d'une coloration orange indique la présence des flavonoïdes.
Tanins	Tanins galliques : Quelques gouttes de FeCl ₃ (5%) sont ajoutées à 5mL d'extrait. L'observation d'une couleur bleu-noir indique la présence des tanins galliques. Tanins catéchiques : Une solution d'acide chlorhydrique aqueux HCL (1%) est ajoutée à 5mL d'extrait. Le mélange est porté au bain-marie à 90°C pendant 15min. La formation d'une coloration rouge indique la présence des tanins catéchiques.
Saponosides	5mL d'extrait sont vigoureusement agités puis laissés reposés pendant 15min. La formation d'une mousse stable de hauteur supérieur à 1cm, persistant plus de 15min indique la présence des Saponosides.
Terpenoïdes	5mL d'extrait, 2mL de chloroforme et 3mL d'H ₂ SO ₄ sont mélangés, l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface indique la présence des terpenoïdes
Glycosides	1mL d'extrait + 1mL d'acide acétique glacial + 1mL d'H ₂ SO ₄ concentré et 2 à 3 gouttes de FeCl ₃ (2%). L'apparition d'une coloration bleu vert indique la présence des glycosides.
Stéroïdes	1mL d'extrait + 2mL de chloroforme. L'apparition de deux phases l'une marron en haut et l'autre jaune en bas indique la présence des stéroïdes.
Anthraquinones	5mL de NH ₄ OH à 10% sont mélangés à 10mL d'extrait. En maintenant l'agitation. La coloration violette indique la présence des anthraquinones.
Anthocyanes	Quelques gouttes de HCL pur sont ajoutées à 5mL d'extrait, un changement de couleur surgit. Des gouttes de NH ₄ OH sont additionnées. Le changement de la couleur une deuxième fois indique la présence des anthocyanes.

6. Extraction des poly phénols

6.1. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes est effectuée sur 30g de la matière végétale macérée dans 100mL de méthanol pendant 72h. Après filtration, le filtrat est évaporé sous vide pour éliminer le méthanol et récupérer un résidu sec qui est traité avec 50mL d'eau tiède pour obtenir une phase aqueuse [26].

Une série d'extraction liquide - liquide (affrontements) de la phase aqueuse est réalisée par l'ajout de plusieurs fractions de solvants non miscibles, à polarité croissante comme suit :

- ✓ Lavage avec trois fractions de 30mL de chloroforme permettant d'éliminer la chlorophylle et les lipides.
- ✓ Lavage avec trois fractions de 30mL d'éther di éthylique permettant d'extraire les génines et les flavonoïdes libres.
- ✓ A la fin, la phase aqueuse est lavée avec trois fractions de butanol à 30mL afin de récupérer la phase alcoolique. Après évaporation sous vide de cette dernière, le résidu sec est récupéré pesé et stocké pour analyse et étude.

6.2. Extraction des tanins :

30g de la matière végétale séchée et coupée est laissée macérer dans 100mL d'éther de pétrole pendant 24h. Après filtration, le marc est récupéré alors que la chlorophylle et les lipides sont éliminés. Le marc récupéré est traité avec 50mL d'éther di éthylique pendant 30min, puis filtré pour éliminer les phénols, les catéchines, ces dernières sont reprises une seconde fois avec 100mL de méthanol pendant 30min. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat soumis à une évaporation sous vide [26]. Le résidu sec est récupéré pesé et stocké pour analyse et étude.

6.2. 1. Calcul de rendement des métabolites secondaires :

Le rendement en extrait sec (de flavonoïdes ou tanins) est évalué par l'expression :

$$R(\%) = \frac{M_{sec}}{M_m} * 100 \dots \dots \dots (2-6)$$

M_{sec} : masse de l'extrait sec en g.

M_m : masse de la matière végétale en g

6.3. Dosage poly phénols

6.3.1. Dosage des poly phénols totaux

Le dosage des poly phénols totaux est effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC), le protocole détaillé est donné en annexe 03 [27].

6.3.2. Analyse des flavonoïdes et tanins par HPLC

20 μ L de chaque extrait sont injectés dans une colonne de type phase inverse C18 de dimensions égales à 125 * 4.6mm. La phase mobile est constituée de trois éluant : l'eau distillée, méthanol et acide acétique (50 :47 :3) (V/V/V). Le gradient d'éluion appliqué est de type isocratique étalé sur 10min. le débit est de 1mL/min. La détection est effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale à 280nm.

7. Préparation du sirop simple

Afin de formuler le sirop simple, on a utilisé un mini réacteur branché au bain thermostat, au moyen de flexible résistant à la chaleur (figure2.4), la température du bain est réglée à 95°C, le sirop est préparé en diluant une quantité de saccharose, pesée au préalable, dans une fiole jaugée. Cette préparation est versée dans le mini réacteur chauffé. La formulation du sirop commence dès le début de l'agitation et se termine après dissolution totale du saccharose. Le sirop obtenu est refroidi à 20°C.

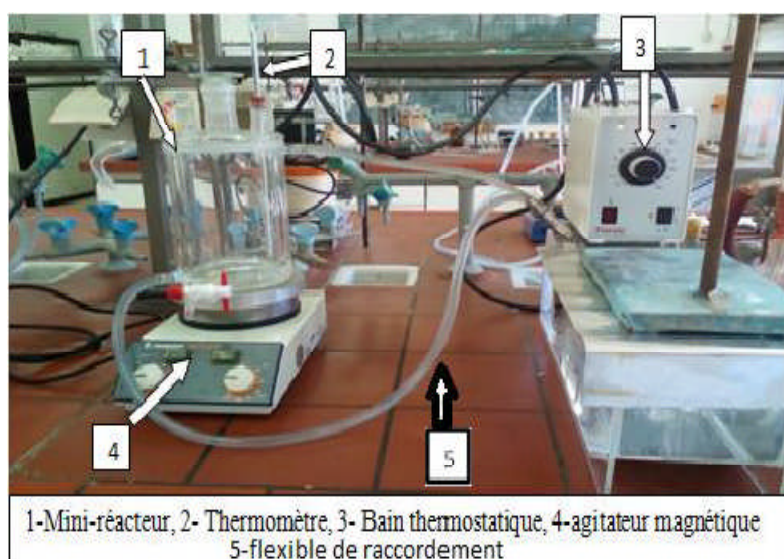


Figure 2.4 : Montage pour formulation d'un sirop simple.

7.1. Caractérisation du sirop

7.1.1. Densité

La densité de sirop est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de 5mL à la température de 23C°.

$$D = \frac{(M_0 - M_1)}{V} \dots\dots\dots (2-7)$$

M₀: masse du pycnomètre avec sirop (g)

M₁ : masse du pycnomètre vide (g)

V : volume du pycnomètre (mL)

7.1.2. Viscosité

La viscosité est la grandeur qui caractérise la résistance d'un fluide à l'écoulement laminaire. Pour mesurer la viscosité, nous avons utilisé un viscosimètre rotatif de type BROOKFIELDLV-I+, ayant comme accessoire quatre éléments mobiles de formes différentes, on a utilisé le mobile S64 à 30 tr/min, la viscosité est donnée en Cp.

7.1.3. Turbidité

La turbidité correspond à la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de particules en suspension. Pour effectuer des mesures de turbidité, nous avons utilisé un turbidimètre de type EUTECH, et de modèle TN-100/T-100, la turbidité est donnée en NTU.

8. Formulation d'une pommade

Afin de formuler une pommade, 10g d'huile de paraffine et 80g de vaseline ont été additionné à 10g d'oxyde de zinc. En triturant le mélange vigoureusement dans un mortier une pommade dense et douce se forme [1]. En vue de former une pommade antioxydant, 100 mg des poly phénols extraits (flavonoïdes et tanins) des deux plantes sont ajoutés au placebo déjà formé.

La caractérisation de la pommade est faite par la détermination des caractères organoleptiques (couleur, odeur et aspect), mesure de la viscosité (le mobile utilisé est S63 à 100 tours/min) et mesure de pH.

9. Etude antibactérienne

9.1. Repiquage des souches

Cette première étape consiste à isoler les différentes colonies bactériennes sur gélose puis sur des milieux sélectifs à l'aide d'une pipette pasteur puis à les incuber dans une étuve à une température de 35°C [36].

9.2. Méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme)

9.1.1. Choix de milieux de culture:

Le milieu choisi pour les souches bactériennes est la gélose Muller-Hinton. Les boîtes de pétri ont une épaisseur de 4mm de gélose MH la composition de ces milieux est on annexe 04 (environ 20mL par boîte).

9.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Des colonies de bactéries identiques sont prélevées dans le but de préparer des suspensions bactériennes. Ces colonies ont subi au préalable une culture pure de 18 à 24 heures. Ces bactéries sont mises dans 5 à 10mL d'eau physiologique stérile. Les suspensions sont agitées sous prétexte de les homogénéiser jusqu'à avoir une densité de 0.5Mc Farland équivalente à une densité optique de 0.08 à 0.10 lue à 625nm [36].

9.1.3. Ensemencement

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne en le pressant fermement contre la paroi interne de tube, afin de le décharger au maximum.

L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, en faisant pivoter l'écouvillon sur lui-même, et en le passant sur la périphérie de la gélose pour finir l'ensemencement [36].

9.1.4. Préparation des disques de l'aromatogramme

Les disques sont préparés à partir de papier wattman N° 3, les disques ont un diamètre de 6mm avec un contour bien régulier, ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'étuve pendant 20 min à 120°C. À l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen, les disques sont déposés sur la surface gélosée MH. Un espace de 20mm centre à centre de chaque disque doit être respecté (le principe de la méthode est donné en annexe 04).

Pour chaque boîte de pétri, on dépose au maximum 6 disques.

- À l'aide d'une micropipette quatre disques sont imprégnés chacun de 5 μ L d'HE, le premier est imbibé par l'HE de Thymus. N, le deuxième disque est immergé dans l'HE d'Eucalyptus. G, le troisième et le quatrième sont imprégnés des HEs de référence (les huiles commerciales de chaque plante).
- Un disque imprégné de 5 μ L de DMSO comme témoin négatif pour toutes les souches en utilisant une micropipette de 5 μ L.
- Un disque imprégné de 5 μ L de l'antibiotique comme témoin positif [36].

9.1.5. Incubation et lecture

Les boîtes de pétries sont ensuite fermées et incubées à 35°C pendant 24 heures.

La lecture est faite pour chaque HE par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération bactérienne à l'aide d'un pied à coulisse [36]. Les diamètres ainsi mesurés sont comparés à des diagrammes de référence.

9.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'un antibiotique ou d'une autre substance capable d'inhiber dans un milieu (milieu liquide ou milieu solide), toute croissance visible à l'œil nu après 24h d'incubation à 35°C. Dans notre cas, c'est la concentration minimale des HEs qui produit une réduction de plus de 90% de la croissance des colonies bactériennes, donc ne laisse survivre que 10% de la population [24].

L'évaluation quantitative de pouvoir antibactérien des HEs et des métabolites secondaires correspond à la détermination de la CMI sur des bactéries par la méthode des dilutions en milieu solide [36].

9.3.1. Préparation des pré-cultures et de l'inoculum

La procédure suivie pour la préparation des suspensions bactériennes est identique à celle citée au préalable dans la méthode des aromatoigrammes.

9.3.2. Préparation des dilutions des HEs

Treize boîtes de pétri sont préparées en prélevant des volumes différents d'HE de Thymus. N qui sont ensuite ajustées à 18mL de gélose MH, tout en agitant pendant quelques secondes pour homogénéiser le milieu M-H avec l'HE, puis laissées refroidir et solidifier pendant 24h. Cette procédure est répétée pour l'HE d'Eucalyptus. G, HE commerciale de thym, HE commerciale d'Eucalyptus, flavonoïdes de thym, flavonoïdes d'eucalyptus, tanins de thym, tanins d'eucalyptus.

Au total huit CMI ont été réalisées correspondant aux huit échantillons extraits ; chaque CMI nécessite treize boîtes de pétris.

9.3.3. Dépôt des spots, incubation et lecture :

Après solidification, des spots de 2 μ L des souches bactériennes de densité de 0.5 Mc Farland sont déposés à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées. La lecture de la CMI correspond à l'apparition des colonies bactériennes [36].

9.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB

La CMB décrit l'effet bactéricide d'une substance, elle correspond à la plus faible concentration en HE capable de tuer plus de 99.9% de l'inoculum bactérien initial [25]. La détermination de la CMB d'une HE est réalisée en faisant un repiquage des zones d'inhibition formées par les CMI et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur le milieu de culture (gélose M-H) puis incubé pendant 24 heures à 35C°.

La lecture se fait en calculant le rapport CMB /CMI tel que :

- $CMB/CMI < 4$ l'activité est bactéricide.
- $CMB/CMI \geq 4$ l'activité est bactériostatique [36].

10. Préparation des sirops pharmaceutiques :

Grace à la méthode de CMI et la CMB, la concentration des HEs de thym et d'eucalyptus (HEs extraites et commerciales) ainsi que celle des métabolites secondaires (flavonoïdes et tanins des deux plantes) à injecter dans les sirops simples est déterminée. Pour chaque substance des 8 échantillons, une quantité bien déterminée est injectée dans les sirops simples à froid [36].

11. Etude de l'activité antioxydante des HEs et poly phénols

L'activité antioxydante des HEs de Thymus N. et d'Eucalyptus G. ainsi que celle des polyphénols est étudiée selon la méthode du DPPH. Cette méthode nécessite comme réactif une solution de DPPH ayant une absorbance de 0.8 à une longueur d'onde de 517nm. L'évaluation de cette activité passe par trois étapes :

- La première consiste à préparer une solution de DPPH ayant une absorbance de 0.6 à 0.9. (La méthode de préparation est donnée en annexe 05).

- L'étape suivante concerne la préparation de la solution mère de chaque extrait. Les solutions mères des extraits sont utilisées pour la préparation de 4 solutions diluées (75%, 50%, 25%, 12.5%).

i. HE de Thymus N. et HE Eucalyptus G. :

1g d'HE de thym est ajouté à 10mL de méthanol (solution mère) tandis que 0.75g d'HE d'eucalyptus est mélangé dans 10mL de méthanol.

ii. Poly phénols (flavonoïdes et tanins) :

100mg de chaque extrait sont mélangés à 10mL de méthanol.

- Enfin la dernière étape consiste à l'addition de la solution DPPH aux solutions mères et filles tout en mesurant le pouvoir antioxydant de chacune par spectrophotomètre UV.

11.1. Dosage de la solution mère de chaque extrait

Pour chaque solution mère citée, 50µL sont prélevées puis mélangées à 2mL de DPPH. Cette opération est réalisée trois fois. Les trois tubes sont incubés pendant 30min avec une solution témoin de DPPH puis l'ensemble est dosé par spectrophotométrie UV.

11.2. Préparation des dilutions ou solutions filles :

Pour chaque solution mère, quatre dilutions sont réalisées (75%, 50%, 25% et 12.5%). Pour chaque dilution réalisée, le test est répété trois fois, chaque dilution est accompagnée d'une solution DDPH appropriée. Après 30min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue contre un blanc à 517nm.

11.3. Préparation de la solution témoin

L'acide ascorbique est utilisé comme témoins positif, ce dernier subit les mêmes étapes : préparation de la solution mère et solutions filles...etc. L'activité antioxydant est calculée par l'équation suivante :

$$I(\%) = 100 \times \frac{(A_b - A_e)}{A_b} \dots\dots\dots (2-8)$$

$I(\%)$: Pourcentage d'inhibition

A_b : absorbance du blanc.

A_e : absorbance de l'échantillon.

A partir de cette valeur nous déterminons IC_{50} qui représente les concentrations des HEs et polyphénols nécessaires à 50% de neutralisation en utilisant le graphe de DPPH.

Chapitre 3

Résultats et Discussions

1. Taux d'humidité

Les taux d'humidité des feuilles d'Eucalyptus G. et de Thymus N. sont évalués chaque jour. Le séchage des feuilles d'Eucalyptus G. a duré 10 jours ; estimé à 100% le premier jour, ce taux a atteint 41% le dernier jour. Le Thymus N. a séché au bout d'une semaine, le taux du dernier jour est de 9%. Les graphes suivants résument les résultats trouvés pour chaque journée, les taux d'humidité moyens sont résumés dans le tableau (3-1) :

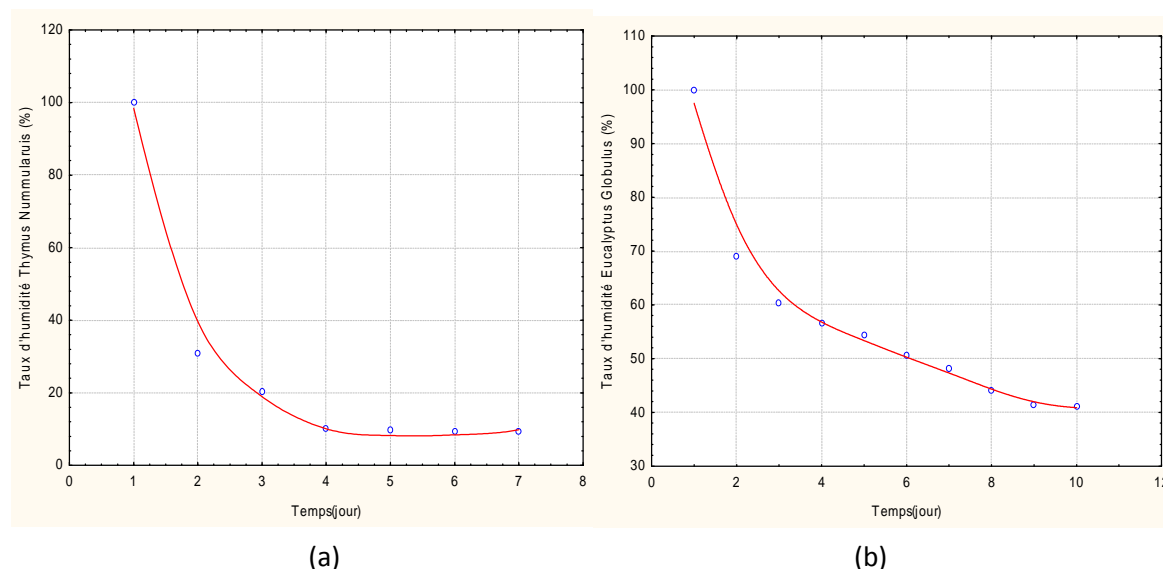


Figure 3-1 : Taux d'humidité (a) Thymus N. (b) l'Eucalyptus G

Le tableau 3.1 regroupe les valeurs moyennes du taux d'humidité des deux plantes

Tableau 3-1 : Taux d'humidité moyen pour les feuilles de Thymus.N et Eucalyptus.G

Plante	Taux initial (%)	Taux final(%)	Taux moyen (%)
Eucalyptus	100	41	56.43
Thym	100	9	27.13

Les résultats montrent que le taux d'humidité moyen d'Eucalyptus.G dépasse les 50% tandis que celui du Thymus.N est inférieur à 30%. En effet, la forme rétrécit et fine des feuilles de Thymus.N est avantageuse pour atteindre un faible taux en un temps court, contrairement à la forme large et épaisse des feuilles d'Eucalyptus.

Pour la réalisation de nos expériences le taux d'humidité des plantes utilisées est respectivement de 9% et 41% pour le Thymus.N et Eucalyptus.G.

2. Extraction HEs Thymus N. et Eucalyptus G.

2.1. Evolution du rendement de l'extraction des HEs Thymus N. et Eucalyptus G.

Un rendement en HE d'Eucalyptus et Thymus appréciable est obtenu après 3h d'extraction, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 3-2 : Rendements en HEs des plantes utilisées.

Plantes	Masse de la matière végétale (g)	Volume d'eau (L)	Durée d'extraction (h)	Rendement
Thymus	100	0.75	3	1.5%
Eucalyptus	100	0.75	3	0.95%

En plus d'une anatomie nettement distincte, les poches sécrétrices des HEs pour chaque plante sont différemment localisées, en effet, Thymus N. secrète son essence au niveau des poils glandulaires épidermiques donc à la surface des cellules ceci facilite l'extraction et explique son rendement élevé (1.5%).

Contrairement, l'emplacement de l'essence de l'Eucalyptus, est situé dans des poches sphériques schizogènes, nées de l'écartement de cellules sécrétrices, la délocalisation de cette essence exige plus d'énergie et de temps, d'où le faible rendement (0.95%)

3. Caractérisation des HEs de Thymus N. et Eucalyptus G.

3.1. Caractérisation physique et organoleptique :

Cette étape est l'une des étapes primordiales pour la détection et la détermination de la qualité de l'HE. Elle renferme les différentes propriétés physico-chimiques qui assurent une bonne qualité des HEs. C'est grâce à la valeur de la densité relative que toute tentative de fraude est évitée. Pour l'indice de réfraction il permet de connaître la teneur en mono terpènes. Si la valeur de l'indice est élevée la teneur en mono terpènes est importante mais si sa valeur est faible c'est la teneur en dérivés oxygénés qui est remarquable.

3.2. Paramètres physico-chimiques

Les caractéristiques des HEs de Thym N. et Eucalyptus G. sont résumées dans le tableau (3-3) et sont comparées aux valeurs de la norme AFNOR et celles de la pharmacopée européenne.

Tableau 3-3: Propriétés physico-chimiques de l'HE des deux plantes

Paramètres physico-chimiques	Thymus Nummularius extrait	AFNOR	Pharmacopée Européenne
Aspect	Liquide mobile limpide	/	Liquide mobile limpide
Couleur	Jaune pale	/	Jaune clair
Odeur	Forte et caractéristique		Forte agréable épicée
Densité relative à 20°C	0.910	0.894 à 0.930	0.935
Indice de réfraction	1.500	1.483 à 1.510	1.505
pH	4	/	/
Indice d'acide	1.79	/	/

Paramètres physico-chimiques	Eucalyptus Globulus	AFNOR	Pharmacopée Européenne
Aspect	Liquide mobile limpide	Fluide et mobile	Liquide
Couleur	Jaune clair	Jaune très pale	Jaune
Odeur	Forte et épicée	Epicée	Forte
Densité relative à 20°C	0.963	0.905 à 0.921	0.900 à 0.920
Indice de réfraction	1.465	1.460 à 1.476	1.460
pH	4	4 à 6	4 à 6
Indice d'acide	2.10	0.84 à 3.74	0.87 à 3.74

Les valeurs expérimentales regroupées dans le tableau 3.3 sont en accord avec les valeurs données par la norme AFNOR et par la pharmacopée européenne, ceci indique la conformité et la qualité de l'huile extraite.

4. Analyse des HES des deux plantes par CPG/SM

4.1. HE de Thymus N.

L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle de Thymus N. a fourni 18 pics correspondant à 18 composés volatils. Le composé majoritaire (37.308 %) avec un temps de rétention de 24.39 min correspond au Thymol. Les résultats trouvés sont donnés dans le tableau suivant (les spectres correspondants et les références sont donnés en annexe 01).

Tableau 3-4 : Composition de l'HE de Thymus N.

Tr (min)	Pourcentage relatif (%)	Composé identifié
8.711	0.491	Alpha-pinene
10.717	0.138	Alpha-phellandrene
11.078	0.649	1-octen-3-ol
11.428	0.161	3-octanone
11.626	1.521	Myrcene
12.226	0.288	Beta-phellandrene
13.24	10.08	Benzene,1-methyl-2-(1-methylethyl)
14.389	0.112	3-carene
16.609	0.118	Cis beta terpineol
19.891	0.367	3-cyclohexan-1-ol,4-
20.45	0.609	methyl 1-(1-methylethyl)
22.106	5.567	p-menth 1-en-8-ol
23.627	0.143	benzene,2-methoxy-4methyl-1-(1-methylethyl)
24.39	37.308	1-cyclohexene-1-carboxaldehyd,4-(1-methylethyl)
24.629	3.57	Thymol
28.458	0.437	Phenol,2-methyl-5(1-methylethyl)
33.285	1.311	Caryophyllene
34.993	0.169	Spathulenol
		Cis-alpha copaene-8-ol

A.T. AINANE et al 2018, ont déterminé la composition de l'HE de Thymus Bieicherianus (Maroc) et ont trouvé un pourcentage relatif en thymol égal à 36.85%. Le pourcentage en thymol nous renseigne sur le pouvoir antibactérien de l'HE en effet, plus la quantité de thymol est grande plus l'activité est meilleure. La différence du taux de Thymol entre ces deux huiles aboutira à une distinction dans leur activité antibactérienne.

4.2. HE d'Eucalyptus G.

Le résultat de l'analyse de cette huile met en évidence 19 pics représentant 19 composés volatils. Le pourcentage le plus élevé est estimé à 74.012% correspondant à l'eucalyptol (1-8-cinéol).

Tableau 3-5: Composition de l'HE d'Eucalyptus G.

Tr (min)	Pourcentage (%)	Composé identifié
8.717	1.745	Alpha-pinene
13.415	74.012	Eucalyptol
13.514	2.018	Cyclopentene,3-isopropenyl 5,5-dimethyl
13.584	0.980	Benzene ,1,2,3,4-tetramethyl
14.837	0.381	1,4-cyclohexadiene,1-methyl4-(1-methylethyl)
19.92	2.137	3-cyclohexen-1-one,4-(1-methylethyl)
22.001	0.615	Phenol,4-(1-methylethyl)
22.345	3.549	Propanal,2-methyl-3 phenyl
23.621	3.889	1-cyclohexene-1-carboxaldehyde,4-(1-methylethyl)
24.192	1.327	Benzene methanol, 4-(1-methylethyl)
24.618	1.193	Thymol
29.776	1.305	1H-cyclopro(e) azulene,decahydro- 1,1,7,trimethyl-4-methylene,[1aR-
30.621	0.791	(1a,alpha,4a.beta,7.alpha,7a.beta,7b.alpha)]
30.703	0.299	1H-Indene,2,3-dihydro 1,1,3-trimethyl
32.819	0.792	1-methyl-2 acetylidole
33.477	2.922	10S,11S-Himachala-3(12),4-diene
34.072	0.861	(-)Spathulenol
35.028	1.825	Ledol
37.657	0.409	Cis-alpha-copaene-8-ol 1-propyl-3-(propen-1-yl adamantine)

Les résultats obtenus par la CPG/SM sont conformes à ceux cités par la pharmacopée Européenne. L'HE d'Eucalyptus G. est donc conforme pour usage pharmaceutique et est commercialisable.

5. Tests phytochimiques :

Les résultats obtenus du screening phytochimiques sur l'infusé de la poudre des deux plantes sont résumés dans le tableau 3-6.

Tableau 3-6: Composition des plantes en polyphénols.

	Eucalyptus Globulus	Thymus Nummularis
Tanins	+++	++
Flavonoïdes	++	++
Saponosides	+	+
Terpenoïdes	++	++
Glycosides	-	-
Stéroïdes	-	+
Anthocyanes	-	-
Anthraquinones	-	+++

+++ : Présence très forte, ++ : Présence forte, + : Présence faible, - : Absence

Les résultats révèlent une présence importante de flavonoïde, de tannin, et de terpénoïdes. D'un point de vue biologique, ces métabolites sont des composés potentiellement actifs rencontrés dans toute ou une partie de la plante. Ce sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique [27]. Les photos représentant les résultats des tests sont en annexe 3.

6. Extraction des poly phénols (tanins et flavonoïdes) des deux plantes

6.1. Extraction et détermination de la teneur en Tanins des deux plantes

Le taux de tanins dans Thymus N. est de 1.7%, supérieur à celui trouvé par AKROUM.S (2010) pour Thymus V. Par conséquent, en plus des performances d'extraction, le rendement est tributaire de plusieurs facteurs tels que la différence de l'espèce et de composition de la plante.

Le taux de tanins obtenus pour les feuilles d'Eucalyptus G. (3.1%) indique la richesse de cette dernière en tanins. Pour cette plante nous n'avons pas effectué de comparaison en raison d'absence de travaux traitant l'extraction des polyphénols d'Eucalyptus.

6.2. Extraction et détermination de la teneur en flavonoïdes des deux plantes

Le taux de flavonoïde dans Thymus N. est de 0.58% tandis qu'un taux de 0.46% a été estimé pour le genre Thymus V. d'AKROUM.S (2010). Le taux d'extraction des flavonoïdes de notre plante est meilleur probablement, en raison de la différence de la chemotype et provenance des deux plantes.

Pour Eucalyptus G. le taux est nettement élevé (0.74%) lui conférant ainsi plusieurs activités telles que l'activité antioxydante [22].

7. Analyse par HPLC des tanins et des flavonoïdes :

Les solutions témoins utilisées pour l'identification des tanins et flavonoïdes des deux plantes et leurs temps de rétentions sont regroupées dans le tableau (3-7) :

Tableau 3-7 : Standard et temps de rétentions utilisé pour l'analyse par HPLC

N°	Standard	Temps de rétention
1	Acide gallique	12.16
2	Acide caféique	15.10
3	Acide coumarique	16.32
4	Acide cinnamique	21.23
5	Quercétine	37.6

7.1. Tanins et flavonoïdes Eucalyptus G.

L'analyse par HPLC effectuée sur les extraits des feuilles d'Eucalyptus G. à une longueur d'onde 280nm, a mis en évidence 2 pics majoritaires (chromatogramme 2, annexe 3).

Le premier pic correspond à l'acide cinnamique (27.00%, étalon des tanins) vient confirmer l'existence des tanins et le deuxième correspond à la quercétine (72.99%, étalon utilisée pour la caractérisation des flavonoïdes) témoignant la présence des flavonoïdes. Nos résultats convergent vers ceux trouvés sur deux génotypes d'Eucalyptus étudiés par Bénédicte Favreau (2012).

7.2. Tanins et Flavonoïdes du Thymus N.

L'analyse par HPLC réalisée sur les extraits des feuilles de Thymus N. à une longueur d'onde de 280nm a mis en évidence 4 pics (chromatogramme 1, annexe 3)

En comparant nos résultats avec ceux trouvés par Angela Marculescu et al (2008), on retrouve un composé en commun entre le thymus Vulgaris et notre plante; il s'agit de l'acide caféique à 17.78%. Ce dernier est généralement utilisé comme étalon pour la caractérisation des flavonoïdes, son apparition confirme leur présence.

La quercétine (37.6%, étalon flavonoïdes) figure dans le chromatogramme de notre plante mais pas dans le Thymus Vulgaris.

L'apparition de deux étalons caractéristiques aux flavonoïdes (quercétine et acide caféique) dans le chromatogramme de nos extraits, contre un seul pour Thymus. Vulgaris nous renseigne sur la quantité des flavonoïdes présents dans les deux espèces. Le motif de cette différence est lié au génotype des deux plantes, leur espèce et leur prévenance.

Par ailleurs, l'étalon acide cinnamique (24.10%) confirme la présence des tanins.

8. Dosage des poly phénols totaux des deux plantes

8.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé sur différents solvants par la méthode de Folin-Ciocalteu. La lecture des absorbances des échantillons sur l'UV est faite pour une longueur d'onde $\lambda = 765\text{nm}$. L'acide gallique est utilisé comme standard, figure (3.2) représente sa courbe d'étalonnage.

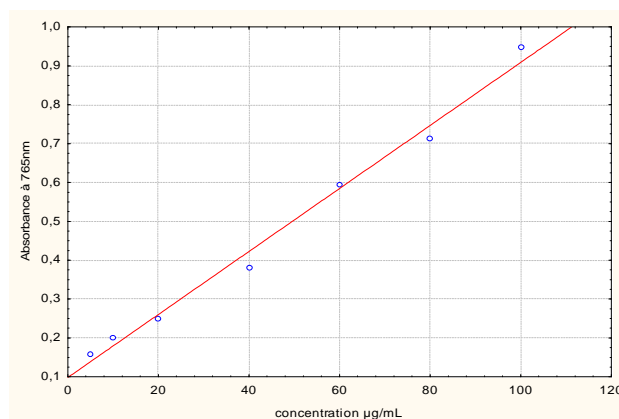


Figure 3-2: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau (3-8), la quantité des polyphénols est rapportée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait.

Tableau 3-8: Dosage des polyphénols présents dans les feuilles des deux plantes

Solvant	Absorbance (Thymus)	Teneur ($\mu\text{g EAG/mg}$)	Absorbance (Eucalyptus)	Teneur ($\mu\text{g EAG/mg}$)
Ethanol	0.382	34.744	0.832	89.621
Méthanol	0.393	36.085	0.838	90.357
Méthanol+eau	0.326	27.914	0.752	79.866

L'espèce Eucalyptus G. donne clairement le meilleur rendement $90.357 \mu\text{g EAG/mg}$, ceci est en rapport avec l'utilisation des solvants polaires et solvants mixtes (méthanol + eau) qui s'avèrent être très avantageux pour l'extraction des molécules polaires, ce résultat est largement rapporté dans la littérature.

La teneur en polyphénols dans Thymus N. bien qu'inférieure (34.77 et $36.083 \mu\text{g EAG/mg}$, respectivement dans l'éthanol et le méthanol), à celle de l'Eucalyptus G. reste notable et est largement supérieure à celle trouvée pour l'espèce Thymus V. étudié par ZEGHAD.N (2010) 9.072 mg EAG/mg dans l'éthanol.

9. Etude antibactérienne des HEs extraites et commerciales et des poly phénols

9.1. Discussion des résultats obtenus par aromatoigramme

L'évaluation de pouvoir antibactérien a été mis en évidence en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition par les HEs vis-à-vis des souches testées : L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par **Mutai et al, (2009)** ; ils ont classé les zones d'inhibitions de la croissance en 5 classes (le tableau 3-9)

Tableau 3-9 : Classification des zones d'inhibition

Diamètre (mm)	Inhibition
$D \geq 30$	Très Fortement inhibitrice
$21 \leq D \leq 29$	Fortement inhibitrice
$16 \leq D \leq 20$	Modérément inhibitrice
$11 \leq D \leq 16$	Légèrement inhibitrice
$D < 10$	Non inhibitrice

Le DMSO utilisé pour la dissolution des HEs n'a montré aucun effet antibactérien sur les souches testées (témoin négatif). Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* des HEs extraites sont résumés dans le tableau (3-10) :

Tableau 3-10: Diamètres des zones d'inhibitions des HEs extraites et commerciales.

Huiles	D.E.Coli	D.S.Aureus	D.P.aeruginosa
Thym.N	46.2	17.5	0.00
Eucal.G	44.6	16.30	0.00
Thym.C	26	12	0.00
Eucal.C	22.5	11.30	0.00

Les résultats indiquent que les HEs extraites et commerciales des deux plantes ne présentent aucune activité antibactérienne vis-à-vis des souches *Pseudomonas aeruginosa* (G-).

Pour l'huile extraite de *Thymus*, le diamètre d'inhibition ($D = 46.2$), notés vis-à-vis de la bactérie *E. coli* est remarquable comparé au diamètre d'inhibition ($D=17.5\text{mm}$) déterminés vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (G+). Ces résultats qualifient cette huile d'être très fortement inhibitrice vis-à-vis de *E. coli* et modérément inhibitrice vis-à-vis de *staphylococcus aureus*.

La même observation est notée pour l'extrait d'*Eucalyptus* et pour les deux HEs commerciales des deux plantes. Les résultats marqués pour nos huiles concordent avec ceux trouvés BEY OULD SI SAID.Z (2014) pour l'*Eucalyptus* G. et ZEGHAD.N (2010) pour le *Thymus*.

La sensibilité des huiles essentielles aux bactéries Gram (-) par rapport à la bactérie Gram (+) peut être expliquée par la relation structure-activité. En effet, certains composés phénoliques comme le thymol présent dans le Thymus N. et l'eucalyptol dans l'Eucalyptus G. peuvent, grâce à leurs groupes fonctionnels, adhérer aux bactéries Gram négatif par fixation aux protéines et aux lipophylsaccharides membranaires et rendre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [33].

La figure suivante montre l'histogramme des diamètres d'inhibition de la prolifération bactérienne.

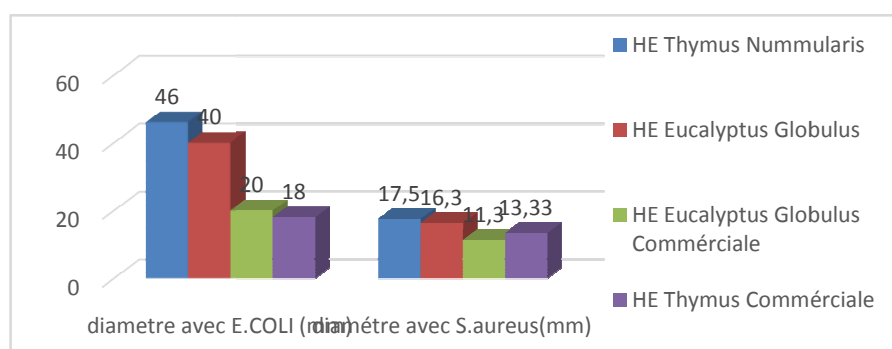


Figure 3-3: Histogramme des diamètres d'inhibition de E. coli et S.aureus.

Concernant le pouvoir antibactérien des polyphénols (flavonoïdes et tanins des deux plantes) les résultats de l'aromatogramme sont positifs uniquement vis-à-vis de la bactérie staphylococcus aureus G (+). Aucune inhibition des bactéries à Gram (-), *P. aeruginosa* et *E. coli*, n'a été enregistrée. Les bactéries à Gram (-) révèlent par conséquent une forte résistance. Cette résistance est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméables à la plupart des agents biocides) (Bouزيد *et al*, 2011, Faucher et Avril, 2002).

Tableau 3-11: Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes et tanins.

	Flavonoïde.Thym	Flvonoides.E	Tanins Thym	Tanins.E
D.S.aureus(mm)	11	11	13	10

Au vu des résultats (annexe 04), la croissance de la souche *S. aureus* a été inhibée par la plupart des polyphénols à la concentration de 102.5 mg/mL. Les flavonoïdes et tanins de l'Eucalyptus G. présentent la meilleure activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* avec des diamètres d'inhibition de 11 et 13mm respectivement. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux rapportés dans la littérature (Cowman, 1999).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes et tanins peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al*, 2005).

Les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antibactérienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, on se basant sur ce résonnement (cowman, 1999) on déduit que nos flavonoïdes sont de type flavones (dépourvues de groupements hydroxyles libre) cela confirme nos résultats des tests phytochimiques.

9.2. Méthode des CMI et CMB

Pour compléter les résultats qualitatifs obtenus par la méthode de l'aromatogramme, la lecture de la CMI sur les treize boites (annexe 04) permet de détecter les concentrations minimales des huiles et polyphénols permettant d'avoir une activité antibactérienne. Cette étude de (CMI) est suivis de l'étude CMB permettant de situer l'activité antibactérienne des échantillons entre bactéricides et bactériostatiques. Les résultats notés sont les suivants :

Tableau 3-12: Résultats de la CMI et CMB

	Echantillon	CMI (mg)	CMB (mg)	Types
Les HEs	HE Thymus.N	0.125	0.125	Bactéricide
	HE Eucalyptus.G	0.480	0.480	Bactéricide
	HE Thymus commerciale	1.830	1.830	Bactéricide
	HE Eucalyptus.G commerciale	3.840	3.840	Bactéricide
Poly- phénols	Tanins Thymus.N	51.20	/	CMI > 51.20
	Tanins Eucalyptus.G	51.20	/	CMI > 51.20
	Flavonoïdes Thymus.N	51.20	/	CMI > 51.20
	Flavonoïdes Eucalyptus.G	51.20	/	CMI > 51.20

Pour les mêmes souches et la même espèce de plante, La CMI (0.48mg/mL) de l'HE d'Eucalyptus. G extraite est inférieure à celle trouvée par Damjanovic V. *et al*. (2011) (1,57 mg/mL) et celle trouvée par Tyagui *et al*, (2011) (4,5 mg/mL). Ce résultat souligne l'importance du pouvoir antibactérien de l'HE extraite. La même constatation est faite pour l'HE commerciale de la même plante.

La CMI (0.1mg/mL) de l'HE de Thymus. N extraite est inférieure à la CMI (1.86mg/mL) de l'HE de Thymus commerciale ce résultat marque la puissance de l'activité antibactérienne de l'HE de Thymus N. extraite.

Pour les tanins et flavonoïdes de chaque plante, la CMI est supérieure à 51.2 mg/mL (solution mère) ce qui signifie que l'activité antibactérienne des polyphénols est très faible avec cette concentration. En vue de faire le point sur l'activité antibactérienne de ces derniers ; nous avons comparé les résultats trouvés par la CMI réalisée avec une concentration de 51.2mg/mL et les résultats marqués lors de la réalisation de l'aromatogramme avec une concentration de 102.5mg/mL. Pour cette dernière concentration, les polyphénols ont une inhibition notable vis-à-vis de S.aureus.

10. Formulation des sirops à base des HEs et polyphénols

La formulation de ces sirops est réalisée en injectant des concentrations en principe actifs P.A (HEs et polyphénols) égales à la CMB trouvée et à la DL₅₀ théorique [35]. Dans le tableau (3-13) on regroupe les différents sirops formulés, les caractéristiques permettant le contrôle de qualité de ces sirops et les données de la pharmacopée européenne [37].

Tableau 3-13 : Caractéristiques des sirops formulés à base d'huiles essentielles.

Sirops à base d' HEs	Quantité de P.A injecté (mg)	Densité	Viscosité (cp)	Turbidité (NTU)
Placebo	/	1.27	25	0.30
HE Thymus	0.125(CMB)	1.27	36	0.81
HE Eucalyptus	0.480(CMB)	1.28	60	0.93
HE Thymus	0.05 (DL50)	1.27	26	0.40
HE Eucalyptus	0.20 (DL50)	1.27	27	0.45
HE Thymus.Commerciale	0.130(CMB)	1.27	39	0.81
HEEucalypt.Commerciale	0.500(CMB)	1.28	62	0.90
HE Thym+	0.125+0.480	1.30	69	1.20
HE Eucalyptus	(CMB)			
HE Thymu.C+	0.130+0.500	1.30	68	0.99
HE Eucalyp.C	(CMB)			
	Densité (P.E)	Viscosité(AFNOR)	Turbidité(ISO)	
	1.26-1.32	5-140	0.1	

P.E : pharmacopée européenne**Tableau 3-14: Caractéristiques des sirops à base de polyphénols**

Sirops formulés	Quantité de P.A Injecté (mg)	Densité	Viscosité (cp)	Turbidité(NTU)
F.Thymus	100	1.28	29	0.83
F.Eucalyptus	100	1.28	29	0.70
T.Thymus	100	1.29	29	0.68
T.Eucalyptus	100	1.30	29	0.72

Densité(P.E)	Viscosité(AFNOR)	Turbidité(ISO)
1.26-1.32	5-140	0.1

En comparant les caractéristiques des sirops formulés à celles exigées par la pharmacopée européenne, les normes d'AFNOR et ISO 9001, on constate que la densité des sirops formulés est conforme à celle recommandé par la pharmacopée européenne.

La viscosité est comparée à celle donnée par la norme AFNOR pour les fluides pharmaceutiques, les valeurs de viscosité des sirops formulés répondent à cette norme. Selon la pharmacopée européenne la viscosité peut être améliorée en ajoutant des agents viscosifiants.

La turbidité des sirops formulés est comparée à la turbidité de l'eau estimée à 0.1NTU (équivalente à 20 particules/mL) par les normes ISO 9001 et AFNOR. La turbidité de nos sirops est supérieure à celle de l'eau en raison de la présence de particules de sucre en suspension dans l'eau qui contribuent à réfléchir la lumière.

10.1. Activité antibactérienne des sirops formulés

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des sirops formulés par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant et l'annexe 04:

Tableau 3-15: Résultats de l'activité antibactérienne des sirops formulés

Sirop	D.E.Coli(mm)	D.S.Aureus(mm)
Thymus.N (CMB)	12	10
Eucalyptus.G (CMB)	11	9
Thymus.N(DL50)	11	9
Eucalyptus.G(DL50)	10	6
Thymus.C (CMB)	11	6
Eucalyptus.C (CMB)	9	7
Thymus.N+		
Eucalyptus.G (CMB)	12	10
Thymus.C+		
Eucalyptus.C (CMB)	10	10
F.Thymus.N	/	19
F.Eucalyptus.G	/	13
T.Thymus.N	/	15
T.Eucalyptus.G	/	9

On remarque que l'activité antibactérienne des sirops se situe entre modérément et légèrement inhibitrice cela est déduit par la lecture des différents diamètres d'inhibition.

Les sirops d'HEs exercent un pouvoir antibactérien plus important vis-à-vis de la souche E. coli (Gram-) confronté à la souche de S.aureus (Gram+) cela est expliqué par la relation structure activité.

Concernant les sirops formulés à base de flavonoïdes et tanins le pouvoir antibactérien n'est perçu qu'avec la souche Gram négatif staphylococcus aureus, ceci est en relation avec la structure et la spécificité d'action des polyphénols vis-à-vis de la membrane cytoplasmique des souches bactériennes.

11. Activité anti-oxydante des extraits des deux plantes

L'activité anti-oxydante est évaluée par la mesure de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant de nos échantillons est comparé au pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique (antioxydant puissant).

Le potentiel anti-radicalaire est évalué par une méthode colorimétrique. A température ambiante la coloration violette de DPPH en présence d'une solution de l'acide ascorbique

disparaît, une coloration jaune surgit. Du point de vue chimique, cela est dû à la saturation des couches électroniques. Le tableau et le graphique suivant résument le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique avec la méthode de DPPH.

Tableau 3-16: Activité antioxydante de l'acide ascorbique

Acide	Paramètres	Solution mère	75%	50%	25%	12.5%
ascorbique (référence)	A_b	0.977	0.950	0.820	0.820	0.820
	A_e	0.039	0.038	0.135	0.182	0.500
	C (mg/mL)	1	0.75	0.50	0.250	0.125
	I(%)	96	96	83.53	77.80	39.02

A_b : absorbance du blanc ; A_e : absorbance de l'échantillon ; I (%) : pourcentage d'inhibition

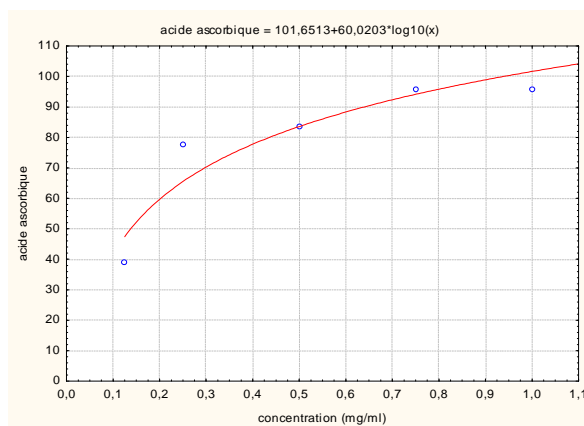


Figure 3-4: Activité antioxydante de l'acide ascorbique en fonction des dilutions réalisées

Le pourcentage d'inhibition provoqué par l'acide ascorbique pour la solution mère (96%, 1mg/mL) est très élevé, ce taux reste élevé pour toutes les dilutions réalisées.

Tableau 3- 17: Activité antioxydante des HEs extraites des deux plantes

Echantillon	Dilution (%)	[C] (mg/ml)	A_b	A_e	I(%)
HE Thymus N.	100	10	0.723	0.047	92
	75	7.5	0.652	0.067	89
	50	5	0.652	0.083	87
	25	2.5	0.866	0.210	75
	12.5	1.25	0.866	0.401	53
HE Eucalyptus G.	100	7.5	0.836	0.491	41
	75	5.62	0.649	0.416	35
	50	3.75	0.689	0.452	34
	25	1.875	0.689	0.452	34
	12.5	0.9375	0.739	0.624	15.5

La capacité de réduction (92%) du radical DPPH* l'HE de Thymus N. est élevée. Les pourcentages d'inhibitions trouvés pour les quatre dilutions réalisées restent élevés et confirment par conséquent la robustesse de cette huile dans la réduction des radicaux libres.

Pour l'HE d'Eucalyptus G. le pouvoir antioxydant pour la solution mère (41%, 0.75mg/mL) ne dépasse pas les 50%. Comparé à la capacité réductrice de l'acide ascorbique ou à celle de l'HE Thymus N. cette huile est faiblement antioxydante. Les graphes résumant les résultats sont donnés en annexe 05.

Tableau 3-18: Activité antioxydante des tanins des deux plantes

Echantillon	Dilution (%)	[C] (mg/mL)	A _b	A _e	I(%)
Tanins	100	10	0.836	0.030	96.41
Eucalyptus	75	7.5	0.836	0.038	95.45
Globulus	50	5	0.836	0.055	93.42
	25	2.5	0.836	0.108	87.08
	12.5	1.25	0.836	0.416	48.49
Tanins	100	10	0.703	0.068	90.24
Thymus	75	7.5	0.866	0.100	88.45
Nummularuis	50	5	0.866	0.150	82.67
	25	2.5	0.765	0.208	72.81
	12.5	1.25	0.765	0.220	71.24

La capacité de réduction du radical DPPH* par les tanins d'Eucalyptus G. (96.41%, 10mg/mL) est remarquable, elle dépasse la capacité de réduction de l'acide ascorbique. Ce pouvoir reste important pour toutes les dilutions. La même observation est faite pour les tanins de Thymus N. (les graphes des pouvoirs antioxydants en fonction des dilutions sont donnés en voir annexe05.

Tableau 3-19 : Activité antioxydante des flavonoïdes des deux plantes

Echantillon	Dilution (%)	[C] (mg/ml)	A _b	A _e	I(%)
Flavonoïdes	100	10	0.850	0.299	64.79
Eucalyptus	75	7.5	0.820	0.300	63.41
Globulus	50	5	0.820	0.387	52.80
	25	2.5	0.820	0.569	30.60
	12.5	1.25	0.820	0.610	25.60
Flavonoïdes	100	10	0.820	0.588	28.21
Thymus	75	7.5	0.818	0.772	5.62
Nummularuis	50	5	0.866	0.839	3.25
	25	2.5	0.866	0.839	1.84
	12.5	1.25	0.866	0.854	1.38

Le taux d'inhibition des flavonoïdes d'Eucalyptus G. pour la solution mère (67.79%, 10mg/mL) devance légèrement les 50%. Ce taux est considéré important et procure aux flavonoïdes d'Eucalyptus G. un pouvoir antioxydant marquant.

Au vue du taux d'inhibition des flavonoïdes de Thymus N. pour la solution mère (28.21%, 10mg/mL), le pouvoir antioxydant de ce composé est considéré faible. Les graphes récapitulants les résultats sont mis en annexe 05.

11.1. Index IC₅₀ des HEs extraites, des Flavonoïdes et de Tanins

L'index IC₅₀ ou concentration inhibitrice est définie comme étant la concentration de l'échantillon permettant de réduire l'activité du DPPH initiale de 50% après 30min d'action. Il est calculé graphiquement par régression linéaire des graphes tracés (figures en annexe05). Le tableau suivant regroupe les indices d'inhibition trouvés.

Tableau 3-20: Valeurs d'IC₅₀ des différents échantillons

Echantillons	IC ₅₀ (%)
HE.Thymus Nummularis	0.339
HE.Eucalyptus Globulus	1.307
Tanins Thymus Nummularis	0.330
Tanins Eucalyptus Globulus	0.177
Flavonoïdes Eucalyptus Globulus	0.716
Flavonoïdes Thymus Nummularis	2.996
Acide Ascorbique	0.155

En comparant les IC₅₀ trouvés des composés on remarque que les tanins de l'Eucalyptus G. et l'HE de Thymus N. ont une activité antioxydante remarquable, la concentration inhibitrice est proche de celle de l'acide ascorbique.

Les HEs des deux plantes ont une IC₅₀ notable ce qui leurs confèrent la qualité d'antioxydant puissant.

Concernant les flavonoïdes, on note que les flavonoïdes de Thymus N. ont l'activité antioxydante la plus faible avec une IC₅₀ estimé à 2.996. Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait que l'activité antioxydante d'un extrait dépend essentiellement de la nature des composés qu'il contient et de leur vulnérabilité au traitement qu'ils subissent lors d'un procédé d'extraction.

L'activité antioxydante des polyphénols est directement liée à la polarité des solvants d'extraction utilisés (méthanol). Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par (Hossain et al. (2013), Kang et al. (2003) et BOCHOUKA.E (2016) et confirment le lien étroit entre l'activité antioxydante et la polarité du solvant.

12. Formulation de pommades à base des polyphénols extraits

Les antioxydants incorporés comme principes actifs dans les pommades formulées procurent à ces dernières la propriété de la réduction des radicaux libre nocifs à la santé

Humaine. Les caractéristiques principales de ces pommades sont déterminées et comparées à celles recommandés par la pharmacopée européenne [37].

Tableau 3-21 : Caractéristiques des pommades formulées à base de polyphénols

Caractéristiques	Aspect	Viscosité	Ph
Pommade sans P.A	Pate blanche, pas de particules visibles à l'œil nu	2500	7.00
Pommade à base des flavonoïdes (Thym)	Pate blanche, pas particules visible à l'œil nu	2560	7.02
Pommade à base des Flavonoïdes(Eucalyptus)	Pate blanche, pas particules visible à l'œil nu	2560	7.03
Pommade à base des Tanins (Thym)	Pate blanche pas particules Visible à l'œil nu	2560	7.00
Pommade à base des Tanins (Eucalyptus)	Pate blanche pas particules visible à l'œil nu	2560	7.02
	Aspect (P.E)	Viscosité (AFNOR)	pH (P.E)
	Pate Pas de particule visible à l'œil	2000-3000	6.65 à7.02

L'aspect, le pH et la viscosité des pommades formulées à base d'extrait antioxydants sont conformes à ceux recommandés par la pharmacopée européenne [37] et la norme AFNOR.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ce travail est l'étude des bios activités des extraits de *Thymus Nummularis* et d'*Eucalyptus Globulus* appliqués à des formulations pharmaceutiques.

L'étude a commencé avec l'extraction par hydro distillation de type Clevenger des HEs de chacune des deux plantes. Les rendements de 1.5% pour le *Thymus N.* et 0.95% pour l'*Eucalyptus G.* sont obtenus pour une durée d'extraction de 3 heures. L'étude des caractéristiques physiques et organoleptiques des HEs extraites a mis en évidence leurs qualités par correspondance avec les données de la littérature. L'analyse par CG/SM a révélé la présence de 19 constituants dans la composition chimique de l'HE extraite d'*Eucalyptus*, le pourcentage du composé majoritaire (74.01%) correspond à l'Eucalyptol. Par ailleurs, 18 composés identifiés entrent dans la composition de l'HE extraite de *Thymus*. Le Thymol, composé majoritaire, est présent avec un pourcentage de 37,30%.

Puis la réalisation du screening phytochimique des deux plantes, les résultats révèlent une présence importante de flavonoïde, de tannin, et de terpénoides. D'un point de vue biologique, ces métabolites sont des composés potentiellement actifs rencontrés dans la plante.

L'extraction des polyphénols est réalisée par macération de la matière végétale, un rendement de 0.72% est obtenu pour les flavonoïdes d'eucalyptus et 0.54% pour les flavonoïdes de *Thymus*. La teneur en tanins est évaluée à 3.1% pour l'*Eucalyptus* et 1.7% pour le thymus. Ces résultats sont confirmés par l'analyse HPLC.

L'étude de l'activité antibactérienne par les méthodes de l'aromatogramme, la CMI et la CMB, a confirmé l'efficacité des HEs des deux plantes sur la bactérie Gram(-) par rapport à la bactérie Gram(+).

Les résultats de l'aromatogramme des flavonoïdes et tanins des deux plantes indiquent un pouvoir antibactérien positif uniquement vis-à-vis de *staphylococcus aureus G(+)*. Aucune inhibition des bactéries à Gram (-), *P. aeruginosa* et *E. coli*, n'a été enregistrée. Les bactéries à Gram (-) révèlent par conséquent une forte résistance vis-à-vis des polyphénols.

Les résultats obtenus pour le pouvoir antioxydant montrent que l'HE de *Thymus N.* est plus riche en antioxydant (92%) que l'HE d'*Eucalyptus G.* (41%).

Pour les polyphénols, le pouvoir antioxydant des tanins des deux plantes est très marqué, les valeurs de 94.41% pour l'Eucalyptus G. et 90% pour le Thymus N. sont enregistrées. Comparés aux tanins, les flavonoïdes présentent une activité antioxydante modérée avec des taux nettement inférieurs (67.79% pour Eucalyptus G. et 28.21% pour Thymus N.).

Les bios activités des extraits des deux plantes étant clairement mises en évidence, deux préparations pharmaceutiques (sirop et pommade) à base des substances extraites sont formulées et contrôlées, la qualité des deux formulations est appréciée et est conforme avec la norme et la pharmacopée.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne, et antifongique non seulement sur les extraits purs ou leurs composants majoritaire, mais également en mélange, permettant ainsi la mise en évidence d'une éventuelle synergie. Il serait intéressant :

- D'évaluer le pouvoir antibactérien sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité des HEs et des poly phénols extraits.
- D'étudier l'activité anti-inflammatoire et déterminer la DL50 de chaque extrait pour les exploités dans la formulation d'autres formes à usage thérapeutiques.

Références Bibliographique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] British Pharmacopoeia 2009.

[2] BPS14. Pharmacie galénique chapitre4/tom1- les formes pharmaceutique juin 2008

[3] Le Hir, Abrége, Pharmacie galénique, 6^e Edition, Edition Masson, Paris 1999.

[4] Farchid S. Cours 2^{ème} année master en pharmacie : Liquides oraux : solutions, sirops et suspensions. Ecole de pharmacie Genève- Lausanne

[5] <http://www.ordre.pharmacien.fr/content/download/307350/1558303/version/1/file/Guide-initiation-partie2.pdf>/ janvier 2016.

[6] Bruneton J, Pharmacognosie « Photochimie Plantes » médicinales 3^{ème} éd, Tec et Doc, Paris 1999.

[7] Teisseire P.J. Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 1991, 480p

[8] Chemloul F, Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Lavandula officinalis de la région de Tlemcen, thèse doctorat université Tlemcen Algérie, 2014.

[9] Laurent Julia, Conseils et Utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine, Université Paul Sabatier TOULOUSE III ; Thèse de Doctorat en pharmacie, 2017.

[10] <https://www.huile-et-sens.com/fr/content/92-huiles-essentiels-chemotype>.

[11] Paolini J, Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de Cistus : Eupatorium cannabinum subsp. Corsicum et Doronicum. Thèse de doctorat, université de corse pascal paoli, faculté des science et techniques, 2005.

- [12] Stéphane Caillet, Ph.D Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en science appliquées à l'alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier, 2015.
- [14] Mebarki, N., Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne, Magister en Genie des Procédés chimique et pharmaceutique, université de Boumerdes, 2010.
- [13] Desmier T, les antioxydants de nos jours : définition et applications, Doctorat en pharmacie, Université de Limoges 2016.
- [15] Morales, R. Synopsis of the genus Thymus L. in the Mediterranean area. Lagasalia, 1997.
- [16] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Yves DACOSTA (Ed). Paris 2003.
- [17] Argana A.A, Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capussa, Ziziphus mucropata, Sclerocarya birrea, Kirkia acuminata and Rhus lancea seeds. Animal Feed Science and Technology, 91:107-113.2001.
- [18] Stevanovic T., Perrin D Chimie du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes, Nancy, 2009.
- [19] Chang Q, Zuo Z, Chow M S S and Ho W K K. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (Crataegus pinnatifida var. major) fruits and a hawthorn drink. Food chemistry, 2006.
- [20] Chung K-t, Wei C-I. Are tannins a double-edged sword in biology and health? Trends in Food Science and Technology, 2001.
- [21] Fiorucci S. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 2006.
- [22] Milane H. La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat. Paris 2004.

- [23] Fernandez, X., La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation. 2017.
- [24] Guinoiseau, E., Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. Doctorat en biochimie-biologie moléculaire, université de corse, 2010.
- [25] Oloyede O.I, chemical profile of uripe puiip of carica papaya. PakistanJournal of Nutrition ; 4(6) :379-381, 2005.
- [26] S. Feknous, F. Saidi, R. Mohamed said, Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse. « Nature & Technologie ». A- Sciences fondamentales et Engineering, n° 11/Juin 2014.
- [27] S. Mahmoudi, M. Khali et N. Mahmoudi, Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut. « *Nature & Technologie* ». *B Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 09/ Juin 2013.
- [28] A. Bouguerra, Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de foeniculum vulgar. Magister en Sciences Alimentaires Option : biotechnologies alimentaire Université Mentouri Constantine, 2012.
- [29] F. Denis, M.-C.P., C. Martin, V. Cattoir, Bactériologie Médicale Techniques usuelles. 3 éd. 2016.
- [30] H. Boughendjioua, Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de citrus limon, cinnamomum zeylanicum et thymus numidicus. Doctorat en sciences spécialité: Biologie végétale. Université Badji Moktar, Annaba, 117: p. 125-130, 2014.
- [31] S. Nedjai,I, Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Master académique en science biologique option Ecologie microbienne, Université A. MIRA – Bejaia.2016/2017.
- [32] A.Tyagi, A. Malik, Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry* 126 228–235, (2011).

[33] Abdu Irahman Abdullah alwarthan, Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* 3: 43-53, 2009.

[34] Haddouchi, F.et al. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 2009.

[35] Moral. Liste des 29 huiles essentielles, avec les doses conseillées et les précautions d'emploi associées, élaborée par le sous-GP huiles essentielles Synadiet et validée par Dr MORAL, MARS 2018.

[36] Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques a l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 7^{ème} édition, 2014.

[37] pharmacopée européenne 2009.

Annexes

Annexe 01

Principe de CPG/SM

Lorsqu'on fait appel à ce genre d'analyse pour identification on distinguera plusieurs étapes :
 Ionisation : certaines molécules se volatilisent sous l'effet du vide et la haute température (200°C) donc il en résulte un mélange d'ions et cela à cause de la fragmentation des différents constituants. Accélération : les différentes ions se dirigent vers le séparateur et l'entourent sous l'effet d'un champ magnétique. Séparation : les ions seront distribués suivant le rapport masse/charge. Détection : un phénomène réalisé grâce à un détecteur sensible aux charges. Traitement du signal : l'appareil traduit le signal sous forme d'une représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction du rapport masse /charge.

Analyse des huiles essentielles de Thymus.N et Eucalyptus.G par CPG/SM

Le gaz vecteur est l'azote d'un débit de 0.3ml/min. La colonne utilisée est pour cette analyse est une colonne capillaire de type CP-Chirasil-Dex CB fused silica WCOT dont la longueur est de 25m et de 0.25mm de diamètre intérieur. Le gaz vecteur employé est bel et bien l'azote d'un débit de 0.3ml/min. L'épaisseur de la phase stationnaire est de 0.25µm. Le détecteur est de type FID dont la température est de 25°C. La température de la colonne est programmée comme suit : la température initial d'injection est de 70°C pendant 2.5min, puis s'élève par palier de 15°C/min à 240°C pendant 30min. L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification. Le temps de sortie de chaque pic appelé temps de rétention caractérise qualitativement la substance concernée. L'air limité par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé.

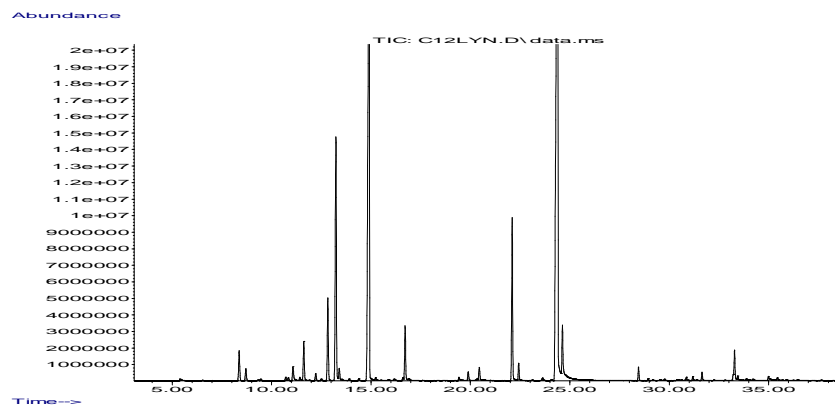
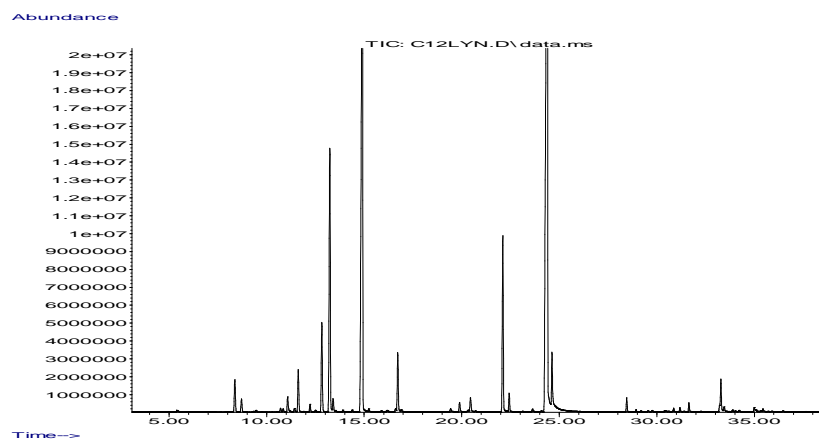
Tableau : Composition d'huile essentielle de Thymus Bieicherianus.

Pourcentage relatif (%)	Composé identifié
y-terpinène	1.24
Alpha-terpinène	3.99
Apha-ocimene	0.22
p-cymène	1.55
Carvacrol	2.48
Alpha-terpinolene	0.05
Alpha-cymene	8.65
Limonene	0.19
Eucalyptol	1.00
Sabinène	0.03
Linalol	0.09
Terpincienne	0.02
Béta-linalool	0.46
Borneol	0.86
Terpinène-4-ol	0.50

3-cyclohexene-1-carbinol	0.03
Isothymol methyl	0.01
Thymol	36.85
E-B-ocymène	1.35
Alpha-bisabolol	0.21
Alpha-Sinensal	0.01
Camphre	12.11
Alpha-Bisabolol	0.01
Bornéol	1.40
Myrtenol	0.05
Acétate de géranyle	0.01
Béta-bourbonéne	0.01
Béta-Elemene	0.05
Alpha-Grujunene	0.01
Aromadendréne	0.05
Béta-caryophilene	1.16
Eremophilene	0.40
Junipéne	0.09
Béta-himachaléne	0.06
Béta-caryophylléneoxy	0.56

Tableau : Pourcentages des composés identifiés par CPG/SM dans l'HE d'Eucalyptus G.

Composé identifié	Pourcentage relatif (%)
Alpha-pinéne	0.05 à 10%
Beta-pinéne	0.05 à 1.5%
Sabinéne	0.3%
Alpha-phallandréne	0.05 à 1.5%
Limonéne	0.05 à 15%
1,8-cinéole	70 à 90%
Camphre	Maximum 0.1%

Spectre de CPG/SM de l'huile essentielle de *Thymus Nummularis***Spectre de CPG/SM de l'huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus***

Annexe 02

Tableau : Listes des produits utilisés

Produit	Pureté	Fournisseur
• Méthanol	99.5%	SIGMA ALDRICH
• Ethanol	96%	SIGMA ALDRICH
• Ether de pétrole	95%	ORGANICS
• Chloroforme	99-99.4%	ORGANICS
• Ether di éthylique	99%	BIOCH
• n-butanol	99.9%	Chemopharma
• acide chloridrique	36-38%	ORGANICS
• hydroxyde de potassium	90%	ORGANICS
• hydroxyde d'ammonium	30%	ORGANICS
• acide acétique glacial	-	ORGANICS
• anhydride acétique	-	ORGANICS
• acide sulfurique	90%	SIGMA ALDRICH
• DMSO	-	SIGMA ALDRICH
• eau physiologique	-	ORGANICS
• Chlorure de Fer (III)	-	SIGMA ALDRICH
• Magnésium		ORGANICS
• Gélose MH		
• Saccharose		
• Oxyde de zinc		
• vaseline		
• Réactif de MAYER		
• Réactif de WAGNER		

Annexe 03

Tests photochimiques



Figure : Résultats des tests phytochimiques réalisé sur les deux plantes Thymus.N et Eucalyptus.G (tanins, flavonoïdes, anthraquinones, glycosides, terpénoides, stéroïdes).

Dosage des polyphénols totaux

Pour analyser les poly phénols et les flavonoïdes, 100 mg des feuilles d'Eucalyptus. G et de Thymus .N sèche ont été pesés et extraits avec 10ml d'une solution d'un mélange méthanol-eau (80 :20 V/V) de méthanol et d'éthanol, cette macération est réalisé pendant 24 heures. Un volume de 0.2ml d'extrait dilué 10 fois est ajouté à 1ml de la solution de Folin ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée. Après agitation 0.8ml de solution de NaCO₃ est ajouté à l'ensemble. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est lue à 765nm contre un blanc. Le taux des ployphénols sans nos échantillons a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique par milligramme d'extrait.

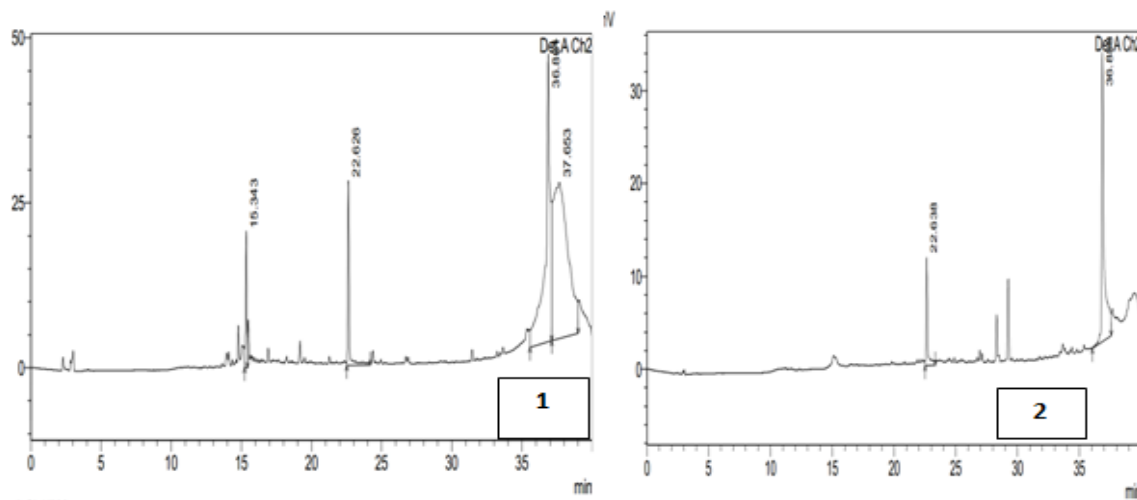
Chromatogrammes d'HPLC des Tanins et Flavonoïdes du Thymus.N et Eucalyptus.G

Figure : Chromatogramme des poly phénols (flavonoïdes et tanins) Thymus. N (spectre1) et Eucalyptus. G (spectre2).

Annexe04

Meuller-Hinton gélosé (M-H) : (g/l)

Infusion de viande de boeuf.....	02.0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon	01.5g
Agar.....	10g

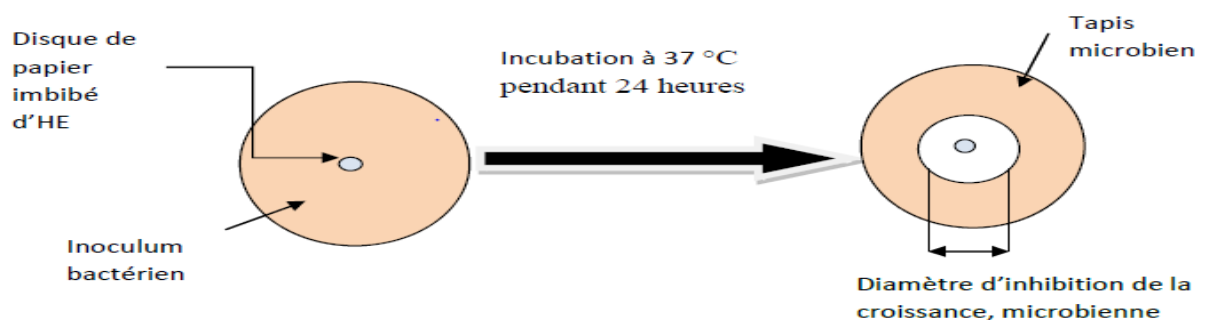
PH : 7.4

Souches microbiennes utilisées :

Escherichia coli : ou colibacille est un bacille à gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae mesurant 2 à 4 μm de long sur 0.4 à 0.6 μm de large. Elle est fine et allongée à extrémités arrondies, mobile. Elle pousse facilement sur les milieux ordinaires en 24h à 37 °C en aérobie et anaérobie, et se multiplie en milieu synthétique avec source de carbone simple comme le glucose. Sur milieu gélosé les colonies sont lisses, brillantes de structure homogène. E. coli possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. Elle fermente le glucose et le lactose avec une production de gaz.

Pseudomonas aeruginosa : ce sont des bacilles à gram négatif fines et longs (de 1 à 3 μm de long sur 0.5 à 1 μm de large), non fermentaires, ubiquitaires et saprophytes très répandues dans l'environnement. Anciennement appelé pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pigment de couleur bleu vert. Ce genre est facile à cultiver sur de nombreux milieux de culture en aérobie à 37°C. Les colonies larges, isolées, grandes, au centre bombé et à bord irrégulier, dégagent une odeur aromatique.

Staphylococcus aureus : S. aureus est une cocci à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1 μm de diamètre, ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase. S. aureus, espèce type du genre Staphylocoque.

Principe de la méthode de diffusion sur milieu solide

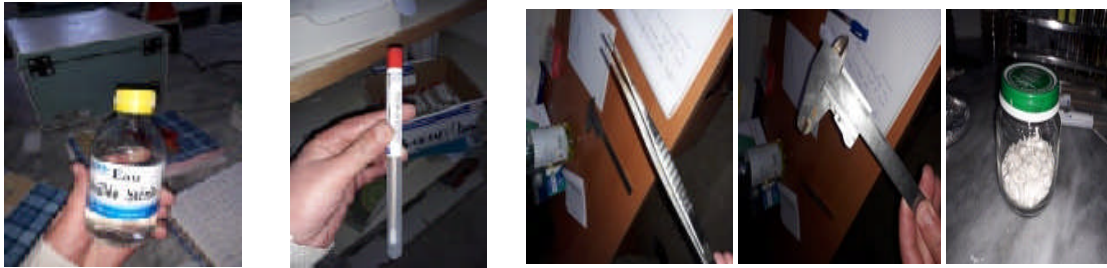


Figure : Matériaux utilisés pour la réalisation de l'étude antibactérienne (eau stérilisée, écouvillon, pince, pied à coulisse, papier wattman)



Figure : Les résultats de la CMI des huiles extraites, commerciales et polyphénols

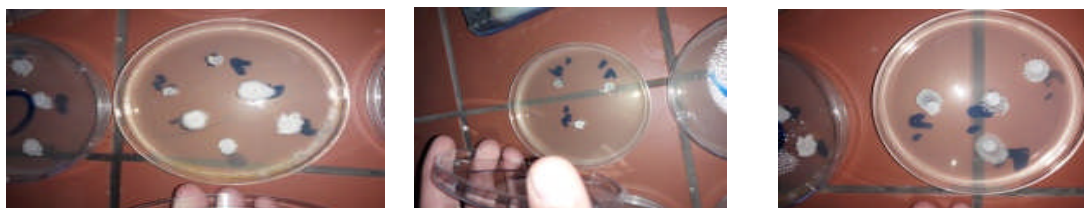


Figure : Les résultats de la CMB des huiles essentielles extraites et commerciales



Figure : Résultats de l'aromatogramme des sirops formulés

Annexe05

Préparation de la solution de DPPH

A l'aide d'une balance analytique ; 4 mg de DPPH en poudre ont été pesée ; solubilisés dans 100ml de méthanol. Cette solution subit des dilutions avec du méthanol jusqu'à avoir une absorbance de 0.6 à 0.9 à 517nm.

Tableau : Valeurs de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique pris comme référence

Acide ascorbique (référence)	Paramètres	Solution mère	75%	50%	25%	12.5%
	A_b	0.977	0.950	0.820	0.820	0.820
	A_e	0.039	0.038	0.135	0.182	0.500
	[C] (mg/ml)	1	0.75	0.50	0.250	0.125
	I(%)	96	96	83.53	77.80	39.02

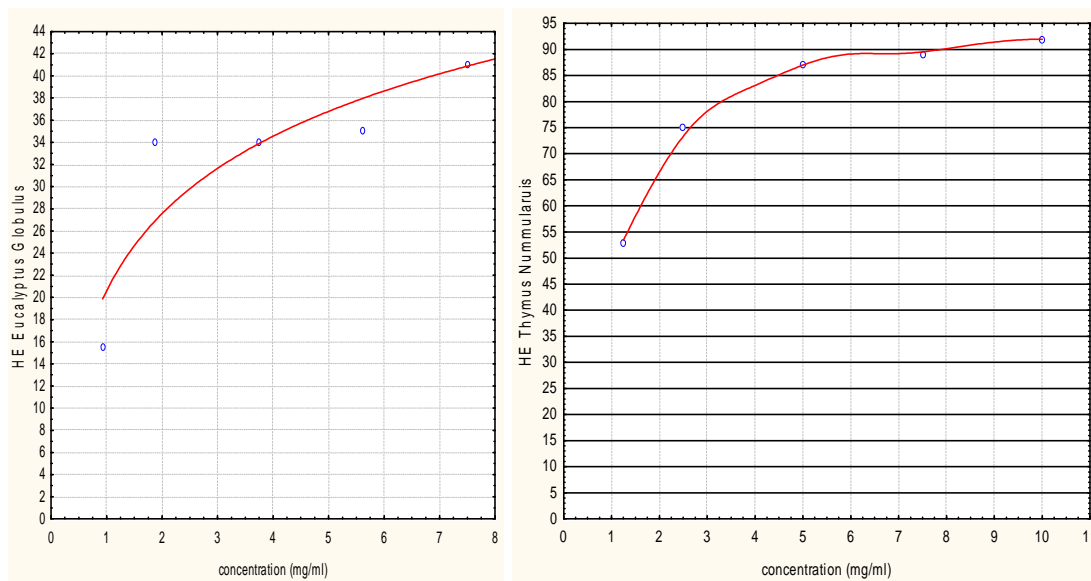


Figure : Pouvoir antioxydant en fonction des dilutions des huiles essentielles Thymus. N et Eucalyptus. G.

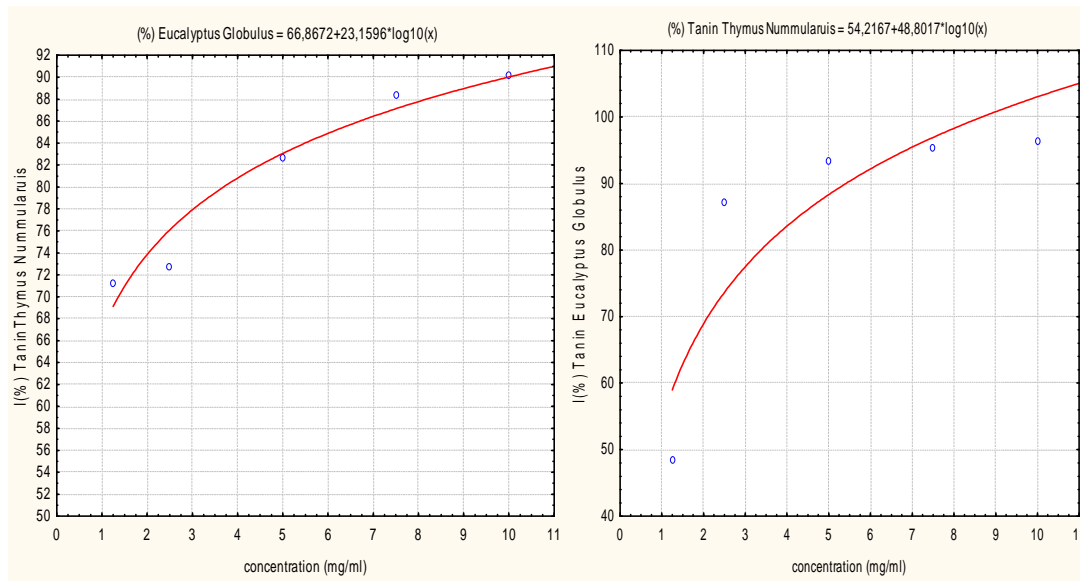


Figure : Activité antioxydante des tanins de l'Eucalyptus .G et Thymus .N.

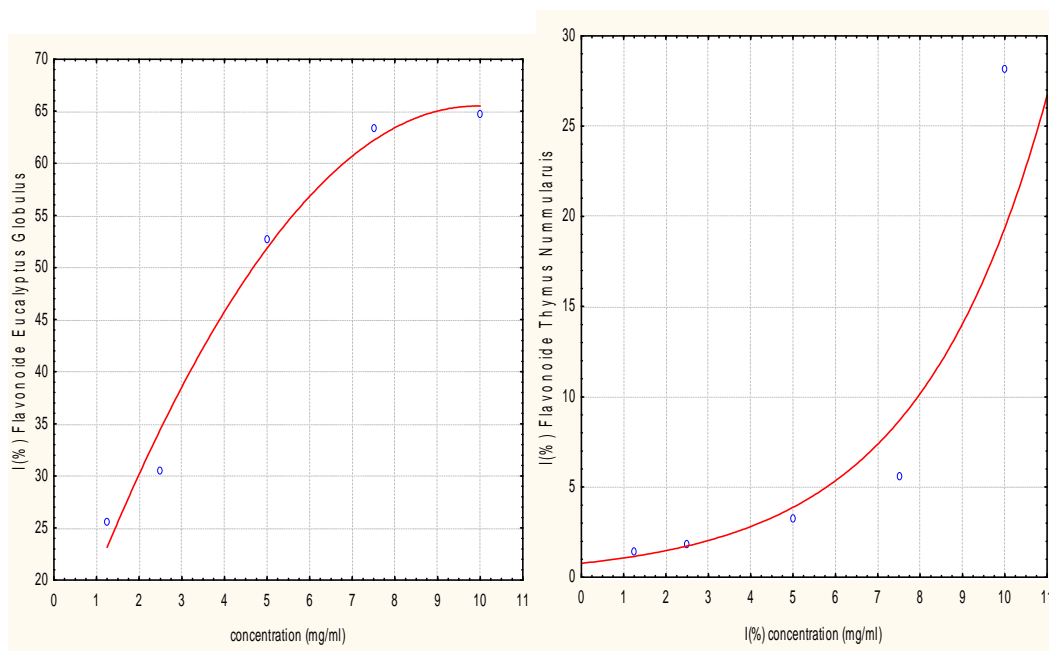


Figure : Activité antioxydante des flavonoïdes de Thymus. N et Eucalyptus. G.

Résumé :

L'objectif de ce travail est l'étude des bios activités des extraits de Thymus Nummularis et d'Eucalyptus Globulus appliqués à des formulations pharmaceutiques.

Les HEs sont extraites par hydro distillation type Clevenger, les rendements obtenus pour chaque plante sont appréciables. La composition des huiles est identifiée par CG/SM, leurs propriétés organoleptiques et leurs caractéristiques physico-chimiques sont déterminées. L'extraction des polyphénols (tanins et flavonoïdes) par macération donne un rendement de chaque composé conforme à celui décrit dans la littérature. La nature des composés des polyphénols est déterminée par une analyse HPLC.

Les bios activités des extraits (HEs et polyphénols) des deux plantes sont mises en évidence. La méthode de l'aromatogramme, CMI et CMB a montré le pouvoir antibactérien des extraits ; le pouvoir antioxydant est vérifié par la méthode du piégeage du radical DPPH.

Au vu des résultats obtenus, deux préparations pharmaceutiques (sirop et pommade) à base des substances extraites sont formulées et contrôlées, la qualité des deux formulations est examinée et est comparée aux critères fixés par la norme et la pharmacopée.

Mots clés : Extraction, métabolites secondaires, activité antibactérienne, activité antioxydant, formulation.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو دراسة أنشطة مستخلصات Thymus Nummularis و Eucalyptus Globulus المطبقة على المستحضرات الصيدلانية.

يتم استخراج HES عن طريق التقطير المائي Clevenger، والعوائد التي تم الحصول عليها لكل مصنع هي ملموسة. يتم تحديد تكوين الزيوت بواسطة MS /CPG ، ويتم تحديد خواصها الحسية والخصائص الفيزيائية والكيميائية. استخراج polyphénols عن طريق النقع يعطي عائداً لكل مركب وفقاً لما هو موصوف في الأدبيات. يتم تحديد طبيعة مركبات polyphénols عن طريق تحليل HPLC.

تم تسليط الضوء على الأنشطة الحيوية لمستخلصات (HEs و polyphénols) من النباتين، وأظهرت طريقة CMI و CMB قوة مضادة للجراثيم من مقتطفات. يتم التحقق من قوة مضادات الأكسدة عن طريق التنظيف الجذري DPPH. في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها، يتم صياغة والتحكم في المستحضرات الصيدلانية (شراب ومرهم) على أساس المواد المستخرجة، ويتم فحص جودة المستحضرين ومقارنتها بالمعايير التي حددها معيار دستور الأدوية.

الكلمات الأساسية : استخراج. الأيضات الثانوية، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضادات الأكسدة ، صياغة.

Abstract

The objective of this work is the study of the activities of extracts of Thymus Nummularis and Eucalyptus Globulus applied to pharmaceutical formulations.

The HE are extracted by Clevenger hydro distillation; the yields obtained for each plant are appreciable. The composition of the oils is identified by GC / MS, their organoleptic properties and physico-chemical characteristics are determined. The extraction of polyphenols (tannins and flavonoids) by maceration gives a yield of each compound in accordance with that described in the literature. The nature of the polyphenol compounds is determined by HPLC analysis.

The bio-activities of the extracts (HEs and polyphenols) of the two plants are highlighted. The aromatogram method, CMI and CMB showed the antibacterial power of the extracts; the antioxidant power is verified by the DPPH radical scavenging method.

Two pharmaceutical preparations (syrup and ointment) based on the extracted substances are formulated and controlled; the quality of the two formulations is examined and compared to the criteria set by the pharmacopoeia standard.

Key words: Extraction, secondary metabolites, antibacterial activity, antioxidant activity, formulation.