

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH –ALGER

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش -الجزائر-

DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Sciences Alimentaires

Thème

Etude phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *Teucrium polium* subsp *capitatum*, *Thymus algeriensis* et *Ammoides verticillata*

Présentée par : M. BENDJABEUR Salah

Jury :

Président : M. BENCHABANE A. Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Directeur de thèse : M. BITAM A. Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Co-directeur : M. HAZZIT M Professeur (E.N.S.A. El Harrach)

Examineurs : M. FERHAT M. A. Professeur (ENS Kouba)

M. AIT-OUAZZOU A. Maitre de conférences A (Univ. d'Alger 1)

Mme. DOUZANE M. Maitre de recherche A (INRA Alger)

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Louange à Allah le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience pour que je puisse réaliser ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à M. BITAM Arezki et M. HAZZIT Mohammed, professeurs à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) pour m'avoir accordé leur confiance en acceptant de diriger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à remercier M. BENCHABANE Ahmed, Professeur à l'ENSA, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande considération.

Mes sincères remerciements vont également à :

- M. FERHAT Mohamed El Amine, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba (Alger).
- M. AIT OUZZOU Abdennour Maître de conférences A à l'Université d'Alger 1.
- Mme. DOUZANE Malika, Maître de recherche A à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) d'Alger.

d'avoir accepté de faire partie du jury d'examen de cette thèse.

Ce travail n'aurait pas pu voir la lumière du jour sans l'aide précieuse des personnes suivantes :

- Dr. BENSOUICI Chawki, responsable de laboratoire de Biochimie, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine.
- Mme. MERDADI Amel, responsable de laboratoire de Microbiologie Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine.
- L'ensemble du personnel du département de technologie alimentaire et nutrition humaine.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et que j'ai peut-être omis de citer.

Figure 1 :	Structure chimique d'unité Isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène).....	6
Figure 2 :	Structure chimique de quelques composés d'huiles essentielles	9
Figure 3 :	Schéma biosynthèse des terpènes et des phénylpropanoïdes.....	11
Figure 4 :	Structure commune des acides phénoliques.....	14
Figure 5 :	Structure générique d'une molécule de flavonoïde	15
Figure 6 :	Voie métabolique possible des composés phénoliques.....	18
Figure 7 :	Schéma des principales voies de la biosynthèse des polyphénols.....	20
Figure 8 :	Feuilles et fleurs de <i>Teucrium polium</i> subsp <i>capitatum</i>	21
Figure 9 :	Feuilles et fleurs de <i>Thymus algeriensis</i>	26
Figure 10 :	Feuilles et fleurs d' <i>Ammoides verticillata</i>	31
Figure 11 :	Sources cellulaires de production des ERO	35
Figure 12 :	Stress oxydatif induit par les ERO.....	38
Figure 13 :	Effets de l'oxydation des lipides sur la qualité des aliments.....	42
Figure 14 :	Stabilisation par résonance du radical phénoxy.....	46
Figure 15 :	Hydrolyse de l'acétylcholine catalysée par l'acétylcholinestérase.....	49
Figure 16 :	Représentation schématique du site actif de l'AChE	50
Figure 17 :	Structure de quelques inhibiteurs réversibles	53
Figure 18 :	Structure de quelques inhibiteurs réversibles	56
Figure 19 :	Structure chimique générale des carbamates biologiquement actifs	56
Figure 20 :	Étapes de l'interaction d'une estérase avec un inhibiteur organophosphoré.....	57
Figure 21 :	Formule structurale générale des organophosphorés	57
Figure 22 :	Sites d'une bactérie dans lesquels des composés naturels sont actifs	63
Figure 23 :	Echantillons de plantes sèches utilisées dans l'extraction.....	69
Figure 24 :	Réaction entre le radical DPPH' et l'antioxydant pour former le DPPH stable	73
Figure 25 :	Formation de l'ABTS ⁺ par un oxydant persulfate de potassium	
Figure 26 :	Illustration de la méthode d'aromatogramme.....	82
Figure 27 :	Préparation d'inoculum microbien McFarland.....	83
Figure 28 :	Microdilution en bouillon pour le test antibactérien.....	83
Figure 29 :	Chromatogramme (agrandi) GC-MS de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> subsp <i>capitatum</i>	89

Figure 30 : Chromatogramme (agrandi) GC-MS de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i>	93
Figure 31 : Chromatogramme (agrandi) GC-MS de l'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	96
Figure 32 : Schéma de biosynthèse de carvacrol et de thymol.....	96
Figure 33 : Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait de <i>Teucrium polium</i> subsp <i>capitatum</i>	102
Figure 34 : Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait de <i>Thymus algeriensis</i>	103
Figure 35 : Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait d' <i>Ammoides verticillata</i>	105
Figure 36 : Activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) exprimée en pourcentages.....	107
Figure 37 : Activité d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE) exprimée en pourcentages.....	107
Figure 38 : Pouvoir de piégeage du radical DPPH exprimé en pourcentage d'inhibition (%)......	114
Figure 39 : Pouvoir de piégeage du radical ABTS exprimé en pourcentage d'inhibition (%)......	117
Figure 40 : Activité du piégeage du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) exprimée en % de réduction en formazan.....	119
Figure 41 : Pouvoir réducteur du fer exprimé en absorbance à 700nm.....	121
Figure 42 : Pouvoir réducteur cuivrique (CUPRAC) exprimé en absorbance à 450 nm.....	125
Figure 43 : Activité d'inhibition de blanchissement de β -carotène en exprimée en pourcentages.....	127
Figure 44 : Activité antihémolytique exprimée en % d'inhibition d'hémolyse induite par AAPH.....	131
Figure 45 : Photos montrant les zones d'inhibitions des souches testées (aromatogramme).....	141
Figure 46 : Représentation schématique de l'activité supposée du carvacrol.....	144

Tableau 1 :	Principales fonctions monoterpéniques des HEs.....	7
Tableau 2 :	Principales fonctions sesquiterpéniques des HEs.....	8
Tableau 3 :	Structure des squelettes des polyphénols.....	13
Tableau 4 :	Différentes classes de flavonoïdes et leurs sources alimentaires.....	16
Tableau 5 :	Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces non radicalaires.....	34
Tableau 6 :	Mécanismes d'oxydation des lipides.....	40
Tableau 7 :	Principaux groupes de composés de plantes avec leurs mécanismes antimicrobiens.....	61
Tableau 8 :	Données sur les composés étalons utilisés pour l'identification HPLC	72
Tableau 9 :	Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.....	81
Tableau 10 :	Composition chimique (%) de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> subsp <i>capitatum</i>	87
Tableau 11 :	Composition chimique (%) de l'huile essentielle de <i>Thymus algeriensis</i>	91
Tableau 12 :	Composition chimique (%) de l'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	95
Tableau 13 :	Rendement, teneur en composés phénoliques totaux (CPT) et en flavonoïdes totaux (FT).....	98
Tableau 14 :	Composition chimique (%) des extraits éthanoliques des plantes étudiées.....	101
Tableau 15 :	Effet inhibiteur des huiles essentielles et des extraits éthanoliques sur BChE et AChE exprimé en IC ₅₀ (µg / ml).....	106
Tableau 16 :	Activité antiradicalaire des huiles essentielles et des extraits éthanoliques exprimée en IC ₅₀ (µg / ml).....	113
Tableau 17 :	Pouvoir réducteur ferrique et cuivrique et pouvoir d'inhibition de blanchiment du β-carotène IC ₅₀ (µg/ml).....	122
Tableau 18 :	Effet inhibiteur des extraits éthanoliques vis-à-vis de l'hémolyse exprimé en IC ₅₀ (µg / ml).....	130
Tableau 19 :	Diamètres des zones d'inhibition (ZI en mm) et concentrations minimales inhibitrices (CMI en µg/ml) des huiles essentielles.....	135

- ABTS** : 2,2'-azino -bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)
- AAPH** : 2,2-azobis (2-méthylpropionamidine) dihydrochlorure de composé azoïque
- ACh** : Acétylcholine
- AChE** : Acétylcholinestérase
- AG** : Acides gras
- AGPI** : Acides gras polyinsaturés
- AGS** : Acides gras saturés
- ATCC** : American Type Culture Collection
- A. ver** : *Ammoides verticillata*
- BChE** : Butyrylcholinestérase
- BHA** : Butyl-Hydroxy-Anisole
- BHT** : Butyl-Hydroxy-Toluène
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CAT** : Catalase
- CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute
- CPT** : Composés phénoliques totaux
- CUPRAC** : Cupric ion reducing antioxidant capacity
- GPx** : Glutathion peroxydase
- DC** : Diènes conjugués
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- EAG** : Equivalent acide gallique
- EE** : Extrait éthanolique
- EQ** : Equivalent quercétine
- ERO** : Espèces réactives à l'oxygène
- FDA** : Food and Drug Administration
- Fig.** : Figure
- FT** : Flavonoïdes totaux
- GC-MS** : Gaz Chromatography-Mass Spectrometry
- GSH** : Glutathion réduit
- GSSG** : Glutathion oxydé
- HPLC-DAD-UV**: High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Ultra Violet
- HE** : Huile essentielle
- IC₅₀** : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux
-

MA : Maladie d'Alzheimer

MHA : Gélose *Mueller-Hinton*

MHB : Bouillon Mueller-Hinton

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

OP : Organophosphorés

PBS : Phosphate Buffer Saline

RI-MS : Retention index-Mass spectrometry

RI-MS-St : Retention index-Mass spectrometry-standard

SOD : Superoxyde dismutase

tr/mn : Tour par minute

TAG : Triacylglyceride

TBHQ : Tertiary-butyl-hydro-quinone

Trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

UFC : Unité Formant Colonie

¹O₂ : Oxygène singulet

³O₂ : Oxygène triplet

T. alg : *Thymus algeriensis*

T. pol : *Teucrium polium*

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales aromatiques (PMA) sont utilisées depuis l'antiquité comme conservateurs, colorants, exhausteurs de goût et aromatisants. De plus, ces plantes qui constituent depuis longtemps la base de la médecine traditionnelle dans le monde entier à diverses fins, notamment pour le traitement des maladies infectieuses, ont également fait l'objet d'études, en particulier dans les industries chimique, pharmaceutique et alimentaire, en raison de leur utilisation potentielle pour améliorer la santé. Elles sont devenues « produits industriels » avec de nouveaux concepts comme la phytothérapie, l'aromathérapie, les nutraceutiques, les cosméceutiques élargissant ainsi le champ de leur utilisation. Les nouvelles applications innovantes à valeur ajoutée incluent leur utilisation dans les aliments fonctionnels, l'élevage et la protection des plantes en agriculture (Baser et Demirci, 2007 ; Dhifi *et al.*, 2016).

Les composés actifs produits au cours du métabolisme végétal secondaire sont généralement responsables des propriétés biologiques de ces plantes (Silva et Fernandes Jr., 2010). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré comment ces substances agissent en tant qu'antioxydants, stimulants de la digestion et hypolipidémiants et montré leurs activités antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires et anti-cancérogènes. Ces effets physiologiques bénéfiques peuvent également avoir des applications préventives dans diverses pathologies (Viuda-Martos *et al.*, 2011).

Par conséquent, l'exploration de nouvelles substances biologiquement actives de plantes est au centre des recherches sur les plantes médicinales. En effet, ces dernières années, le rôle de certains métabolites secondaires comme les composés phénoliques en tant que constituants alimentaires protecteurs est devenu un domaine de plus en plus important de la recherche sur la nutrition humaine. Contrairement aux vitamines, ils ne sont pas essentiels au bien-être à court terme, mais il est de plus en plus évident que des apports modestes à long terme peuvent avoir des effets favorables sur l'incidence des cancers et de nombreuses maladies chroniques, qui se produisent de plus en plus fréquemment dans les populations méditerranéennes, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, du fait de leurs propriétés antioxydantes ayant un rôle protecteur contre le phénomène de stress oxydatif résultant des espèces radicalaires oxygénés à l'origine de ces maladies (Crozier *et al.*, 2006 ; Shahidi et Zhong, 2010a).

De plus, l'attraction des plantes médicinales et aromatiques ne cesse de croître en raison de la demande croissante des consommateurs et de leur intérêt pour ces plantes pour des

applications culinaires, médicinales et anthropiques. À mesure que les consommateurs sont de plus en plus informés sur les questions relatives aux aliments, à la santé et à la nutrition, ils prennent également conscience des dangers liés aux conservateurs chimiques utilisés par les industriels alimentaires. En effet, des rapports récents ont révélé que les antioxydants synthétiques tels que le butyl-hydroxy-anisole (BHA), butyl-hydroxy-toluène (BHT) et la tertiary-butyl-hydro-quinone (TBHQ) largement utilisés dans l'industrie alimentaire comme inhibiteurs potentiels de l'oxydation des lipides, peuvent être impliqués dans beaucoup de risques de santé, y compris les lésions du foie, le cancer et la carcinogénèse (Ito et Hirose, 1987 ; Chen et al., 1992 ; Williams et al., 1999).

La recherche de substances biologiquement actives a notamment encouragé l'utilisation d'huiles essentielles et de substances volatiles comme antimicrobiens et antioxydants dans les aliments et produits alimentaires. Le fait que les huiles essentielles et les substances volatiles allient leur capacité aromatisante à : (a) être naturelles et biodégradables ; (b) ayant généralement une faible toxicité pour les mammifères ; et (c) être capable de remplir simultanément la fonction de plus d'un de leurs équivalents synthétiques, y ont tous contribué. En outre, les huiles essentielles peuvent être utilisées pour la protection des cultures et contre les insectes nuisibles et les invasions, avec l'avantage de ne pas s'accumuler dans l'environnement et d'exercer une vaste gamme d'activités, ce qui réduit le risque de développement de souches pathogènes résistantes (Figueiredo et al., 2008).

L'Algérie de par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques et qui restent très peu explorée, autant d'un point de vue phytochimique que d'un point de vue pharmacologique (Hanifi, 1991). Parmi ces ressources naturelles, *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut., *Teucrium polium* subsp *capitatum* (Lamiaceae) et *Ammoides verticillata* (Apiaceae) sont trois plantes auxquelles les populations locales attribuent certaines propriétés médicinales. Elles sont utilisées pour traiter différents états pathologiques tels que les troubles gastro-intestinaux, les inflammations des maladies respiratoires, le diabète et les rhumatismes (Laouer et al., 2003 ; Giordiani et al., 2009 ; Bahramikia et al., 2012 ; Giweli et al., 2013) .

La plupart des études précédentes portant sur ces plantes étaient axées sur les composés volatiles, tandis que les autres composants bioactifs et leurs effets biologiques n'étaient pas encore complètement étudiés, notamment leur activité anti-cholinestérasique.

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous avons voulu à travers cette thèse d'explorer les propriétés biologiques des huiles essentielles (HE) et des extraits éthanoliques (EE) des trois plantes suscitées, afin d'exploiter leur potentiel comme conservateurs naturels. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes méthodes d'évaluation *in vitro*.

Le présent document comporte 2 grandes parties : théorique et expérimentale. La partie théorique concerne une synthèse bibliographique comportant un rappel sur les métabolites secondaires des plantes et l'intérêt thérapeutique de leurs biomolécules, leur description et ses activités biologiques. Cette partie sera répartie en 4 chapitres :

I. Les métabolites secondaires des plantes médicinales et aromatiques

Ce chapitre décrira les métabolites secondaires des plantes médicinales et aromatiques principalement les terpènes, polyphénols et phénylopropanoïdes, leur structure, classification, propriétés ainsi que leur métabolisme.

II. Monographie des espèces étudiées

Ce chapitre consistera en une description des caractéristiques botaniques et de la taxonomie des plantes étudiées, leur habitat et répartition géographique, leur phytochimie ainsi que leur toxicité.

III. Radicaux libres et antioxydants

Ce chapitre s'intéressera à la biochimie des radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène et leur rôle dans les réactions radicalaires ainsi que les systèmes antioxydants.

IV. Anticholinestérases et antimicrobiens

Ce chapitre abordera les inhibiteurs de cholinestérases, enzymes impliquées dans la maladie d'Alzheimer, et les agents antimicrobiens, leur mécanisme d'action, et les principales classes de composés dérivés de plantes.

La partie expérimentale consistera en 2 chapitres : le premier décrira la méthodologie suivie pour l'extraction des huiles essentielles et des extraits non volatiles, les dosages spectrophotométriques, les tests d'activité anticholinestérase, antioxydante, antihémolytique antimicrobienne ainsi que pour l'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC-DAD). Le deuxième chapitre sera consacré à la présentation et à la discussion des résultats.

Enfin, à l'issue de ce travail, une conclusion générale est dégagée.

Partie I :
Etude
Théorique

Chapitre I :

Métabolites secondaires des plantes médicinales et aromatiques

1. Généralités sur les métabolites secondaires des plantes

Dans la nature, deux principaux groupes de métabolites peuvent être trouvés : les métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des composés universels présents dans tous les organismes vivants. Ils comprennent les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques. Les métabolites secondaires ne se trouvent que chez certaines espèces. Les plantes médicinales aromatiques sont des plantes ayant des caractéristiques aromatiques ainsi que des propriétés médicinales et sont «des mines d'or chimiques» en raison de la diversité des métabolites secondaires qu'ils possèdent et le large éventail d'activités pharmacologiques qu'elles montrent (Bakkali *et al.*, 2008). Les substances volatiles, qui sont principalement des substances terpénoïdes (mono-, sesqui- et di-terpènes), font partie des composés les plus précieux de métabolites secondaires produits par les plantes, aux côtés des alcaloïdes et des substances phénoliques dont certaines sont également volatiles, comme les phénylpropanoïdes appelés aussi shikimates qui procurent une odeur et une saveur spécifiques aux plantes (Harborne, 1999 ; Sangwan *et al.*, 2001 ; Figueiredo *et al.*, 2008 ; Sell, 2010).

2. Huiles essentielles

2.1. Utilisation historique et actuelle des huiles essentielles

On sait que les herbes et les épices furent utilisés pour leurs propriétés de conservation, d'arôme et de saveur depuis l'Antiquité. Cependant, ce sont les historiens grecs et romains qui documentèrent pour la première fois l'utilisation des HE pour le traitement médical et l'aromathérapie. Au XIII^e siècle, les effets pharmacologiques des HE ont été décrits dans de nombreuses pharmacopées de l'époque, mais leur utilisation n'a été largement répandue qu'au XVI^e siècle (Burt, 2004 ; Bauer *et al.*, 2008). On pense qu'en 1881, De La Croix, fut la première personne à effectuer une analyse antimicrobienne des vapeurs d'HE. Les utilisations les plus courantes des huiles essentielles aujourd'hui comprennent les aromatisants dans les aliments et les essences dans les parfums et les produits pharmaceutiques, et ceci pour leurs propriétés fonctionnelles (Weiss, 1997, Bauer *et al.*, 2008). Une variété de produits disponibles dans le commerce exploitent les propriétés antibactériennes des HE, comme les antiseptiques et les aliments pour suppléments animaux (Cox *et al.*, 2000, Windisch *et al.*, 2008).

2.2. Définition

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la

plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (Bruneton, 1993 ; AFNOR, 2000).

2.3. Localisation dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être trouvées dans divers organes de la plante (fleurs, fruits, graines, feuilles, tiges et racines) étant produites et stockées dans des structures sécrétoires qui diffèrent par la morphologie, la structure, la fonction et la distribution. Ces structures spécialisées minimisent le risque d'autotoxicité et peuvent se trouver à la surface des organes ou dans les tissus de la plante, en tant que structures de sécrétion externe ou interne respectivement. Les structures de sécrétion internes comprennent les cellules de sécrétion (souvent des idioblastes), les cavités sécrétoires et les canaux sécréteurs, tandis que les canaux externes comprennent les trichomes glandulaires, les cellules épidermiques et les osmophores (Svoboda et Svoboda, 2000).

2.4. Caractéristiques physiques et organoleptiques

En général, la plupart des HE sont des liquides incolores, lucides et mobiles à la température ambiante. Cependant, tout le spectre de couleurs des HE varie du jaune au brun foncé avec toutes les échelles de couleurs intermédiaires, à l'exception de la camomille (romaine) dont l'HE apparaissant de couleur bleu-violet caractéristique en raison de la présence de chamazulène généré lors de la distillation à la vapeur. Ces couleurs sont utilisées sélectivement dans les parfums en tant que toners. De plus, des solides tels que des cristaux (par exemple des stéaroptènes) se retrouvent dans les HE de roses, de camomilles et de certaines espèces d'eucalyptus. L'odeur typique des HE dépend des organes, des espèces et de l'origine des plantes. Contrairement aux huiles végétales, les HE sont des huiles volatiles présentant un indice de réfraction élevé et une rotation optimale résultant de nombreux composés asymétriques. La densité relative des HE est généralement inférieure à celle de l'eau alors qu'il existe plusieurs exceptions. Les HE sont généralement reconnus hydrophobes mais elles sont en grande partie solubles dans les graisses, les alcools et la plupart des solvants organiques. En outre, elles ont la sensibilité d'être oxydées pour former des produits résineux par polymérisation (Li et al., 2014).

2.5. Composition chimique

Les huiles essentielles sont constituées de composés organiques volatils, généralement de bas poids moléculaire inférieur à 300. Ces composés volatiles appartiennent à différentes

classes chimiques : alcools, éthers ou oxydes, aldéhydes, cétones, esters, amines, amides, phénols, hétérocycles et principalement les terpènes. Les alcools, les aldéhydes et les cétones offrent une grande variété de notes aromatiques, telles que les notes fruitées ((E) -nerolénol), florales (Linalol), d'agrumes (Limonène), à base de plantes (γ -sélinène), etc. (Yi *et al.*, 2014 ; Dhifi *et al.*, 2016).

Généralement, les composants principaux déterminant les propriétés biologiques des huiles essentielles, comprennent deux groupes d'origine biosynthétique distincte. Le groupe principal est composé de terpènes et l'autre de constituants aromatiques et aliphatiques, tous caractérisés par un faible poids moléculaire (voir Fig. 2). De plus, d'autres composés présents dans les huiles essentielles tels que les diterpènes, les constituants contenant du soufre et de l'azote et les lactones sont également mentionnés (Croteau *et al.*, 2000 ; Bowles, 2003; Pichersky *et al.*, 2006 ; Baser et Demirci, 2007 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015).

2.5.1. Terpènes

Les terpènes sont les principaux constituants des huiles essentielles. Chimiquement, ce sont principalement des hydrocarbures insaturés cycliques, à des degrés variables d'oxygénation (alcoolique, cétonique, etc.) dans les groupes substituants liés au squelette carboné basique (Harborne, 1989, Ashour *et al.*, 2010 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015). Des milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont jusqu'à présent été identifiés dans les huiles essentielles, tels que les dérivés fonctionnalisés des alcools (géranol, α -bisabolol), des cétones (menthone, p-vétivone) et des aldéhydes (citronellal, sinensal), les esters (acétate de γ -tépinyle, acétate de cédryle) et les phénols (thymol) (Dhifi *et al.*, 2016). Ils sont classés en différentes classes structurelles et fonctionnelles. En fonction du nombre d'unités isoprène (voir Fig. 1) dans leur structure, les terpènes peuvent être classés en hémiterpènes (1 unité), monoterpènes (2 unités), sesquiterpènes (3 unités), diterpènes (4 unités), et ainsi de suite. Les terpènes que l'on trouve le plus souvent dans les huiles essentielles sont les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (Hanson, 2003 ; Baser et Demirci, 2007 ; Bakkali *et al.*, 2008 ; Ashour *et al.*, 2010 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015).

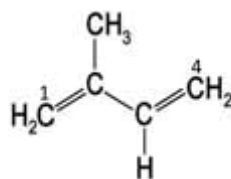


Figure 1. Structure d'unité Isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène)

2.5.1. 1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont formés par le couplage de deux unités d'isoprène (C₁₀). Ce sont les molécules les plus représentatives, constituant 90% des huiles essentielles et permettant une grande variété de structures. Ils comportent plusieurs fonctions (Tableau 1) (Hanson, 2003 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Principales fonctions monoterpéniques des HEs (adapté de Bakkali *et al.*, 2008)

Fonction	Type de cycle	Exemple de composé
Carbures	Acyclique	myrcène, ocimène, etc.
	Monocyclique	terpinènes, p-cimène, phellandrènes, etc
	Bicycliques	pinènes, -3-carène, camphène, sabinène, etc.
Alcools	Acycliques	géraniol, linalol, citronellol, lavandulol, Nérol, etc.
	Monocyclique	menthol, a-terpinéol, carvéol
	Bicyclique	bornéol, fenchol, chrysanthénol, thuyan-3-ol, etc.
Aldéhydes	Acyclique	géraniol, néral, citronellal, etc.
Cétone	Acyclique	tegetone, etc.
	Monocyclique	menthones, carvone, pulegone, pipéritone, etc.
	Bicycliques	camphre, fenchone, thuyone, ombellulone, pinocamphone, pinocarvone, etc.
Esters	Acyclique	acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle, etc.
	Monocyclique	acétate de menthyle ou d'a-terpinyle, etc.
	Bicyclique	acétate d'isobornyle, etc.
Ethers		1,8-cinéole, menthofurane, etc.
Peroxydes		ascaridole, etc.
Phénols		thymol, carvacrol, etc.

2.5.1. 2. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont formés à partir de l'assemblage de trois unités d'isoprène (C₁₅). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations, ce qui permet une grande variété de structures. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont similaires à celles des monoterpènes (Tableau 2) (Hanson, 2003 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Principales fonctions sesquiterpéniques des HEs (d'après [Bakkali et al., 2008](#))

Fonction	Exemple de composés
Carbures	azulène, b-bisabolène, cadinènes, b-caryophyllène, logifolene, curcumenes, elemenes, farnesenes, zingiberene, etc.
Alcools	bisabol, cédrool, b-nérolidol, farnésol, carotol, b-santalol, patchoulol, viridiflorol, etc.
Cétones	germacrone, nootkatone, cis-longipinane-2,7-dione, b-vetinone, turmerones, etc.
Époxyde	oxyde de caryophyllène, époxydes d'humulène, etc.

Des exemples de plantes contenant ces composés sont l'angélique, le bergamote, le cumin, le céleri, le citronnelle, le coriandre, l'eucalyptus, le géranium, le genévrier, le lavandin, la lavande, le citron, la mandarine, la menthe, l'orange, la menthe poivrée, le petit-grain, le pin, le romarin, la sauge, le thym ([Bakkali et al., 2008](#)).

2.5.2. Composés aromatiques ou phénylpropanoïdes

Les huiles essentielles contiennent également des composés aromatiques non terpéniques très fréquents biogénérés par la voie des phénylpropanoïdes, tels que l'eugénol, le cinnamaldéhyde et le safrole. En outre, certaines huiles essentielles peuvent également contenir des acides gras et leurs esters et, plus rarement, des dérivés de l'azote et du soufre ([Baser et Demirci 2007](#) ; [Bakkali et al., 2008](#) ; [Dhifi et al., 2016](#)).

Les composés aromatiques comprennent : aldéhyde (cinnamaldéhyde), alcool (alcool cannelle), phénols (chavicol, eugénol), dérivés méthoxy (anéthole, élémicine, estragole, méthyleugénols), composés de méthylène dioxy (apiole, myristicine, safrole). Les principales sources végétales de ces composés sont l'anis, la cannelle, le girofle, le fenouil, la muscade, le persil, le saffran, l'anis étoilé, l'estrragon et certaines familles botaniques (Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae) ([Bakkali et al., 2008](#)).

Les composants azotés ou sulfurés tels que les glucosinolates ou les dérivés d'isothiocyanate (huiles d'ail et de moutarde) sont également caractéristiques en tant que métabolites secondaires de diverses plantes ou de produits torréfiés, grillés ou grillés... ([Baser et Demirci 2007](#)).

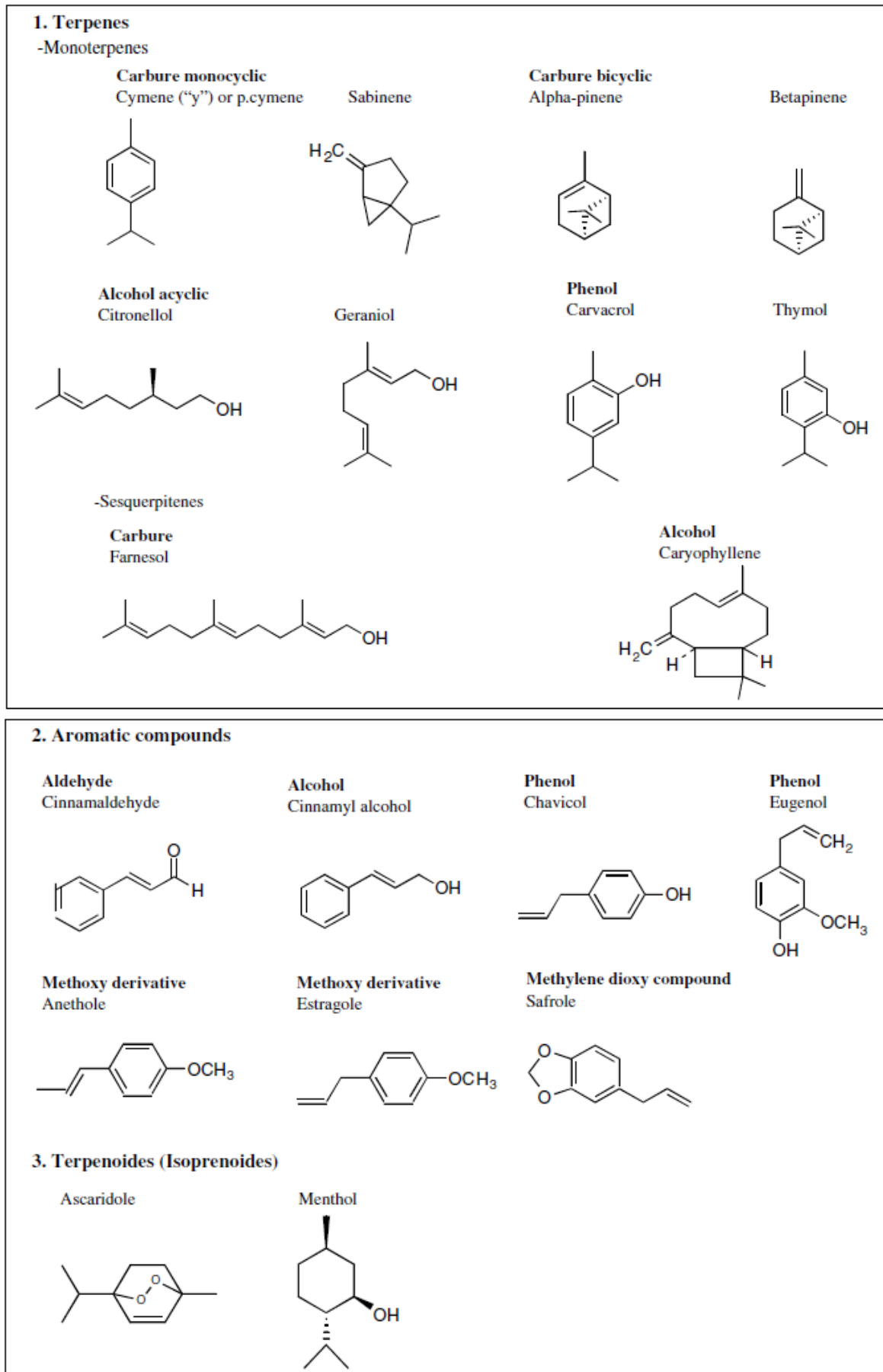


Figure 2. Structure chimique de quelques composés d'huiles essentielles

2.6. Biosynthèse des huiles essentielles

2.6.1. Terpènes

La voie de base de la biosynthèse des terpénoïdes volatils est traitée convenablement en trois phases: (1) formation des unités C5 de base, (2) condensation de deux ou trois unités C5 pour former des prényl diphosphates en C10, C15 ou C20, et (3) conversion des prényl diphosphates résultants aux produits finis (Dudareva *et al.*, 2004). La formation d'unités basiques C5, d'isopentényl diphosphate (IPP) et de diméthylallyldiphosphate (DMAPP) se fait par deux voies alternatives : la voie cytosolique du mévalonate (MVA) conduisant à la formation de la plupart des sesquiterpènes ou par la voie plastidique du non-mévalonate produisant principalement les monoterpènes et diterpènes (voir Fig. 3). Dans la voie du mévalonate, l'isopentényl diphosphate (IPP) est formée par l'acide mévalonique qui résulte de la condensation de 3 fractions d'acétylcoenzyme-A. Dans la voie non mévalonate, le 2 C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) et le 1-désoxy-xylulose-5-phosphate (DOXP) sont impliqués, résultant de la condensation du glycéraldéhyde phosphate et du pyruvate (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouwmeester, 2006 ; Ashour *et al.*, 2010 ; Dudareva *et al.*, 2013 ; Tholl, 2015). Dans la deuxième phase de la biosynthèse des terpènes, IPP et DMAPP se condensent pour former le géranyl diphosphate (GPP), le farnésyl diphosphate (FPP) et le géranylgéranyl diphosphate, précurseurs des monoterpènes, des sesquiterpènes et des diterpènes, respectivement. Ces réactions sont catalysées par des prényltransférases à chaîne courte. La troisième phase de la biosynthèse des terpènes implique la conversion des divers prényl diphosphates DMAPP (C5), GPP (C10), FPP (C15) et géranylgéranyl diphosphate (C20) en hémiterpènes (isoprène et 2-méthyl-3-butène. -2-ol), monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes, respectivement. Ces réactions, réalisées par une grande famille d'enzymes connues sous le nom de terpènes synthases (TPS) (Croteau *et al.*, 2000 ; Aharoni *et al.*, 2005 ; Pichersky *et al.*, 2006 ; Schwab *et al.*, 2008 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015 ; Rehman *et al.*, 2015).

2.6.2. Phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés par la voie de l'acide shikimique, leurs principaux précurseurs étant l'acide cinnamique et l'acide p-hydroxycinnamique, provenant respectivement des acides aminés aromatiques : phénylalanine et tyrosine (Sangwan *et al.*, 2001). L'acide shikimique est synthétisé à partir d'érythrose 4-phosphate et de phosphoénolpyruvate. L'élimination de l'un des alcools cycliques de l'acide shikimique et sa réaction avec le pyrolate de phosphoénol donnent l'acide chorismique. Ce composé forme le squelette de l'acide phénylpropionique. L'amination et la réduction de la fonction cétone produisent l'acide aminé

phénylalanine, tandis que la réduction et l'élimination conduisent à l'acide cinnamique qui produit les acides o et p-coumariques. De plus, l'aromatization de l'acide shikimique donne des dérivés de l'acide benzoïque, présents dans plusieurs huiles essentielles (Sell, 2010).

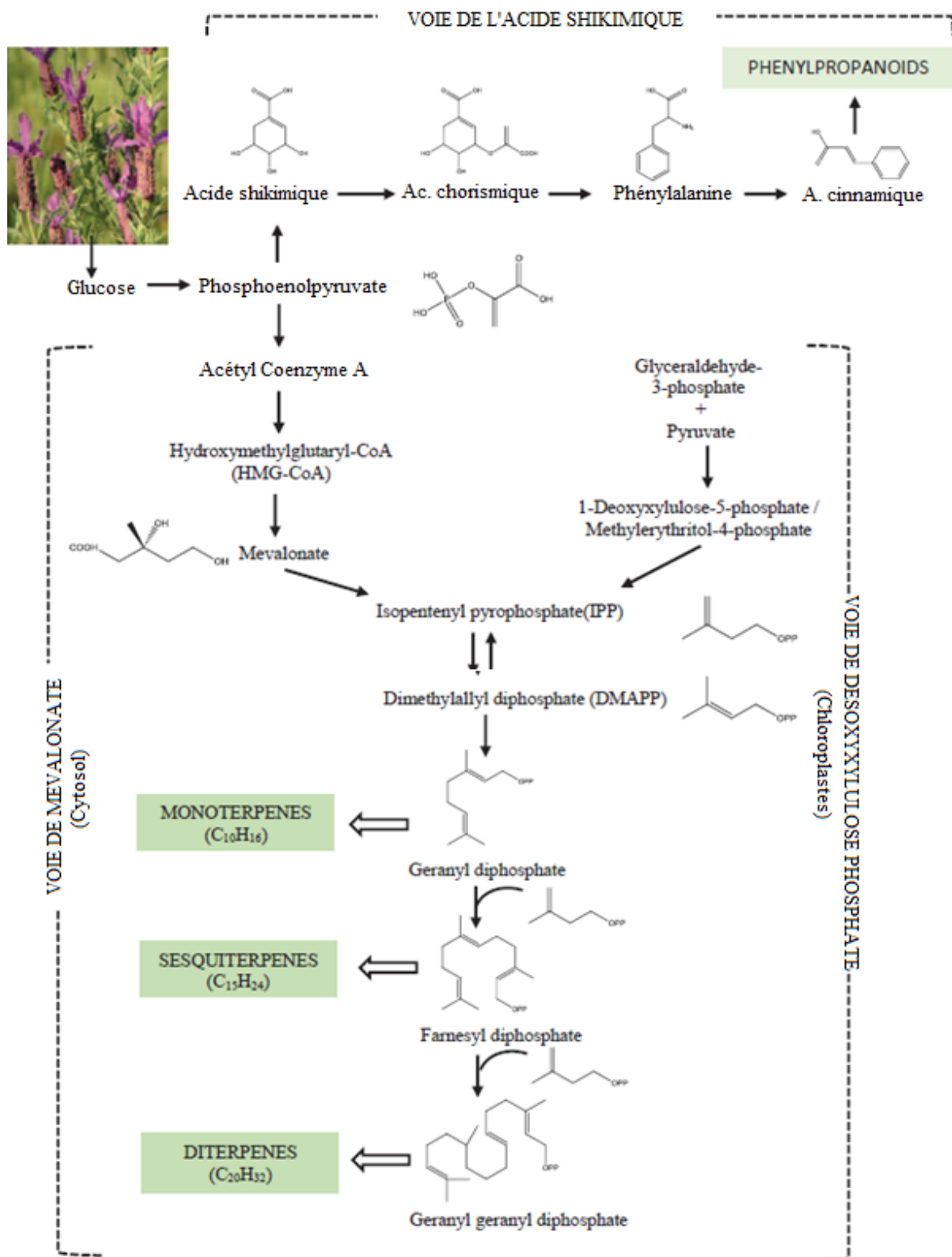


Figure 3. Biosynthèse des terpènes et des phénylpropanoïdes (Zuzarte et Salgueiro, 2015)

3. Composés phénoliques

3.1. Définition et structure

Les composés phénoliques sont des structures aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyle. La plupart sont des polyphénols, comportant plusieurs substituants de groupe hydroxyle, dont un ou plusieurs peuvent être substitués par des groupes méthyle ou glycosyle (Harborne, 1989 ; Harborne, 1999).


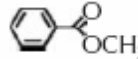
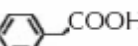
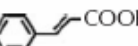
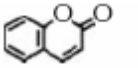
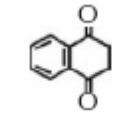
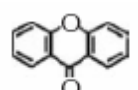
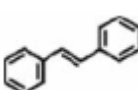
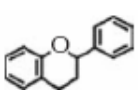
Les composés phénoliques vont des composés simples tels que le phénol lui-même et l'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) en passant par les pigments anthocyaniques complexes jusqu'aux tannins polymères condensés dont le poids moléculaire peut atteindre 30 000 (Bravo, 1998 ; Harborne, 1999). Ils sont généralement associés aux sucres et aux acides organiques (Crozier *et al.*, 2006 ; Crozier *et al.*, 2009).

Les sucres associés peuvent être présents sous forme de monosaccharides, de disaccharides ou même d'oligosaccharides. Le glucose est le résidu de sucre le plus courant, bien que l'on trouve également du galactose, du rhamnose, du xylose et de l'arabinose, ainsi que des acides glucuroniques et galacturoniques et de nombreux autres. Les associations avec d'autres composés, tels que les acides carboxyliques et organiques, les amines et les lipides, ainsi que des liaisons avec d'autres phénols sont également courantes (Bravo, 1998).

3.2. Classification et occurrence

Les polyphénols peuvent être classés en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone (Tableau 3) (Crozier *et al.*, 2006 ; Crozier *et al.*, 2009). Les composés phénoliques que l'on trouve couramment dans les aliments et les produits de santé naturels peuvent être classés en phénols simples, dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique, flavonoïdes, stilbènes, lignanes, tannins hydrolysables et condensés (King *et Young*, 1999 ; Shahidi *et Ho*, 2005).

Tableau 3 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide Hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxy-cinamiques	Acide Coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

3.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques comprennent les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (voir Fig. 4). Les 2 principaux acides hydroxybenzoïques alimentaires sont l'acide ellagique et l'acide gallique, qui se présentent généralement sous la forme de tanins hydrolysables et se trouvent principalement dans les baies et les noix. Les principaux acides hydroxycinnamiques alimentaires, l'acide caféique et l'acide férulique, sont sensibles à la chaleur (Dimberg *et al.*, 1996). L'acide caféique est présent dans les aliments principalement sous forme d'ester avec l'acide quinique appelé acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique), qui est largement répandu dans les fruits et les légumes, mais remarquable pour ses fortes concentrations en graines, notamment les grains de café, les céréales et les graines de tournesol (Clifford, 1999 ; Clifford, 2000 ; Olthof *et al.*, 2001 ; Robbins, 2003).

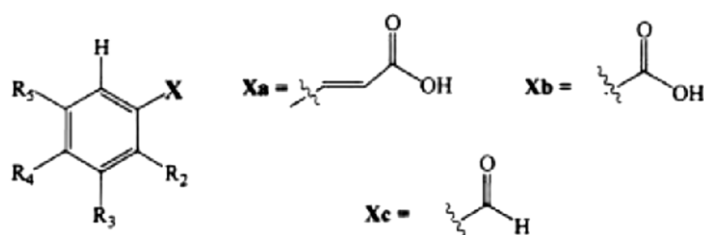


Figure 4. Structure commune des acides phénoliques

R2	R3	R4	R5	X	Code	Nom commun
H	H	H	H	a	1	A. cinnamique
-OH	H	H	H	a	2	A. o-coumarique
H	H	-OH	H	a	3	A. p-coumarique
H	-OH	H	H	a	4	A. m-coumarique
H	-OCH ₃	-OH	H	a	5	A. férulique
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	6	A. sinapique
H	-OH	-OH	H	a	7	A. cafféique
H	H	H	H	b	8	A. benzoïque
-OH	H	H	H	b	9	A. salicylique
H	H	-OH	H	b	10	A. p-hydroxy benzoïque
H	-OCH ₃	-OH	H	b	11	A. vanilique
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	12	A. syringique
H	-OH	-OH	H	b	13	A. protocatéchique
-OH	H	H	-OH	b	14	A. gentisique
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	A. gallique
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	16	A. vératrique
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	17	Syringaldehyde
H	-OCH ₃	-OH	H	c	18	vaniline

3.2.2. Flavonoïdes

En général, tous les flavonoïdes sont des dérivés du composé parent 2-phénylchromone composé de trois cycles phénoliques (A, B et C sur la figure), qui présentent tous des degrés divers d'hydroxylation et de méthylation (Shahidi et Naczka, 2004 ; Yao *et al.*, 2004).

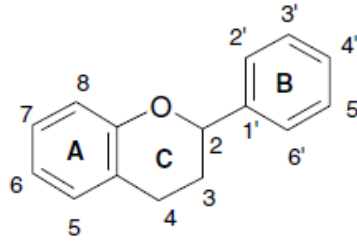


Figure 5. Structure générale d'une molécule de flavonoïde

Les variations dans les modèles de substitution du noyau C résultent les principales classes de flavonoïdes, à savoir les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (ou catéchines), les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines (Fig. 5) (Hollman et Katan, 1999) dont les flavones et les flavonols sont les plus répandus et structurellement divers (Harborne *et al.*, 1999). Ces flavonoïdes se présentent souvent sous forme de glycosides, la glycosylation rendant la molécule plus hydrosoluble et moins réactive vis-à-vis des radicaux libres. Le glucose est le sucre le plus souvent impliqué dans la formation des glycosides, bien que du galactose, du rhamnose, du xylose et de l'arabinose soient également présents, ainsi que des disaccharides tels que le rutinose (Crozier *et al.*, 2000). Alors que les sucres et les groupes hydroxyle augmentent la solubilité dans l'eau des flavonoïdes, d'autres substituants, tels que les groupes méthyle et les unités isopentyle, rendent les flavonoïdes lipophiles (Crozier *et al.*, 2006 ; 2009).

Les flavones et les flavonols se présentent sous forme d'aglycones dans les aliments. Environ 200 flavonols et une centaine de flavones ont été identifiés chez les plantes. Ces composés possèdent une double liaison entre C-2 et C-3. Les flavonols sont différents des flavones en ce qu'ils possèdent un groupe hydroxyle en position 3 et peuvent être considérés comme des 3-désoxyflavonols (Shahidi et Naczki, 2004).

Parallèlement, les flavonones et les flavanonols sont caractérisés par la présence d'une liaison saturée en C2-C3 et d'un atome d'oxygène (groupe carbonyle) en position 4. Ainsi, les flavonones peuvent être appelées dihydroflavones. Les flavanonols se distinguent des flavonones par la présence d'un groupe hydroxyle en position 3 et sont souvent appelés 3-hydroxyflavonones ou dihydroflavonols (Shahidi et Naczki, 2004).

Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes et les catéchines, connus sous le nom de flavanes en raison de l'absence du groupe carbonyle en position 3, sont importants; les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols appartiennent à cette catégorie (Shahidi et Naczki, 2004). Les flavan-3-ols constituent la sous-classe la plus complexe de flavonoïdes, allant des monomères simples (+) -

catéchine et son isomère (-) - épicatechine aux proanthocyanidines oligomères et polymères, également appelées tanins condensés (Crozier *et al.*, 2006 ; Crozier *et al.*, 2009).

Tableau 4 : Différentes classes de flavonoïdes et leurs sources alimentaires

Classe	Nom	Sources alimentaires
Flavone	Chryisine	Peaux de fruits
	Apigénine	Persil, céleri
Flavonone	Naringine	Agrumes, pamplemousse
	Naringénine	Agrumes
	Taxifoline	Agrumes
	Ériodictyol	Citrons
	Hespéridine	Oranges
	Isosakuranétine	Agrumes
Flavonol	Kaempférol	Poireau, brocoli, endives, pamplemousse, thé noir
	Quercétine	Oignon, laitue, brocoli, tomate, thé, baies, pommes, huile d'olive, canneberges
	Rutine	Sarrasin, agrumes, poivron rouge, vin rouge, tomate
Flavononol	Engeletin	Peau de raisin blanc
	Astilbin	Peau de raisin blanc
	Génistine	Soja
	Taxifoline	Fruits
	Génistéine	Soja
	Daidzin	Soja
	Daidzéine	Soja
Flavanol	(+)-Catechin	Thé
	(+)-Gallocatechin	Thé
	(-)-Epicatechin	Thé
	(-)-Epigallocatechine	Thé
	(-)-Epicatechin gallate	Thé
	(-)-Epigallocatechin gallate	Thé
Anthocyanidine	Épigénidine	
	Cyanidine	
	Delphinium	
	Pélagonidine	

Adapté de Shahidi et Naczk (2004)

3.2.3. Stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques qui contiennent deux cycles benzéniques séparés par un pont éthane (C6 – C2 – C6). Elles sont largement répandues dans les plantes supérieures et leurs principaux rôles physiologiques sont liés à leur action en tant que phytoalexines et régulateurs de croissance (Langcake et Pryce, 1977 ; Gorham, 1989). Les stilbènes n'avaient pas attiré l'attention des nutritionnistes jusqu'à ce qu'un des membres de sa famille, le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) ait démontré un effet préventif sur le cancer (Jang *et al.*, 1997, Aziz *et al.*, 2003 ; Shankar *et al.*, 2007). Les principales sources alimentaires de stilbènes sont les raisins, le vin, le soja et les produits à base d'arachides (Burns *et al.*, 2002).

3.2.4. Tannins

Selon leur structure, les tanins sont définis comme hydrolysables ou condensés. Les tanins hydrolysables sont d'acide gallique et de son produit de condensation dimère, l'acide hexahydroxydiphénique, estérifié en un polyol, qui est principalement du glucose. Les tanins condensés, également connus sous le nom de proanthocyanidines, sont des polymères linéaires de motifs flavan-3-ol (catéchine et gallocatéchine) et flavan-3,4-diol. Les unités consécutives de tanins condensés sont liées par la liaison interflavonoïde entre C-4 et C-8 ou C-6 (Porter, 1989). Les tanins condensés se trouvent principalement dans les fruits, les céréales et les légumineuses. Les tanins condensés s'accumulent généralement dans les couches extérieures des plantes. Les tanins hydrolysables se trouvent dans les baies et les noix (King et Young, 1999).

3.3. Métabolisme, absorption et biodisponibilité

L'absorption et le métabolisme des composés phénoliques (CP) alimentaires sont déterminés principalement par leur structure chimique, qui dépend de facteurs tels que le degré de glycosylation-acylation, leur structure fondamentale (dérivés du benzène ou de la flavone), la conjugaison avec d'autres composés phénoliques, la taille moléculaire, le degré de polymérisation et la solubilité (Bravo, 1998). Le parcours des CP de la consommation à l'excrétion semble être comparable à celui de nombreux médicaments de synthèse, mais avec des différences dans leur devenir et leur bioactivité après les phases de métabolisme I et II (Scalbert et Williamson, 2000). Des études ont montré que les composés phénoliques sont métabolisés par les réactions de déconjugaison et de reconjugaison. Les phénoliques sont hydrolysés en leurs aglycones libres, puis sont conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation ou une combinaison (Karakaya, 2004). Il a été démontré que les glycosides de phénol étaient tout d'abord déglycosilés, puis convertis en glucuronides ou en sulfates, avec ou

sans méthylation, lors d'études menées chez le rat ou dans l'intestin isolé de rat. L'existence de réactions de conjugaison de phase II dans le métabolisme des composés phénoliques a également été démontrée dans des études chez l'homme dans la paroi intestinale lors de leur absorption par l'intestin. Cependant, les données disponibles sur la biodisponibilité des composés phénoliques sont encore limitées (Karakaya, 2004 ; Barnes *et al.*, 2011). Les glycones étant transportées par le biais du transport actif et les aglycones par diffusion passive. Après absorption par voie entérale, la majorité des CP est largement transformée par le système de détoxification des entérocytes et du foie pour être excrétée dans la bile, les selles et l'urine. (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2014). Les bactéries du côlon réduisent les polyphénol-aglycones, provoquant l'ouverture du cycle B hétérocyclique et le clivage du cycle. Les produits sont principalement absorbés et pénètrent dans le sang. Des événements métaboliques de phases I et II se produisent dans l'intestin et le foie - la plupart des polyphénols circulent principalement sous forme de b-glucuronides et d'esters sulfatés avec très peu d'aglycones, les formes actives présumées (Barnes *et al.*, 2011 ; Gutierrez-Grijalva *et al.*, 2016). Scalbert et Williamson (2000) ont proposé la voie possible (voir Fig. 6).

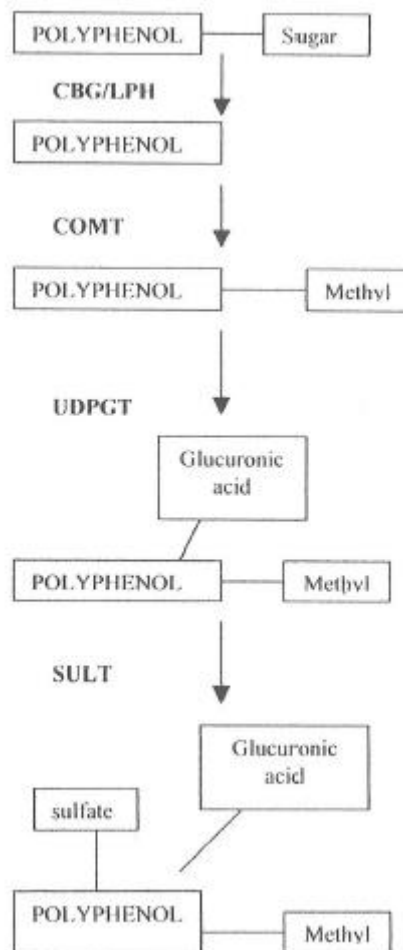


Figure 6. Voie métabolique possible des composés phénoliques

Abréviations utilisés : CBG : cytosolique β -glucosidase ; LPH, lactase phlorizine hydrolase; COMT, catéchol-O-méthyltransférase; UDPGT, glucuronosyl transférase; SULT, phénol sulfotransférases.

3.4. Biosynthèse des composés phénoliques

Dans la synthèse des composés phénoliques, la première procédure consiste à engager le glucose dans la voie du pentose phosphate (PPP) et à transformer de manière irréversible le glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate. La première procédure engagée dans la conversion en ribulose-5-phosphate est réalisée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). D'une part, la conversion en ribulose-5-phosphate produit des équivalents réducteurs du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) pour les réactions anaboliques cellulaires. D'autre part, le PPP produit également de la glycolyse de l'érythrose-4-phosphate avec du phosphoénolpyruvate, qui est ensuite utilisé par la voie des phénylpropanoïdes pour générer des composés phénoliques après avoir été canalisé vers la voie de l'acide shikimique pour produire de la phénylalanine (Lin *et al.*, 2016) (voir Fig. 7).

Le métabolisme des phénylpropanoïdes comprend une série complexe de réactions biochimiques ramifiées qui fournissent à la plante une multitude de composés phénoliques importants. La voie générale des phénylpropanoïdes mène de la phénylalanine à la coumaroyl-CoA et est initiée par l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Les phénylpropanoïdes branches du métabolisme pour donner lieu à littéralement des milliers de composés, dont beaucoup sont spécifiques à des espèces de plantes particulières. Une branche importante mène à la production de flavonoïdes, notamment de flavonols et d'anthocyanines et des tanins. La première étape engagée dans cette voie est catalysée par la chalcone synthase (CHS) (Weisshaar et Jenkins, 1998 ; Ruiz et Romero, 2001 ; Ferrer *et al.*, 2008 ; Cheynier *et al.*, 2013).

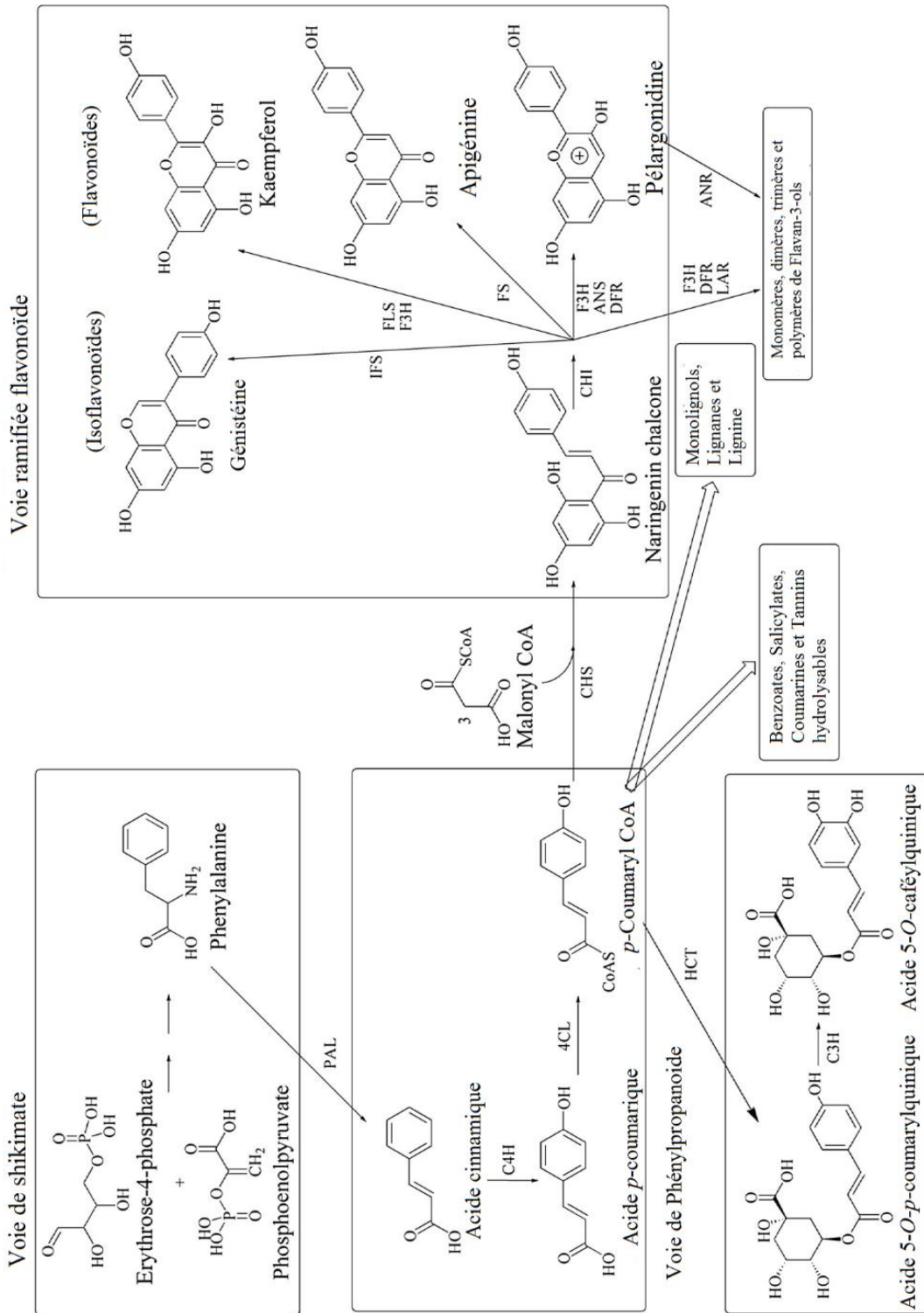


Figure 7. Schéma des principales voies de biosynthèse des composés polyphénoliques.

PAL : phénylalanine ammonia-lyase; C4H : cinnamate-4-hydroxylase; 4CL : 4-coumaroyl CoA-ligase; HCT : hydroxycinnamoyl transférase; C3H, *p*-coumarate-3-hydroxylase; CHS : chalcone synthase; CHI : chalcone isomérase; ANS : anthocyanidine synthase; DFR, dihydroflavonol réductase; FS : flavone synthase; FLS, flavonol synthase; F3H, la flavanone 3-hydroxylase; IFS : isoflavone synthase; ANR : anthocyanidine réductase; LAR : leucoanthocyanidine réductase.

Chapitre II :

Monographie des plantes

1. *Teucrium polium* subsp *capitatum* : la germandrée tomenteuse

1.1. Historique

Le nom scientifique du genre, *Teucrium*, provient du grec Teucros, nom d'un prince troyen qui aurait découvert les propriétés médicinales de la plante. Le nom français Germandrée est une altération du latin médiéval *calamendria*, croisement probable de *calamentum*, sorte de menthe, avec *amedria*, latinisation du grec *chamaedrys* signifiant littéralement "chêne à terre" (en référence à la germandrée petit-chêne) (Couplan, 2012).

1.2. Caractéristiques botaniques

1.2.1 Description botanique

Le genre *Teucrium* est un genre cosmopolite très polymorphe qui diffère d'autres genres apparentés à la famille de Lamiaceae par sa fleur qui manque complètement de la lèvre supérieure de la corolle formée seulement d'une lèvre inférieure à cinq lobes (Tutin et al., 1976 ; Ozenda, 2004). Ce genre est représenté par plus de 340 espèces dont 20 se trouvent en Algérie, et 12 sous espèces dont le *polium* subsp *capitatum* (Quezel et Santa, 1963 ; Heywood et al., 2007). *T. polium* subsp *capitatum* est une plante vivace, pubescente et aromatique, de 20 à 50 cm de haut, à feuilles vert-grisâtre et à fleurs roses à blanches, qui apparaissent de juin à août (Djabou et al., 2012 ; Khani et Heydarian, 2014).



Figure 8. Feuilles et fleurs de *Teucrium polium* subsp *capitatum* (Tela-botanica)

1.2.2. Classification taxonomique

Le genre *Teucrium* appartient à la famille des Lamiaceae, sous-famille des Ajugoideae (Harley et al., 2004). Les membres du genre *Teucrium* L. sont représentés dans la région méditerranéenne par 160 taxons appartenant à sept sections : *Teucrium* L., *Chamaedrys* (MILL.) SCHREB., *Polium* (MILL.) SCHREB., *Isotriodon* BOISS., *Scorodonia* (HIIL) SCHREB., *Scordium* (MILL.) RCHB., et *Spinularia* Boiss (El Oualidi et al., 1999). *Teucrium polium* L. ssp. *capitatum* (L.) Arcangeli (syn *Teucrium capitatum* L.) appartient à la section *Polium* qui est la plus grande et la plus morphologiquement diverse section du genre (El Oualidi et al., 1999).

Selon la classification Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (2016), la position systématique de *Teucrium polium* est la suivante :

Domaine : Eukaryota
(non classé): Archaeplastida
Règne : Plantae
Clade : Angiospermes
Clade : Eudicots
Clade : Eudicots centraux
Clade : Superastéridés
Clade : Asteridées •
Clade : Euastéridées
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Sous-famille : Ajugoideae
Genre : *Teucrium*
Espèce : *Teucrium polium* L., 1753 ssp. *capitatum*

1.2.3. Noms vernaculaires

Teucrium polium L. est appelé en Algérie et en Tunisie «Al-Ja'adeh», «Khayata» et «Gattaba», ce qui signifie «cicatrisant» (Ben Othman et al., 2017). Elle est également appelée «Djaad, Goutiba », « Timzourin ».

1.3. Habitat et répartition géographique

Les espèces du genre *Teucrium* dont *polium* poussent de manière sauvage dans un sol bien drainé et généralement développé dans les régions ensoleillées appartenant aux climats semi-arides et arides. La plupart des espèces se trouvent dans les endroits secs et pierreux des collines et des déserts des pays méditerranéens. Ce genre est largement répandu en Europe, en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Ouest, en Amérique et en Australie et dont la zone principale de distribution est la zone méditerranéenne, contenant environ 96% de tous les taxons (Cantino, 1992 ; Mabberley, 1997 ; El Oualidi *et al.*, 1999 ; Navarro et El Oualidi, 2000).

1.4. Phytochimie de la plante

De nombreuses études phytochimiques ont été effectuées sur l'espèce *Teucrium polium* et de plusieurs classes de constituants isolées comme les terpénoides ou huiles essentielles (Wassel et Ahmed, 1974 ; Hassan *et al.*, 1979 ; Vokou et Bessiere, 1984 ; Sarer et Konuklugil, 1987), les stérols (Tariq *et al.*, 1989), les abiétane diterpénoides (Cuadrado *et al.*, 1992 ; Fiorentino *et al.*, 2010), les diterpènes furanoïdes (Malakov et Papanov, 1983), les néoclérodane diterpénoides (Eguren *et al.*, 1981 ; De la Torre *et al.*, 1988 ; Carreiras *et al.*, 1989 ; Galstyan *et al.*, 1992), les glycosides phénylpropanoïdes (Oganesyan *et al.*, 1991 ; Bedir *et al.*, 1999), Iridoïdes (Rizk *et al.*, 1986 ; De Marino *et al.*, 2012), et les flavonoïdes (Verykokidov-Vistsaropoulou et Vijias, 1986 ; Stefkov *et al.*, 2011) ainsi que des sesquiterpènes (Elmasri *et al.*, 2014).

Le poliumoside, ester de l'acide caféïque, est un marqueur chimique spécifique de la section *polium*. On ne le retrouve pas dans les autres sections où il est remplacé par le teucroside et l'acide chlorogénique non décelés dans la section *polium* (Andary *et al.*, 1988) ou verbascoside qui manifeste, au contraire, une grande variation, liée aux conditions environnementales, au point de disparaître ou d'apparaître en culture (El Oualidi *et al.*, 1996).

1.5. Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces de *Teucrium* sont utilisées depuis plus de 2000 ans comme plantes médicinales pour leurs propriétés pharmacologiques. diurétique, diaphorétique, tonique, antipyrétique, antispasmodique, anti-inflammatoires, anticonvulsives, antihypertenseurs, cholagogique et beaucoup d'entre elles sont utilisées en médecine traditionnelle (Galati *et al.*, 2000 ; Ljubuncic *et al.*, 2006).

1.6. Activités biologiques de *Teucrium polium*

La plante *Teucrium polium* et ses différents extraits possèdent diverses activités biologiques, étudiées à l'échelle mondiale. Le bénéfice thérapeutique des plantes médicinales est souvent attribué à leurs propriétés antioxydantes (Ashnagar et al., 2007).

Les activités biologiques de *T. polium* ont été largement signalées et il a été démontré qu'il possède des effets hypolipidémiques (Gharaibeh et al., 1988 ; Esmaeili et Yazdanparast 2004) ; anorexiques (Gharaibeh et al., 1989) ; anti-inflammatoires ; (Tariq et al., 1989) ; antimicrobiennes (Vahdani et al., 2011 ; Belmekki et al., 2013 ; purnavab et al., 2015 ; Fertout-Mouri et al., 2016) ; anti-ulcère (Twaij et al., 1987) ; anti-nociceptifs (Abdollahi et al., 2003 ; Baluchnejadmojarad et al., 2005) ; antipyrétiques (Autore et al., 1984) ; anti-hypertenseurs (Suleiman et al., 1998) ; anti-rhumatoïdes (Rasekh et al., 2001; Abdollahi et al., 2003) ; surtout pour ses propriétés antilipidémiques (Panovska et al., 2005) et antidiabétiques (Gharaibeh et al., 1988, Rasekh et al., 2001) ; antapoptotique et antioxydantes (Hasani et al., 2007 ; Ardestani et Yazdanparast, 2009) ; fumigante (Khani et Heydarian, 2014) ; antitumorales (Menichini et al., 2009a ; Kandouz, 2010) ; antiphytovirale (Bezić et al., 2011).

1.7. Toxicité

La plupart des espèces de *Teucrium* sont potentiellement hépatotoxiques en raison de la présence des quantités variables de composés diterpénoïdes du type néoclerodane qui sont considérés comme les marqueurs chimiotaxonomiques de genre (Barceloux, 2008 ; Pacifico et al., 2012). Plusieurs cas d'hépatotoxicité chez l'espèce *Teucrium polium* ont été décrits (Mattei et al., 1995 ; Polymeros et al., 2002 ; Savvidou et al., 2007).

Les composés furano diterpénoïdes de la germandrée subissent une activation métabolique en métabolites électrophiles capables de se lier de manière covalente aux protéines des hépatocytes. Les isoenzymes CYP3A catalysent la formation d'époxydes réactifs et / ou d'aldéhydes insaturés à partir de ces composés aromatiques (Lekehal et al., 1996).

2. *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. : le thym

2.1. Historique

Le thym est presque l'herbe utile parfaite. Le mot grec *Thymos* signifie «courage ou force» et semble approprié pour l'herbe qui revigore les sens. Un autre mot possible serait du terme grec "fumiger" comme cette herbe fut brûlée pour chasser les insectes piqueurs de la maison. On croyait qu'un lit de thym fut une maison aux fées. Le thym représentait le style et l'élégance des premiers Grecs, la chevalerie au Moyen Âge et l'esprit républicain en France. Ce fut au début du Moyen Age que les moines bénédictins apportèrent du thym en Europe centrale et en Angleterre. Thym oreillers furent pensés pour soulager l'épilepsie et la mélancolie. De la quinzième à travers le dix-septième siècle, le thym fut utilisé pendant la peste qui balaya L'Europe. Pendant la première guerre mondiale, l'huile essentielle a été utilisée comme antiseptique sur les champs de bataille (Morales, 2002 ; Charles, 2013).

Dans son travail sur les plantes médicinales et les poisons, Dioscoride (Premier siècle, traduction de Laguna, 1555) mentionne le thym comme "Thymo", "Serpo" et "Zygis". Les Egyptiens utilisaient le thym, "thym" pour embaumer les morts. Les Romains brûlaient et répandaient du thym sur le sol pour éloigner les créatures venimeuses. Ils utilisaient du thym pour aromatiser le fromage. Le célèbre miel de thym sauvage fut fait par les abeilles sur le mont. Hymette près d'Athènes. St. Hildegard le mentionna comme un traitement pour la lèpre et la paralysie. Rudyard Kipling écrit sur le «thym à vent qui sent le parfum de l'aube au paradis». (Morales, 2002 ; Charles, 2013).

2.2. Caractéristiques botaniques

2.2.1 Description botanique

Thymus algeriensis est un arbuste diploïde de courte durée ($2n = 2x = 30$) et gynodioïque (Morales, 1996). Il se reproduit par graines et peut atteindre 20-50 cm de hauteur. Les feuilles sont opposées et linéaires / lancéolées tardives (6-12 mm). Les fleurs, aux bractées ovales et à la corolle violette ou violette rose, sont petites (5-7 mm). Il se reproduit par les semences et les expositions se propagent également par la voie végétative. Cet arbuste gynodioïque est composé de plantes hermaphrodites (fertiles mâles) et femelles (stériles mâles). La floraison a lieu entre avril et juin. Les fleurs sont petites avec une corolle violette ou violette (Ben El Hadj Ali et al., 2010). Il est souvent pollinisé par les abeilles (espèces allogames), mais une autopollinisation peut également se produire chez les hermaphrodites (Tarayre et Thompson, 2002 ; Orellana et al., 2005).



Figure 9. Feuilles et fleurs de *Thymus algeriensis* (Tela-botanica)

2.2.2. Classification taxonomique

Le grand genre *Thymus* L. (Lamiaceae) comprend environ 350 espèces aromatiques et vivaces originaires d'Europe et d'Afrique du Nord dont 66 poussent en Europe (Mabberley, 1997) et 18 en Afrique (Morales, 1994). Selon Jalas (1971), *Thymus* est divisé en huit sections : *Micantes*, *Mastichina*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Hyphodromi* et *Serpyllum*. Elles-mêmes divisées en sous-sections (Morales, 1997).

I. Sect. *Micantes*

II. Sect. *Mastichina*

III. Sect. *Piperella*

IV. Sect. *Teucrioides*

V. Sect. *Pseudothymbra*

1. Sous-sect. *Pseudothymbra*

2. Sous-sect. *Anomalae*

VI. Sect. *Thymus*

1. Sous-sect. *Thymastra*

2. Sous-sect. *Thymus*

VII. Sect. *Hyphodromi*

1. Sous-sect. *Subbracteati*

2. Sous-sect. *Serpyllastrum*

3. Sous-sect. *Thymbropsis*

VIII. Sect. *Serpyllum*

1. Sous-sect. *Insulares*

2. Sous-sect. *Kotschyani*

3. Sous-sect. *Pseudopiperellae*

4. S Sous-sect. *Isolepides*

5. Sous-sect. *Alternantes*

6. Subsect. *Pseudomarginati*

7. Subsect. *Serpyllum*

Le *T. algeriensis* Boiss. and Reuter appartient à section Hyphodromi (A. Kerner) Halácsy et sous-section Subbracteati (Klokov) Jalas (Morales, 2002).

Selon la classification Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (2016), la position systématique de *Thymus algeriensis* est la suivante :

Domaine : Eukaryota

(non classé): Archaeplastida

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes

Clade : Eudicots

Clade : Eudicots centraux

Clade : Superastéridés

Clade : Asteridées •

Clade : Euastéridées

Ordre : Lamiales •

Famille : Lamiaceae

Sous-famille : Nepetoideae

Tribu : Mentheae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

2.2.3. Noms vernaculaires

T. algeriensis est plus répandu dans les pays de l'Afrique du Nord et ses noms populaires en langues arabe et berbère sont : "zhitra" 'azoukni', 'djertil', 'djoushshen', 'hamriya', 'hamzousha', 'khieta', 'mezoukesh', 'rebba', 'toushna' (Quezel et Santa, 1963 ; Boulos, 1983 ; Suelmassi, 1991 ; Morales 2002).

2.3. Habitat et répartition géographique

Les espèces de *Thymus* sont bien adaptées au climat chaud et sec de la région méditerranéenne et sont répandues dans les régions arides de la péninsule ibérique où ils y poussent à l'état sauvage (Tedone et al., 2001 ; Horwath et al., 2008). Le *Thymus algeriensis* est endémique à l'Algérie, la Libye, la Tunisie et le Maroc (Houmani et al., 2002 ; Le Floch et Boulos, 2008). En Tunisie, les populations de *T. algeriensis* sont réparties entre des bioclimats arides sub-humides et inférieurs arides à des altitudes comprises entre 120 et 1100 m. L'espèce pousse sur des sols calcaires pauvres et fertiles et se rencontre en populations dispersées et

petites (Ben El Hadj Ali et al., 2010 ; Zouari et al., 2012). Au Maroc, elle est présente dans le Moyen Atlas, le Haut Atlas, l'Anti Atlas occidental, le Rif et l'Oriental (foret de Beni Snassen) (Benabid, 2000).

2.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces de thymus ont été utilisées pour plus de 2000 ans en tant qu'herbes médicinales et beaucoup d'entre eux sont encore utilisés (Zaruelo et Crespo, 2002). En outre, il est l'un des plus largement utilisé des genres dans la médecine populaire, où il est populaire pour son action stimulatrice sur toutes les fonctions de l'organisme (Viuda-Martos et al., 2011).

Le *Thymus algeriensis* est une plante odorante herbacée largement utilisée, fraîche ou séchée, en tant que herbe culinaire (Pottier-Alapetite, 1981 ; Chaieb et Boukhriss 1998 ; Le Floch et Boulos 2008). De plus, cette plante est également largement utilisée dans la médecine traditionnelle sous forme les infusions et décoctions des feuilles et des fleurs contre les maladies du tube digestif et anti-avortement (Le Floch, 1983). En Algérie, il a été utilisé comme astringents, agents expectorants et cicatrisants (Baba Aïssa, 1991). En Tunisie, en tant qu'agents anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques et anti-bronchiques (Guesmi et al., 2014). Il est aussi utilisé pour ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antifongiques antiparasitaire, toniques, anti-inflammatoire, antitussif et carminatif (Stahl-Biskup et Sáez 2002 ; Giordiani et al., 2008 ; Hazzit et al., 2009).

2.5. Activités biologiques de *Thymus algeriensis*

Les propriétés aromatiques et médicinales du genre *Thymus* en ont fait l'une des plantes les plus populaires dans le monde entier. On croit qu'une partie de ces activités sont dues aux constituants volatils. Par conséquent, il existe un intérêt de recherche considérable pour l'analyse de la composition des huiles essentielles de *Thymus* (Stahl-Biskup and Saez, 2002). Plusieurs études ont montré que le *Thymus algeriensis* possédait d'importantes activités antioxydante (Hazzit et al., 2009 ; Giweli et al., 2013 ; El Ouariachi et al., 2014 ; Megdiche-Ksouri et al., 2015 ; Ben El Hadj Ali et al., 2015) ; antibactérienne et antifongique (Dob et al., 2006 ; El Ajjouri et al., 2010 ; Ait-Ouazzou, 2011 ; Zouari et al., 2011 ; Chemat et al., 2013 ; Jayari et al., 2017) ; anti-conversion de l'angiotensine I (Zouari et al., 2011) ; antitumorale (Nikolić et al., 2014) ; allélopathique et insecticide (Ben El Hadj Ali et al., 2015) ; anticorrosive (Khadraoui et al., 2015).

2.6. Phytochimie de la plante

Les principales études sur la composition chimique de la plante ont été réalisées sur la fraction volatile (Hazzit et al., 2009 ; Giweli et al., 2013 ; Chemat et al., 2013 ; El-Ouariachi et al., 2014 ; Ben El Hadj Ali et al., 2015). Cependant, pour la fraction non volatile, quelques flavonoïdes ont été isolés tels que : taxifoline, ériodictyol, 5,6-dihydroxy-7-3', 4'-triméthoxyflavone et 5,6,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone. (El-Domiaty et al. (1997), 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone (5-desmethylinensetin), quercetin-3-O-rutinoside, luteolin-7-O-rhamnoside (Benkiniouar et al., 2007).

Récemment, Boutaoui et al. (2018) ont identifié 16 composés phénoliques dans les extraits de *Thymus algeriensis* dont 11 acides phénoliques et cinq flavonoïdes. Les acides phénoliques identifiés étaient : acide gallique, acide chlorogénique, acide vanillique, acide syringique, acide 3-hydroxybenzoïque, acide p-coumarique, acide sinapinique, acide t-féruilique, acide benzoïque, acide o-coumarique et l'acide benzoïque. Tandis que les flavonoïdes étaient : l'épicatéchine, de la naringine, la catéchine, la rutine, la naringénine, isovanilline, harpagoside.

2.7. Toxicité

Aucune étude n'a été rapportée concernant la toxicité de thym. Cependant, le thymol, administré par voie orale, peut provoquer des douleurs abdominales voire un léger collapsus à des doses de 0.3 à 0.6 gramme (Wichtl et Anton, 1999).

3. *Ammoides verticillata* : le cerfeuil

Les Apiaceae (Umbelliferae) est une famille cosmopolite. En Algérie, cette famille comprend environ 55 genres et 130 espèces citées par Quezel et Santa (1963). Le genre *Ammoides* en Algérie comprend deux espèces : *Ammoides atlantica* (Coss et Dur.) Wolf, qui est endémique, et *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. (syn *A. verticillata* (Duby) Briq., *Ptychotis ammoides* W. D. J. Koch, *Carum ammoides* (L.) Bail, *Petroselinum ammoides* (L.) Rchb. f.), *Seseli pusillum*, Brot., *Seseli ammoides* L., *Seseli verticillatum* Desf. est répandu dans la région méditerranéenne (Trabut, 1935 ; Quezel et Santa, 1963 ; Bellakhdar, 1997 ; Rankou et al., 2015).

3.1. Caractéristiques botaniques

3.1.1. Description botanique

L'*Ammoides pusilla* est une espèce herbacée aromatique répandue en Afrique du Nord. Plante annuelle grêle à souche filiforme, à tige très ramifiée de 10-40 cm, sans rosette de feuilles

basales. Feuilles inférieures pétiolées à nombreux segments multifides verticillés (Fig. 10), les supérieures pennatifides à segments linéaires. Ombelles principales à 8-15 rayons. Fruits ovoïdes de moins de 1 mm de long. Elle connaît un cycle dynamique tardif allant de mai à juillet (Quezel et Santa, 1963).

3.1.2. Classification taxonomique

Selon la classification Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (2016), la position systématique de l'*Ammoides verticillata* est la suivante :

Domaine : Eukaryota

(non classé): Archaeplastida

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes

Clade : Eudicots

Clade : Eudicots centraux

Clade : Superastéridés

Clade : Asteridées •

Clade : Euastéridées II

Ordre : Apiales

Sous-ordre : Apineae

Famille : Apiaceae

Sous-famille : Apoideae

Tribu : Pyramidoptereae

Genre : *Ammoides*

Espèce : *Ammoides verticillata* ou *pusilla* (Brot.) Breistr.

3.1.3. Noms vernaculaires

En Algérie, *Ammoides verticillata* ou *pusilla* est connu sous le nom de Noukha, et sous des noms variés tels que Nanoukh, Nabta, Ridjl El-Ghorab et Gazar Ech-Cheytan dans les pays d'Afrique du Nord (Trabut, 1935 ; Quezel et Santa, 1963 ; Laouer, 2003). Elle est appelée Nounkha ou *Nûnkha* tirée du nom Perse «Nankhah» qui est utilisée en Iran, comme aromate dans le pain. En effet, «Nan» et « Khah » signifient respectivement pain et goût (Baytop et Siltlipinar, 1986).



Figure 10. Feuilles et fleurs d'*Ammoides verticillata* (Tela-botanica)

3.3. Habitat et répartition géographique

L'*Ammoides pusilla* (ou *verticillata*) est largement répandu dans les régions d'Europe méridionale et centrale, ainsi que dans les régions de la Méditerranée et de l'Afrique du Nord. La plante est assez commun dans le nord de la Méditerranée, bien que très local en Afrique du Nord et rare dans certaines régions. Les habitats typiques comprennent les pâturages, les berges, les terres non cultivées; champs rudéraux, plaine de montagne, berges de rivières, bordures d'étangs, lits de rivières, oliveraies, sous-bois clairs, fossés, terrains vagues, lieux pierreux, défrichements forestiers, pâturages de basse montagne, forêts, bords de côte, collines escarpées et forêt méditerranéenne. L'*Ammoides pusilla* est une plante à feuilles caduques thérophyte, qui pousse dans les sols argileux et calcaires et sur des substrats profonds, humides à bien alcalinisés, humides à bien drainés. L'espèce préfère les habitats mi-ombragés à ouverts, fleurit de mai à juillet et pousse dans des climats subhumides à subarides et arides (Rankou et al., 2015).

3.4. Utilisation en médecine traditionnelle

La plante *Ammoides pusilla* (ou *verticillata*) est largement utilisée pour prévenir et guérir diverses maladies. Un nombre élevé de propriétés médicinales et thérapeutiques des différentes parties de la plante a été décrit. Dans la médecine traditionnelle algérienne, l'*Ammoides pusilla* est largement utilisée comme décoction ou perfusion pour traiter les maux de tête et migraine, antipyrétique pour réduire la fièvre et rhume, antispasmodique pour supprimer les spasmes

musculaires de l'estomac, de l'intestin ou de la vessie, la diarrhée et trouble gastriques, problèmes respiratoires, infections rénales ou comme une compresse seule ou trempée dans l'alcool ou de vinaigre et mélangé avec du henné pour traiter la débilité mentale des enfants. L'espèce est également utilisée comme antiseptique pour réduire le risque d'infection, de septicémie ou de putréfaction du tractus gastro-intestinal et est utilisée dans le traitement du vitiligo afin d'améliorer l'apparence de la peau en restaurant sa couleur (Boulos 1983, Bellakhdar *et al.*, 1991 ; Bnouham *et al.*, 2007, Bnouham *et al.*, 2010 ; Laouer *et al.*, 2003 ; Felidj *et al.*, 2010).

3.5. Activités biologiques d'*Ammoides verticillata*

Les infusions d'*A. verticillata*, les extraits de solvants ainsi que les huiles essentielles ont montré diverses propriétés biologiques, notamment des propriétés antioxydante (Laouer *et al.*, 2003 ; El-Ouariachi *et al.*, 2011) et antimicrobienne (Laouer *et al.*, 2003 ; Laouer *et al.*, 2004 ; Zerroug *et al.*, 2010 ; Oumessaad *et al.*, 2011. ; Tefiani *et al.*, 2015) ; antiparasitaire (Souhail *et al.*, 2017) ; anticorrosive (El-Ouariachi *et al.*, 2013). En plus, des activités antiproliférative (Tefiani *et al.*, 2015) et antidiabétique (Bnouham *et al.*, 2007 ; 2010), ont également été rapportées.

3.6. Phytochimie de la plante

Le criblage phytochimique des parties aériennes (tige, fleurs) a révélé une richesse en composés phénoliques : (polyphénols, tanins catéchiques, flavonoïdes, flavonoïdes libres (flavones), leucoanthocyanes, coumarines, anthocyanes et quinones libres), en composés terpéniques : (saponosides, stéroïdes, stérols triterpènes et huiles essentielles), en composés azotés (alcaloïdes), ainsi qu'en caroténoïdes (Oumessaad *et al.*, 2011 ; Daira *et al.*, 2016).

3.7. Toxicité

Aucun cas d'intoxication n'a également été causé par *Ammoides pusilla* et les tests de toxicité ne suggèrent aucun effet néfaste de l'utilisation de l'espèce. Les tests de toxicité (DL50) ne suggèrent aucun effet négatif de l'utilisation de cette plante (Bnouham *et al.*, 2007).

Chapitre III :

Radicaux libres et antioxydants

1. Généralités

Ces dernières années, le domaine de la chimie des radicaux libres a suscité une grande attention. Le rôle des réactions radicalaires dans la médecine, la biologie, la toxicologie, la nutrition et les sciences des aliments est devenu un sujet d'intérêt intense (Aruoma, 1998). Ces réactions sont omniprésentes dans les systèmes alimentaires et biologiques et sont responsables d'une multitude d'effets indésirables et de conséquences pour la santé humaine ainsi que pour la stabilité et la conservation des aliments (Morello *et al.*, 2002).

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont produits à la fois dans les cellules des systèmes vivants et dans les aliments frais (Donnelly et Robinson, 1990 ; Halliwell *et al.*, 1995). La production de radicaux libres dans les organismes vivants est un événement biochimique normal. Un équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants est nécessaire au bon fonctionnement physiologique. Si les radicaux libres submergent la capacité du corps à les réguler, il en résulte un état appelé stress oxydatif. Les radicaux libres entrent en contact avec les molécules sensibles et altèrent ainsi négativement l'ADN, les protéines et les lipides comme les acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes cellulaires, et déclenchent un certain nombre de maladies humaines notamment l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, le cancer, le diabète sucré, des maladies inflammatoires ainsi que des maladies psychologiques ou le vieillissement (Halliwell et Gutteridge, 1998 ; Lobo *et al.*, 2010 ; Durackova, 2010). Les radicaux libres réactifs entraînent également une détérioration de la valeur nutritionnelle des aliments, qui peuvent également être responsables de l'altération de la couleur et de la saveur des aliments (Kołakowska, 2003 ; Shahidi et Zhong, 2010b).

Les antioxydants alimentaires revêtent une importance primordiale pour la préservation de la qualité des aliments pendant le traitement et le stockage. Ils présentent également un intérêt considérable pour les consommateurs, qui recherchent des aliments riches en antioxydants dans l'espoir de prévenir les maladies et de les remettre à plus tard du vieillissement (Shahidi, 2015). Les antioxydants synthétiques et naturels sont largement utilisés dans les produits alimentaires et un nombre croissant d'articles de recherche ont paru dans la littérature récente sur la découverte et l'application d'antioxydants naturels et leur utilisation thérapeutique pour inhiber une myriade de maladies. Cependant, certains antioxydants synthétiques courants sont également devenus controversés en raison de leurs effets néfastes potentiels sur la santé (Shahidi et Zhong, 2010b).

2. Biochimie des radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène

2.1. Définition et types

Un radical libre est toute espèce capable d'existence indépendante possédant un ou plusieurs électrons non appariés, un électron non apparié étant un électron seul dans une orbitale (le point radical (•) est inséré pour indiquer la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés (Aruoma, 1994 ; Halliwell et al., 1995)). Tout radical libre contenant de l'oxygène est alors appelé espèce réactive de l'oxygène (ERO) (Tableau 1), mais les ERO peuvent également inclure des espèces qui ne sont pas des radicaux libres (tels que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, oxygène singulet ¹O₂, ozone O₃, hypochlorite OCl⁻ et peroxy-nitrite ONOO⁻). Les ERO les plus couramment formés et impliqués dans de nombreux états pathologiques sont le radical anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyle (ERO le plus réactif), l'oxygène singulet, l'hypochlorite, les radicaux oxyde nitrique et les radicaux peroxy-nitrite (Bartosz, 2003 ; Lobo et al., 2010 ; Kołakowska et Bartosz, 2014).

Tableau 5. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces non radicalaires (Gülçin, 2012)

Radicaux		Non-radicaux	
Superoxyde	O ₂ ⁻	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Hydroxyle	OH ⁻	Oxygène singulet	¹ O ₂
Hydroperoxyde	HO ₂ ⁻	Ozone	O ₃
Radical lipidique	L	Hydroperoxyde lipidique	LOOH
Radical peroxyde lipidique	LOO	Hypochlorite	HOCl
Peroxyde	ROO'	Peroxy-nitrite	ONOO-
Radical alcoxyde lipidique	LO'	Trioxyde de diazote	N ₂ O ₃
Dioxyde d'azote	NO ₂	Acide nitreux	HNO ₂
Oxyde nitrique	NO'	Chlorure de nitryl	O ₂ Cl
Cation nitrosyle	NO-	Anion nitrosyle	NO-
Thiyle	RS'	Acide peroxy-nitreux	ONOOH
Radical protéique	Ġ	Oxyde nitreux	N ₂ O

2.2. Sources et voies de formations des ERO

Les sources de radicaux libres sont nombreuses. Il existe deux grandes voies de formation des radicaux libres : *le transfert d'électrons* catalysé par les métaux de transition (fer, cuivre) et par les enzymes. Ces réactions ont lieu *in vitro* et *in vivo* (Caillard et Caillard, 2006). Dans les organismes vivants, les ERO sont générés dans plusieurs systèmes cellulaires localisés sur

la membrane plasmique, dans le cytosol, dans les peroxisomes et sur les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Fig. 11) (Di Meo *et al.*, 2016). L'anion radical superoxyde semble jouer un rôle central, car d'autres intermédiaires réactifs sont formés dans les séquences de réaction commençant par $O_2^{\cdot-}$ (Gulçin, 2011). La source principale de superoxyde est la fuite d'un électron de la chaîne respiratoire mitochondriale et, dans les cellules végétales, du système redox des chloroplastes (Bartosz, 2003 ; Kołakowska et Bartosz, 2011).

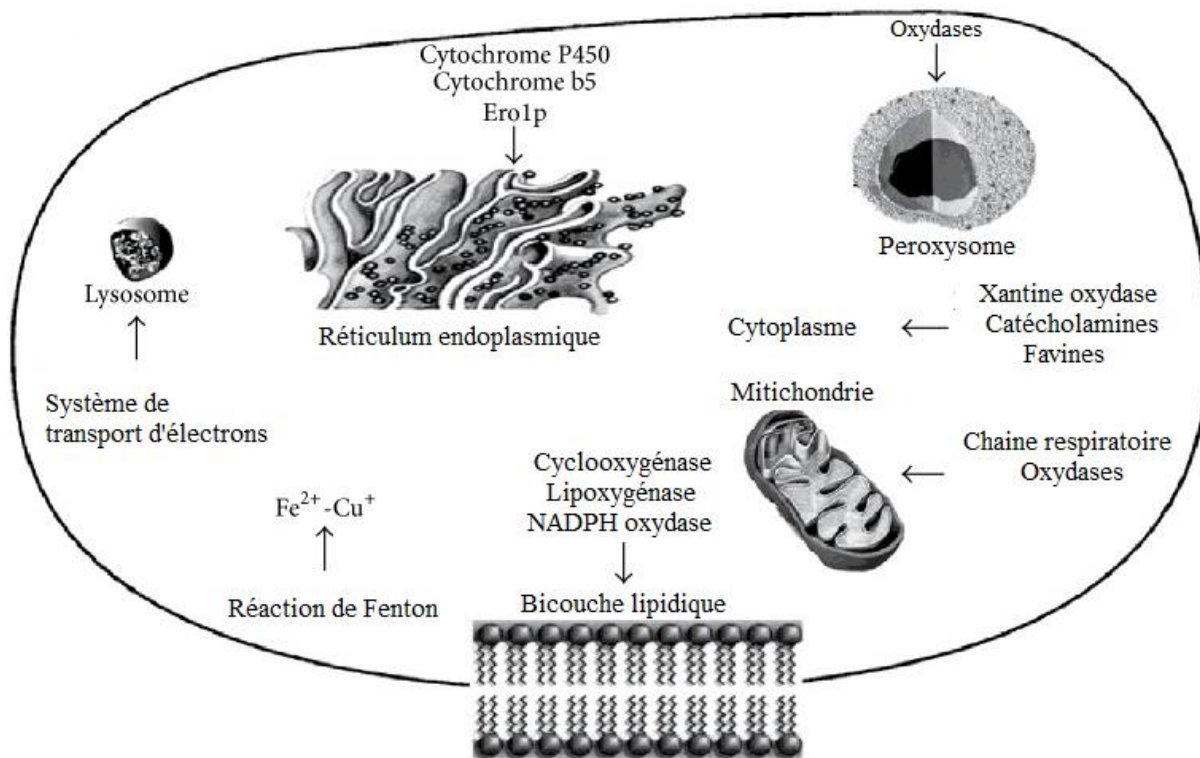
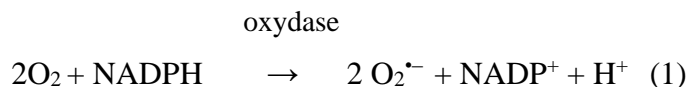


Figure 11. Sources cellulaires de production des ERO (Di Meo *et al.*, 2016)

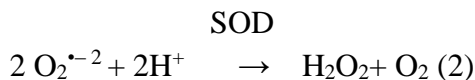
Les sources exogènes d'ERO comprennent la fumée de tabac, certains polluants, les solvants organiques et les pesticides (Halliwell et Gutteridge, 1999). Avec le régime alimentaire, de nombreux composés de nature pro-oxydante, tels que les quinones capables du cycle redox, sont délivrés à l'organisme. De plus, un éventail de radicaux est inhalé avec la fumée de cigarette, l'ozone, dont on signale une augmentation des concentrations en raison de la pollution de l'air, est un ERO capable d'oxyder les lipides (Diplock *et al.*, 1998).

2.3. Génération de radicaux libres

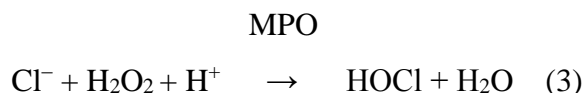
La génération des ERO commence par une absorption rapide d'oxygène, l'activation de la NADPH et la production du radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (réaction 1).



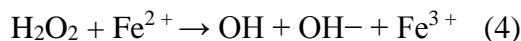
L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ est ensuite rapidement converti en H_2O_2 par SOD (Superoxyde dismutase) (réaction 2).



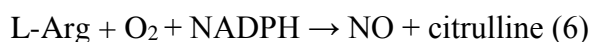
Les espèces réactives peuvent également être générées par le système myéloperoxydase-halogénure- H_2O_2 . L'enzyme myéloperoxydase (MPO) est présente dans les granules cytoplasmiques de neutrophiles. En présence de l'ion chlorure, qui est omniprésent, l' H_2O_2 est converti en hypochlorite (HOCl) (réaction 3), un puissant oxydant et agent antimicrobien (Babior, 1999).



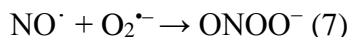
Les ERO sont également générés à partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 par le biais de réactions d'éclatement respiratoire par Fenton (réaction 4 et / ou Haber – Weiss 5 (Knight, 1999).



L'enzyme oxyde nitrique synthase produit des espèces d'azote réactif (RNS), telles que l'oxyde nitrique (NO^\bullet) à partir d'arginine (réaction 6).



Une oxyde nitrique synthase (NOS) est capable de produire en continu une grande quantité de NO, qui agit comme un inhibiteur de la teneur en oxygène. Les NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$ réagissent ensemble pour produire du peroxynitrite (ONOO^- (réaction 7)), un oxydant très fort, chacun pouvant donc moduler les effets de l'autre. Bien que ni les NO ni les $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne soient des oxydants puissants, le peroxynitrite est un oxydant puissant et polyvalent capable d'attaquer un large éventail de cibles biologiques (Zhu et al., 1992).



Les autres origines de réactions radicalaires sont la cyclooxygénation, la lipooxygénation, la peroxydation lipidique (hydroperoxydes, époxydes..), le métabolisme des xénobiotiques (Cytochrome P450), l'ozone la haute atmosphère (réactions 8 et 9) et les rayonnements ultraviolets (Shahidi et Zhong, 2010).



2.4. Cibles des radicaux libres

À des concentrations élevées, les ERO peuvent être des médiateurs importants des dommages causés aux structures cellulaires, aux acides nucléiques, aux lipides et aux protéines (Valko *et al.*, 2006 ; 2007). Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN, endommageant à la fois les bases purine et pyrimidine ainsi que le squelette du désoxyribose (Halliwell et Gutteridge, 1999). La lésion de l'ADN la plus étudiée est la formation de 8-OH-G. La modification permanente du matériel génétique résultant de ces incidents de «dommages oxydatifs» constitue la première étape de la mutagenèse, de la cancérogenèse et du vieillissement (Valko *et al.*, 2006). Il est connu que la génération des ERO induite par un métal provoque une attaque non seulement de l'ADN, mais également d'autres composants cellulaires impliquant des résidus d'acide gras polyinsaturés de phospholipides, qui sont extrêmement sensibles à l'oxydation (Siems *et al.*, 1995). Une fois formés, les radicaux peroxydes (ROO[•]) peuvent être réarrangés via une réaction de cyclisation en endopéroxydes (précurseurs du malondialdéhyde), le produit final du processus de peroxydation étant le malondialdéhyde (MDA). Les mécanismes impliqués dans l'oxydation des protéines par les ERO ont été élucidés par des études dans lesquelles des acides aminés, des peptides simples et des protéines étaient exposés à des substances ionisantes, des radiations dans des conditions de formation de radicaux hydroxyle ou d'un mélange de radicaux hydroxyle / superoxyde (Stadtman, 2004). Les chaînes latérales de tous les résidus d'acides aminés des protéines, en particulier les résidus de protéines cystéine et méthionine, sont susceptibles d'oxydation par l'action de ERO/ ERA (Stadtman, 2004). L'oxydation des résidus de cystéine peut conduire à la formation réversible de disulfures mixtes entre les groupes protéine thiol (-SH) et les thiols de faible poids moléculaire, en particulier le GSH (S-glutathiolation) (Dalle-Donne *et al.*, 2005).

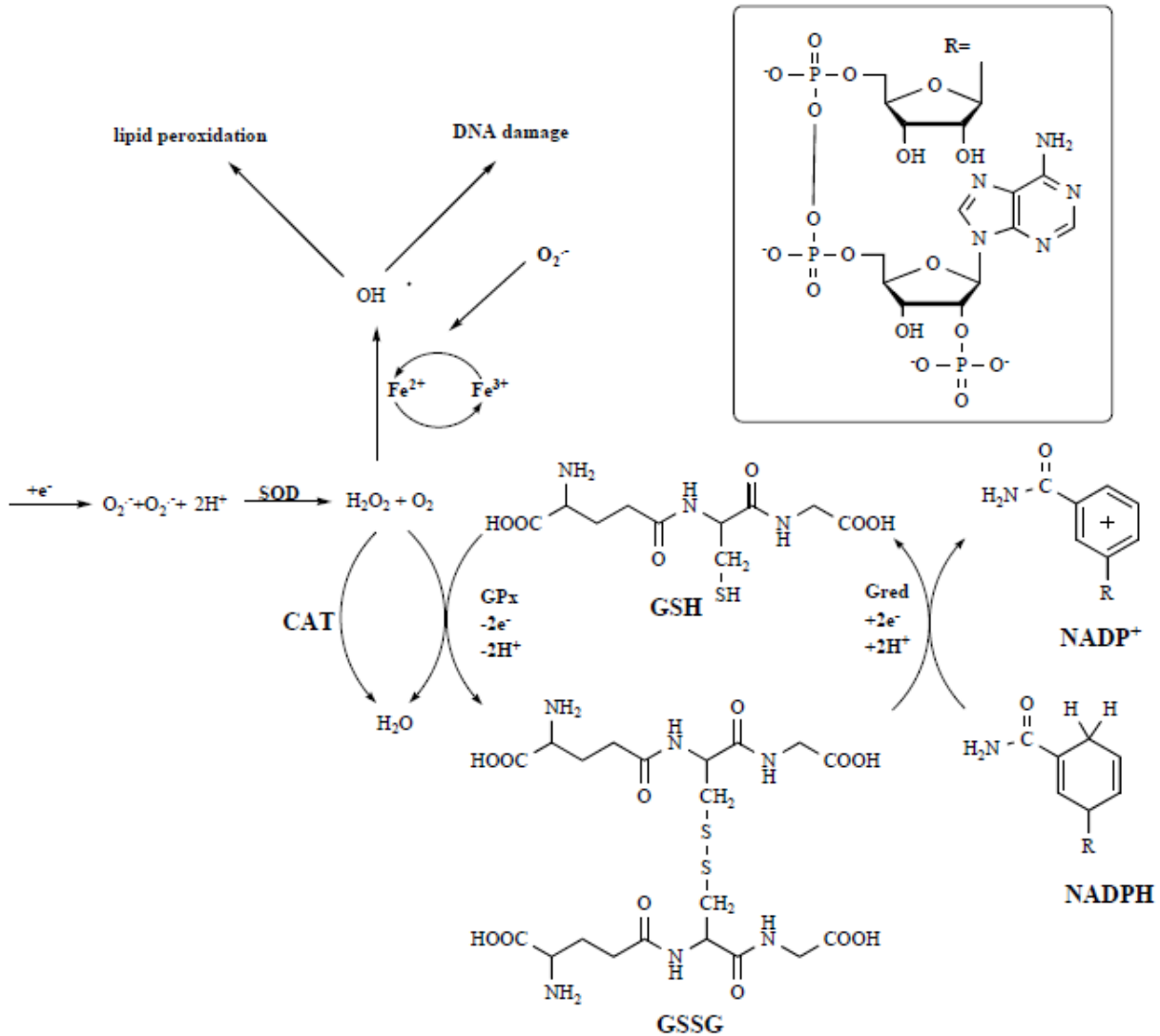


Figure 12. Stress oxydatif induit par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Wojcik et al., 2010)

Le transfert d'un électron au dioxygène entraîne la formation d'un radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ par la superoxyde dismutase (SOD) donne du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est à son tour converti en eau en présence de catalase (CAT) ou de glutathion peroxydase (GPx), nécessitant GSH comme électron. donneur. Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit en GSH par la glutathion réductase (Gred), le NADPH jouant le rôle de donneur d'électrons. En présence d'un métal de transition réduit tel que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 est converti dans la réaction de Fenton en un radical hydroxyle réactif (OH^{\cdot}), ce qui peut initier une réaction radicalaire en chaîne des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les lipides membranaires et / ou causer des dommages à l'ADN.

2.5. Importance physiologique des radicaux libres

Bien que les espèces réactives d'oxygènes (ERO) excessives soient principalement impliquées dans les dommages aux cellules, elles jouent également un rôle physiologique majeur dans plusieurs aspects de la signalisation et de la régulation intracellulaires. En fonction de leur concentration, les ERO induisent soit une réponse positive (prolifération cellulaire) ou

une réponse cellulaire négative (arrêt de la croissance ou mort cellulaire). Tandis que des concentrations élevées des ERO provoquent la mort cellulaire voire la nécrose, des concentrations faibles de radical superoxyde et de peroxyde d'hydrogène stimulent la prolifération et améliorent la survie dans une grande variété de types de cellules. Les ERO peuvent donc jouer un rôle physiologique très important en tant que messagers secondaires. D'autres exemples incluent la régulation de la concentration de calcium cytosolique (qui régule elle-même les activités biologiques mentionnées ci-dessus), la régulation de la phosphorylation de protéines et l'activation de certains facteurs de transcription tels que NF-KB et les facteurs de la famille AP⁻¹ (Bartosz et Kołakowska, 2011).

3. Réactions radicalaires

Lorsque deux radicaux libres se rencontrent, ils peuvent joindre leurs électrons non appariés pour former une liaison covalente. Un exemple est la réaction très rapide d'O₂⁻ avec le radical d'oxyde nitrique (NO⁻) pour donner le peroxyde nitrique non radicalaire.



Cependant, la plupart des molécules présentes dans les systèmes vivants sont des non-radicaux. Lorsque les radicaux réagissent avec des non-radicaux, de nouveaux radicaux sont générés. Par conséquent, la formation de radicaux réactifs *in vivo* est susceptible de déclencher des réactions en chaîne radicalaires. La réaction en chaîne de radicaux libres biologiquement pertinente la mieux étudiée est la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides est également une préoccupation majeure des fabricants de produits alimentaires car elle peut conduire au développement de produits "rancés" ou "sans saveur" désagréables, ainsi que de produits finis potentiellement toxiques (Halliwell et al., 1995).

4. Peroxydation des lipides

Les lipides sont susceptibles à l'oxydation en présence de systèmes catalytiques tels que la lumière, la chaleur, les enzymes, les métaux, les métalloprotéines et les microorganismes, conduisant à des processus complexes d'autoxydation, de photooxydation, d'oxydation thermique ou enzymatique, dont la plupart impliquent des radicaux libres et / ou d'autres espèces réactives en tant qu'intermédiaire (Shahidi et Zhong, 2010). Le processus peut être accéléré à des températures plus élevées comme dans l'oxydation thermique. La photooxydation implique l'excitation d'un photosensibilisateur et le transfert d'énergie vers les molécules lipidiques ou l'oxygène. L'oxydation peut également être catalysée par certaines enzymes telles que les lipoxygénases. Les acides gras insaturés sont les principaux réactifs concernés par ces réactions, qu'ils soient présents sous forme d'acides gras libres, d'esters alkyliques simples,

d'acylglycérols ou de phospholipides. Les AGPI contenus dans les phospholipides membranaires et le cholestérol, en particulier les lipoprotéines de basse densité (LDL) - cholestérol, sont les principaux substrats cibles de l'oxydation *in vivo*, provoquant des dommages irréversibles aux cellules et aux tissus (Pokorny, 2003).

Tableau 6 : Mécanismes d'oxydation des lipides (Pokorny, 2003)

<i>Type d'oxydation</i>	<i>Lipides oxydés</i>	<i>Catalyseur</i>	<i>Agent oxydant</i>	<i>Prévention</i>
<i>L'auto-oxydation</i>	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	Antioxydants
<i>Oxydation enzymatique</i>	Lipides polyinsaturés	Lipooxygénases	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes
<i>Oxydation due à l'oxygène singulet</i>	Tous les lipides insaturés	Molécules photosensibles	Oxygène singulet	Piégeurs d'oxygène singulet

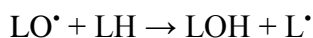
4.1. Voies d'autoxydation des lipides

Il a été largement admis que l'autoxydation des lipides se produit via un mécanisme de chaîne de radical libre qui se déroule à travers trois étapes distinctes d'initiation, de propagation et de terminaison, conduisant à une série de modifications chimiques complexes.

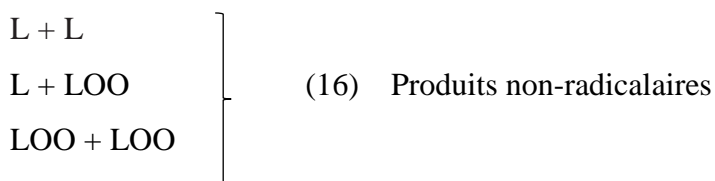
a. Initiation

La phase d'initiation est due à la perte d'un atome d'hydrogène en présence d'initiateurs (*I*) tels que la chaleur, les rayonnements ionisants et les ions métalliques (Shahidi, 2015) ou à l'attaque d'une espèce radicalaire *R* (radicaux hydroxyles, alcoxyles, peroxyles, hydroperoxyles, l'oxygène singulet) suffisamment réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique situé en α d'une double liaison (hydrogène le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé (LH) (Laguerre *et al.*, 2007a ; Michel *et al.*, 2008), pour former un radical pentadiényl (radical centré sur l'atome de carbone ; $-\bullet\text{CH}-$ ou $\text{L}\bullet$). Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxy, $\text{LOO}\bullet$.



b. Propagation

Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente (LH), créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) ; Cette réaction peut être répétée plusieurs milliers de fois au cours de la propagation jusqu'à ce qu'aucune source d'hydrogène ne soit disponible ou que la chaîne ne soit interrompue, par exemple, par des antioxydants (Wanasundara et Shahidi, 2005). La combinaison du radical peroxyde avec l'atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera des radicaux alkoxydes (LO^\bullet) et hydroxyles (HO^\bullet). Les radicaux peroxydes peuvent aussi conduire à des peroxydes cycliques.

c. Terminaison

Le processus d'oxydation se poursuit ensuite avec la transformation d'hydroperoxydes, produits primaires d'oxydation, en composés d'oxydation secondaires non-radicaux. Le mécanisme principal de décomposition de l'hydroperoxyde implique la scission de la double liaison adjacente au groupe hydroperoxyde, conduisant à la formation d'hydrocarbures, d'aldéhydes, d'alcools et de cétones volatiles dont certains dégagent des odeurs indésirables à très faible seuil. Il se forme également d'autres composés secondaires non volatils, notamment des aldéhydes non volatils, des triacylglycérols oxydés et leurs polymères (Laguerre et al., 2007a et b ; Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Une autre voie telle que la dimérisation entre deux radicaux peroxydes peut également se produire (phase de terminaison) (Michel et al., 2008).

4.2. Conséquences d'autoxydation des lipides

In vivo, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur déterminant dans le déclenchement de l'apoptose des cellules. Les lipoprotéines

telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les LDL oxydées sont fortement incriminées dans l'athérogenèse. De nombreuses autres pathologies sont associées à la peroxydation des lipides. C'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement... (Cillard et Cillard, 2006).

In vitro, l'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire qui utilise de plus en plus des acides gras hautement insaturés tels que ceux de la série n-3 (ω 3) très susceptibles à l'auto-oxydation. L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement), nutritionnelles (perte en vitamines) voir même une toxicité due aux produits issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes) (Cillard et Cillard, 2006). Les principaux effets de l'oxydation des lipides sur la qualité des aliments sont résumés sur la figure 13.

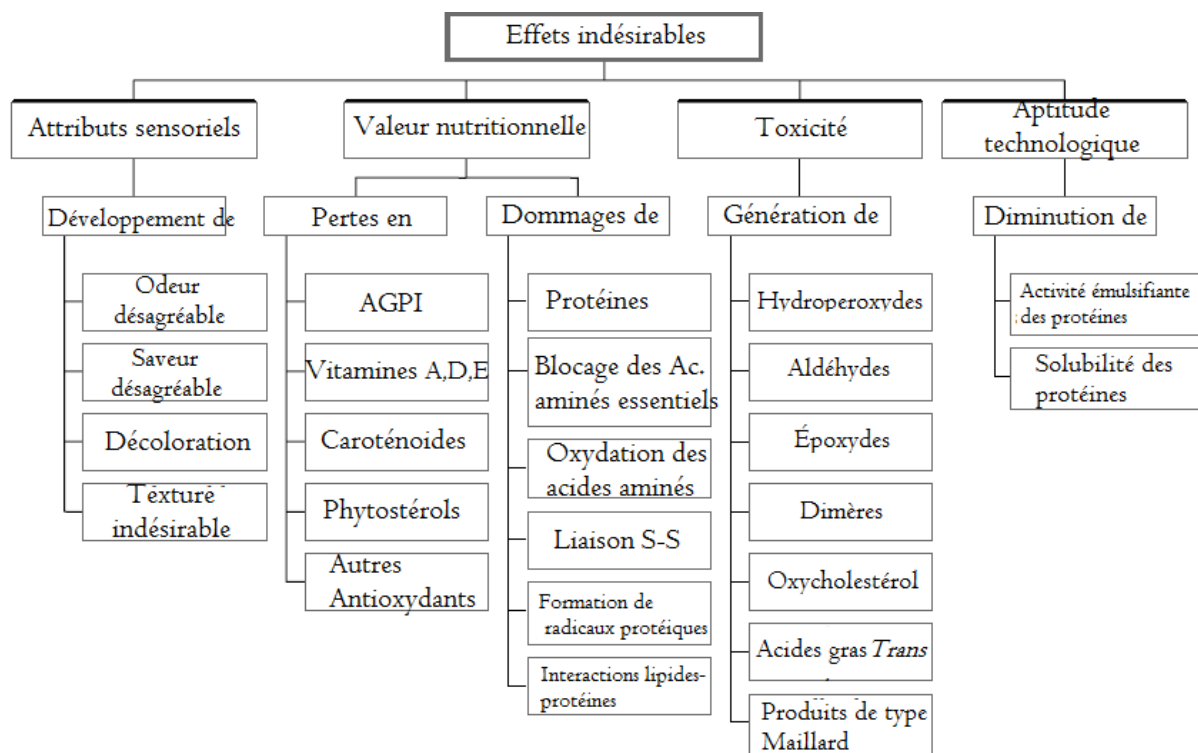


Figure 13. Effets de l'oxydation des lipides sur la qualité des aliments (Adapté de Kołakowska, 2003 par Bartosz et Kołakowska, 2011)

5. Antioxydants

Dans un environnement oxygéné, la menace du stress oxydatif est omniprésente et continue pour tous les organismes, mais les plantes photosensibilisantes responsables de notre environnement oxygène sont exposées à des niveaux intracellulaires d'oxygène et d'ERO

particulièrement élevés, ont développé des facteurs de défense spécialisés qui protègent les structures et les tissus des plantes. Ces facteurs sont appelés antioxydants (Benzie, 2000). Les antioxydants peuvent être définis comme des substances qui, lorsqu'elles sont présentes dans les aliments, retardent, contrôlent ou inhibent l'oxydation et la détérioration de la qualité des aliments. Dans le corps, les antioxydants réduisent le risque de maladies dégénératives résultant du stress oxydatif (Shahidi, 2015).

5.1. Types d'antioxydants

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation de deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation (Leger, 2006). Selon Buettner (Laguerre (2007b), les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être divisés en deux types :

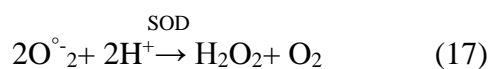
- **les antioxydants préventifs ou retardeurs**, qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$...) et
- **les antioxydants « chain breaking » ou briseurs de chaîne** qui interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique (lipoperoxyradicaux, ou LOO^{\cdot}) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation radicalaire en chaîne.

5.1.1. Antioxydants préventifs (ou retardeurs)

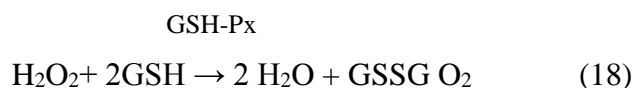
Il existe de nombreuses voies d'antioxydation « préventives » en raison de la diversité des initiateurs d'oxydation disponibles. Ces voies incluent la chélation des métaux de transition, la désactivation de l'oxygène singulet, la détoxification enzymatique des ERO, la filtration des UV, l'inhibition des enzymes prooxydantes, les cofacteurs des enzymes antioxydantes, etc. Nous ne décrivons ici que les plus connus (Laguerre et al., 2007a ; b).

a) La détoxification des ERO

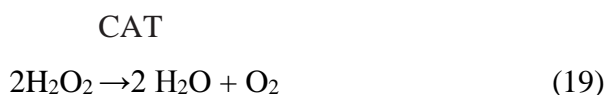
Elle constitue une voie de prévention primordiale de l'oxydation, principalement relayée par les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes. Tout d'abord, la superoxyde dismutase (SOD), une métalloenzyme (zinc, manganèse ou fer) ubiquitaire chez les eucaryotes catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Johnson et Giulivi, 2005 ; Laguerre et al., 2007a ; b).



La glutathion peroxydase (GSH-Px), une autre enzyme, ayant une activité de détoxification qui concerne trois espèces réactives : le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et peroxynitrite (ONOO). GSH-Px est une enzyme sélénodépendante contenant quatre atomes de sélénium situés, sous forme de sélénocystéine, au noyau actif de l'enzyme. En particulier, cette enzyme détoxifie le peroxyde d'hydrogène en accélérant la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique) par le peroxyde d'hydrogène, qui est alors réduit en eau (Laguerre et al., 2007a).



Une troisième enzyme, la catalase (CAT), a également comme substrat le peroxyde d'hydrogène qu'elle réduit en eau et en oxygène moléculaire. Cette enzyme héminique se produit principalement dans les peroxysomes et les érythrocytes (Laguerre et al., 2007a).



In vivo, il est classiquement admis qu'il existe une coopération étroite entre ces différentes enzymes. Ainsi, l'activité superoxyde dismutase conduit à la formation de peroxydes d'hydrogène dont la détoxification est alors prise en charge par le système catalase et/ou glutathion peroxydase (Laguerre et al., 2007a).

b) Les chélateurs de métaux de transition

Comme le cuivre et le fer peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Il s'agit de protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, ou encore la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le cuivre. Les polyphosphates, l'acide éthylènediaminetétracétique, l'acide citrique, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont également connus pour leur capacité à chélater les métaux de transition (Laguerre et al., 2007b). Il semblerait cependant que l'importance de ce type d'antioxydation dépende étroitement de la cible à protéger. Comparé à l'activité antiradicalaire par capture d'ERO, ce mode d'action serait mineur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique mais prédominant dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN (Dangles, 2006).

c) Désactivateurs de l'oxygène singulet

Selon [Buettner \(1999\)](#), ils peuvent agir par désactivation chimique en se fixant sur une molécule telle qu'un acide gras pour donner un hydroperoxyde (réaction 20) ou encore par désactivation physique éliminant l'énergie d'excitation sans changement chimique (réaction 21).



Les caroténoïdes sont, en l'état actuel de nos connaissances, les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet. Les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs comme les carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné tels que les xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) ([Krinsky, 1998](#)).

5.1.2. Antioxydants « chain breaking » ou mécanisme briseur de chaîne

Les antioxydants primaires, également appelés antiradicalaires, sont des molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques R^\bullet , RO^\bullet et ROO^\bullet par transfert d'un H° (réaction 22):



L'antioxydant devient alors lui-même porteur d'un radical, mais à la différence des radicaux lipidiques, il est peu réactif, ce qui stoppe la propagation radicalaire. Ce groupe d'antiradicalaires est constitué presque exclusivement de composés phénoliques en raison de la grande stabilité apportée par leur cycle aromatique. On trouvera ainsi dans ce groupe les additifs antioxydants, BHA, BHT, TBHQ, gallates, mais aussi les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols végétaux (flavonoïdes, acides phénoliques, diterpénoïdes) ([Berset, 2006](#)). Cette catégorie d'antioxydants va réagir le plus souvent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes, interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation. Il est à noter que ces antioxydants n'inhiberont pas par conséquent l'auto-oxydation des lipides par l'oxygène singulet. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes :

- a) les donneurs d'hydrogène :** C'est le cas le plus fréquent. Ils doivent avoir un potentiel de réduction inférieur au potentiel des AGPI ($E = 0,6 \text{ V}$) et doivent pouvoir donner un hydrogène au radical alcoxyde ($E = 1,6 \text{ V}$) et au radical peroxyde ($E = 1 \text{ V}$). Ces antioxydants sont principalement des composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés (tocophérols, tocotriénols, BHT, BHA, flavonoïdes...) avec diverses substitutions sur les noyaux. Après la réaction d'oxydation, l'antioxydant est transformé en un radical

qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant. Ces antioxydants introduisent une phase de latence ou « lag phase » pendant laquelle la peroxydation lipidique est très faible et qui persiste tant que l'antioxydant n'est pas consommé par les radicaux peroxydes. Après la disparition complète de l'antioxydant, la vitesse de la peroxydation augmente très rapidement (Cillard et Cillard, 2006).

- b) Les antioxydants « sacrifiés » :** le qualificatif de « chain breaking antioxidant sacrificial » employé par Buettner concerne des molécules, elles-mêmes radicalaires, qui réagissent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la propagation de la peroxydation. Deux radicaux sont connus pour se combiner avec les radicaux peroxydes : le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Cillard et Cillard, 2006).

6. Les antioxydants phénoliques

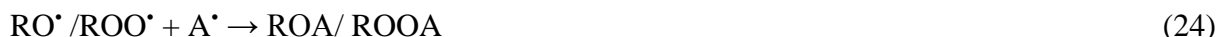
Les polyphénols sont de puissants antioxydants qui complètent et renforcent les fonctions des vitamines et des enzymes antioxydantes en tant que moyen de défense contre le stress oxydatif causé par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Tsao, 2010). En tant qu'antioxydants, les polyphénols peuvent protéger les constituants des cellules contre les dommages oxydatifs et, par conséquent, limiter le risque de diverses maladies dégénératives associées au stress oxydatif (Scalbert *et al.*, 2005).

Les phénols ont été largement étudiés et ont démontré qu'ils possédaient diverses bioactivités qui pourraient être bénéfiques pour la santé humaine. On sait qu'ils réduisent le risque de cancer (Yang *et al.*, 2001), de maladie cardiaque (Duthie *et al.*, 2006) et de diabète; ils inhibent l'agrégation plaquettaire plasmatique, l'activité de la cyclooxygénase (COX) (You *et al.*, 1999 ; Schubert *et al.*, 1999 ; Nurtjahja-Tjendraputra *et al.*, 2003) et la libération d'histamine, ainsi que pour exercer des activités antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires et anti-allergènes.

Les avantages de la plupart de ces affections découlent des propriétés antioxydantes des composés phénoliques; par conséquent, il est important de quantifier, d'identifier et d'évaluer leurs activités antioxydantes (Cevallos-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010).

6.1. Mécanisme d'action antioxydant

Les antioxydants phénoliques (AH) agissent comme accepteurs de radicaux libres et comme briseurs de chaîne. Ils interfèrent avec les radicaux lipidiques (R^\bullet / RO^\bullet / ROO^\bullet) par la donation rapide d'un atome d'hydrogène pour produire des dérivés lipidiques et des radicaux antioxydants (Réaction 23) (Kiokias *et al.*, 2008). Le radical libre antioxydant (A^\bullet) peut également interférer avec les réactions de propagation en chaîne (réactions 24 et 25).



Le radical phénoxy (AO^\bullet) est stabilisé par délocalisation de son électron non apparié autour du cycle aromatique (Fig. 14)

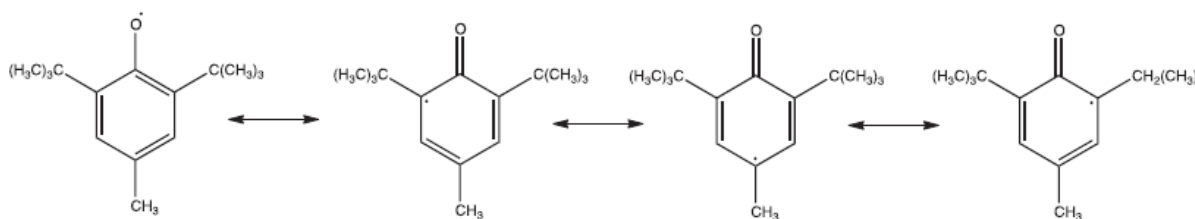


Figure 14. Stabilisation par résonance du radical phénoxy

La stabilité du radical phénoxy est encore accrue par des groupements volumineux aux positions 2 et 6 étant donné que ces substituants augmentent l'encombrement stérique dans la région du radical et réduisent ainsi davantage la vitesse de propagation des réactions impliquant le radical antioxydant (A^\bullet) (Réactions 26, 27, 28) (Shahidi *et Ambigaipalan*, 2015).



6.2. Mécanisme d'action prooxydant

L'effet de la concentration d'antioxydant sur les taux d'autoxydation dépend de nombreux facteurs, notamment la structure de l'antioxydant, les conditions d'oxydation et la nature de l'échantillon en cours d'oxydation (Shahidi & Naczk, 2004). Souvent des antioxydants phénoliques perdent leur activité à des concentrations élevées et se comportent comme des prooxydants (Gorden, 1990 ; Shahidi, 2015).



Chapitre IV :

Anticholinestérasés et antimicrobiens

1. Anticholinestérasés ou inhibiteurs de cholinestérasés

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative démentielle qui affecte principalement la population âgée. La MA se caractérise par une grave perte progressive de mémoire et d'autres habiletés cognitives menant à la démence (Uttara *et al.*, 2009 ; Sharma *et Ebadi*, 2014). La teneur élevée en acides gras oxydables, le taux élevé de consommation d'oxygène et le faible taux d'antioxydants sont les principales causes de la vulnérabilité du cerveau, en particulier des dommages oxydatifs dont l'implication a été mise en évidence dans le tissu cérébral post mortem ainsi que chez les patients atteints de MA (Tuppo *et Forman*, 2001).

De nombreux mécanismes biochimiques ont été proposés pour expliquer la neuropathologie de la MA, mais l'hypothèse cholinergique est la théorie la plus acceptée de nos jours. Il postule qu'au moins une partie du déclin cognitif observé par les patients atteints de MA résulte d'un déficit en acétylcholine, ou neurotransmission cholinergique (Hebert *et al.*, 1995 ; Davies, 1999 ; Craig *et al.*, 2011). Dans le cerveau en bonne santé, l'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme la plus importante régulant le taux d'acétylcholine cérébrale (ACh), tandis que la butyrylcholinestérase (BChE) joue un rôle mineur. Cependant, l'activité de BChE augmente progressivement chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) (Silver, 1974 ; Greig *et al.*, 2002 ; Lane *et al.*, 2006).

Malgré l'étiologie inconnue de la MA, l'élévation de la quantité d'acétylcholine par l'utilisation d'agents qui rétablissent le niveau d'acétylcholine en inhibant les deux formes principales des cholinestérasés (AChE et BChE) a été acceptée comme la stratégie de traitement la plus efficace contre la MA. Par conséquent, les inhibiteurs de cholinestérasés (IChE) et notamment de l'AChE sont devenus les alternatives remarquables dans le traitement de la MA (Giacobini, 2001). Cependant, les médicaments actuels (tacrine, rivastigmine et donezépil) avec une activité inhibitrice de l'AChE possèdent certains effets secondaires (Schneider, 2001). Néanmoins, De nombreuses recherches ont conduit à la découverte d'un nombre important de composés naturels, en particulier de métabolites secondaires de plantes ayant des activités antioxydantes et anti-cholinestérasiques (Fawcett *et al.*, 2002 ; Mukherjee *et al.*, 2007).

D'autres stratégies évaluées dans les essais cliniques pour le traitement de la MA incluent les antioxydants (neutralisation des radicaux libres), les agonistes muscariniques le remplacement d'œstrogènes, les agents anti-inflammatoires, les inhibiteurs de la monoamine-oxydase-B et les stratégies des β -amyloïdes (Sramek *et Cutler*, 2000 ; Sramek *et al.*, 2002).

1.1. Cholinestérasés

1.1.1. Définition et localisation

Les cholinestérasés est une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) en choline et acide acétique, une réaction nécessaire pour permettre au neurone cholinergique de revenir à son état de repos après activation. Cela implique deux types d'enzymes : L'acétylcholinestérase (AChE; EC 3.1.1.7) et la butyrylcholinestérase (BChE; EC 3.1.1.8) qui sont des sérine hydrolases, partageant environ 55% de l'identité de la séquence d'acides aminés et qui possèdent des propriétés catalytiques similaires, mais distinctes (Cygler *et al.*, 1993).

- Acétylcholinestérase (AChE, acétylcholine acétylhydrolase, E.C. 3.1.1.7) est présente en fortes concentrations dans de nombreux types de tissus conducteurs principalement dans les membranes des globules rouges, où il constitue l'antigène Yt du groupe sanguin ainsi que dans le cerveau au niveau des jonctions neuromusculaires et des synapses cérébrales cholinergiques (Massoulie *et al.*, 1993).
- Butyrylcholinestérase (BuChE, EC 3.1.1.8), également connu sous le nom de "pseudo" cholinestérase, cholinestérase plasmatique, butyrylcholinestérase, ou acylcholine acylhydrolase, est un type non spécifique d'enzyme cholinestérasique qui hydrolyse différents types d'esters de choline et qui est omniprésente dans tout le corps. Différent de l'AChE, la BuChE hydrolyse la butyrylcholine plus rapidement que l'ACh (Huang *et al.*, 2007). La BuChE est principalement plus importante dans le foie humain, le sérum sanguin, le pancréas et le système nerveux central. Dans le cerveau, la BuChE est principalement associée aux cellules gliales et aux cellules endothéliales (Kaplay, 1976 ; Jope *et al.* 1985).

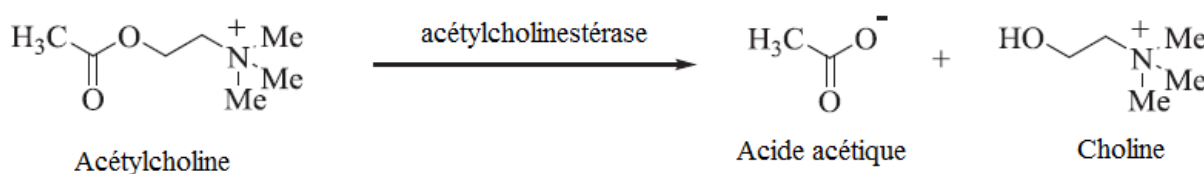


Figure 15. Hydrolyse de l'acétylcholine catalysée par l'acétylcholinestérase

1.1.2. Structure

L'AChE de *torpedo californica* a été la première dont la structure primaire a été déterminée. Quelques années plus tard, la structure primaire de l'AChE humaine a aussi été caractérisée. Sussman *et al.* en 1991 ont été les premiers à caractériser par diffraction des RX la structure tridimensionnelle de l'AChE de *torpedo californica*. Les structures primaires des

différentes AChE sont très proches : plus de 60% des résidus sont identiques entre l'AChE de *torpedo californica* et celle de mammifères, et en particulier au niveau du site actif. L'AChE de mammifères contient 543 résidus. Elle est cristallisée sous une forme homodimérique et constituée de 12 feuillets β entourant 14 hélices. (Kwasnieski, 2010). Nous ne parlerons par la suite que de l'AChE de mammifères, avec la numérotation des résidus associée

Les déterminants moléculaires de la perfection catalytique de l'AChE ont été élucidés grâce à d'extensives études de mutagenèse dirigée et au nombre considérable de structures cristallines d'AChEs natives ou en complexe avec différents inhibiteurs. Ainsi, il a pu être mis en évidence que l'AChE possédait deux sites de fixation, le site catalytique et le site périphérique. Le site actif est enfoui au fond d'une gorge profonde et étroite, à l'entrée de laquelle se trouve le site périphérique (Fig. 16) (Tōugu, 2001 ; Colletier, 2008 ; Kwasnieski, 2010).

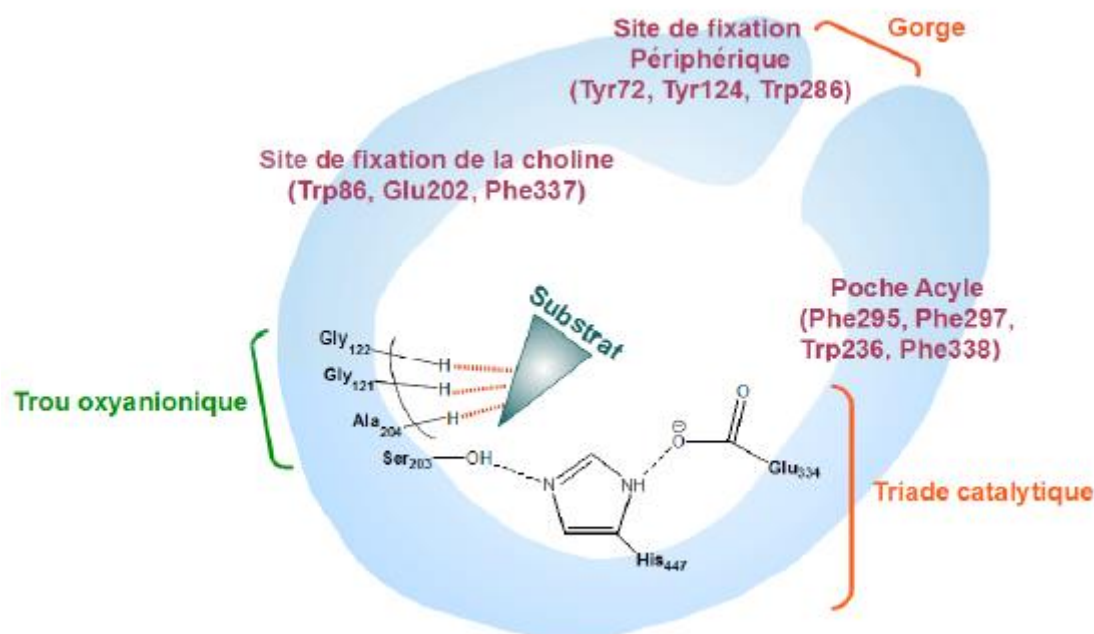


Figure 16. Représentation schématique du site actif de l'AChE

1.1.3. Site actif

Le site actif de l'AChE est principalement organisé autour de la triade catalytique constituée des résidus Ser203, His447 et Glu334 (Fig. 16). La fonction de ces résidus a été montrée par mutagenèse : si l'on remplace l'un de ces trois résidus par une alanine, une baisse importante de l'activité de l'enzyme est observée. Cette triade est similaire à celles des sérines hydrolases et protéases, dans lesquelles le glutamate est remplacé par un aspartate. La triade catalytique est au fond d'une étroite gorge de 20 Å de profondeur. Pour que l'hydrolyse ait lieu,

il faut donc que l'acétylcholine pénètre d'abord dans cette gorge et se positionne correctement vis-à-vis de la triade catalytique. Des interactions π -cations avec les résidus aromatiques qui tapissent la gorge facilitent la pénétration du substrat dans celle-ci (Kwasniewski, 2010).

Au-delà de la triade catalytique, trois principales régions peuvent être définies au niveau du site actif :

- Le sous-site anionique ou site de fixation de la choline est constitué du Trp86, Glu202 et Phe337. Il stabilise les charges positives, et notamment l'ammonium de l'acétylcholine par des interactions π -cations. Le Trp86 est particulièrement important dans la fixation du substrat puisque l'affinité de l'enzyme pour le substrat est divisée par 1000 lorsque le Trp86 est remplacé par une alanine. Par contre, si l'on remplace le Glu202 par une glutamine, l'activité de l'enzyme ne diminue que d'un facteur 5, ce qui semble montrer que le Glu202 n'a pas de rôle direct dans la catalyse.
- La poche acyle, région hydrophobe proche du site actif, permet de stabiliser la partie méthyle du groupe acyle et de délimiter la position du substrat. Elle est constituée des résidus Phe295, Phe297, Trp236, Phe338. Ceux-ci sont responsables de la sélectivité de l'AChE vis-à-vis de l'acétylcholine. En effet, du fait de l'encombrement stérique qu'ils induisent, seuls des groupements acétyl ou propanoyl peuvent venir s'y fixer. Ces résidus servent également à stabiliser l'His447, et participent donc par ce biais à l'efficacité catalytique de l'AChE.
- Le trou oxyanionique, composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, est une zone très importante pour la réactivité de l'AChE. Ces résidus établissent des liaisons hydrogènes avec le substrat, et stabilisent fortement l'intermédiaire acyl-enzyme, et la charge négative sur l'oxygène.

Une quatrième région peut également être définie. Il s'agit du site périphérique anionique qui se lie aux substrats cationiques, et notamment aux ligands trop gros pour pénétrer dans la gorge. Ce site est notamment constitué des résidus Tyr72, Tyr124 et Trp286. Il permet au substrat de se fixer avant de glisser vers le site actif où il sera hydrolysé (Kwasniewski, 2010).

1.1.4. Mécanisme catalytique de l'AChE

La première étape de la catalyse enzymatique serait la fixation du substrat sur ce site, d'où il glisserait ensuite vers le site actif pour être hydrolysé. Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases, conservé, est le suivant (Fig. 17) :

- a. Après fixation du substrat dans le site actif, la sérine catalytique, nucléophile, attaque son groupement carbonyle et forme un complexe nommé *intermédiaire tétraédrique*. Le noyau imidazole de l'histidine catalytique, en constante liaison hydrogène avec l'hydroxyle de la sérine catalytique, prend en charge le proton libéré par cette dernière et forme ainsi un ion imidazolium (catalyse basique générale). La protonation de l'histidine catalytique sera maintenue jusqu'à la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique. L'arrachement du proton de la sérine catalytique par l'histidine homonyme est favorisé par la polarisation induite par le troisième partenaire, désolvaté, de la triade catalytique, *i.e.* un acide aspartique ou glutamique, qui reste également en constante liaison hydrogène avec ladite histidine. L'intermédiaire tétraédrique a une existence bien définie, quoique transitoire, et a pu être observé cristallographiquement grâce à l'utilisation d'analogues de substrat, tant sur l'AChE que sur d'autres membres de la famille des sérines hydrolases, par exemple l'élastase.
- a. L'intermédiaire tétraédrique se décompose rapidement en un intermédiaire « enzyme acylée » et un groupement partant. Dans le cas de l'AChE, c'est la portion choline (Ch) du substrat ACh qui est libérée après acylation de la sérine catalytique. La force d'entraînement qui mène à la formation de cet intermédiaire est le don d'un proton, par l'histidine catalytique, au groupement partant, *i.e.* à la Ch.
- b. L'intermédiaire « enzyme acylée » est enfin dégradé *via* un processus inverse à celui qui a mené à sa formation ; cette fois-ci, c'est une molécule d'eau, nucléophile, qui attaquera la sérine catalytique, permettant par ailleurs la reprotonation de l'histidine homonyme. Cet événement sera suivi par la libération du produit acétate, dans le cas de l'AChE, ou d'un autre carboxylate, dans le cas plus général des sérines hydrolases (Tōugu, 2001 ; Colletier, 2008).

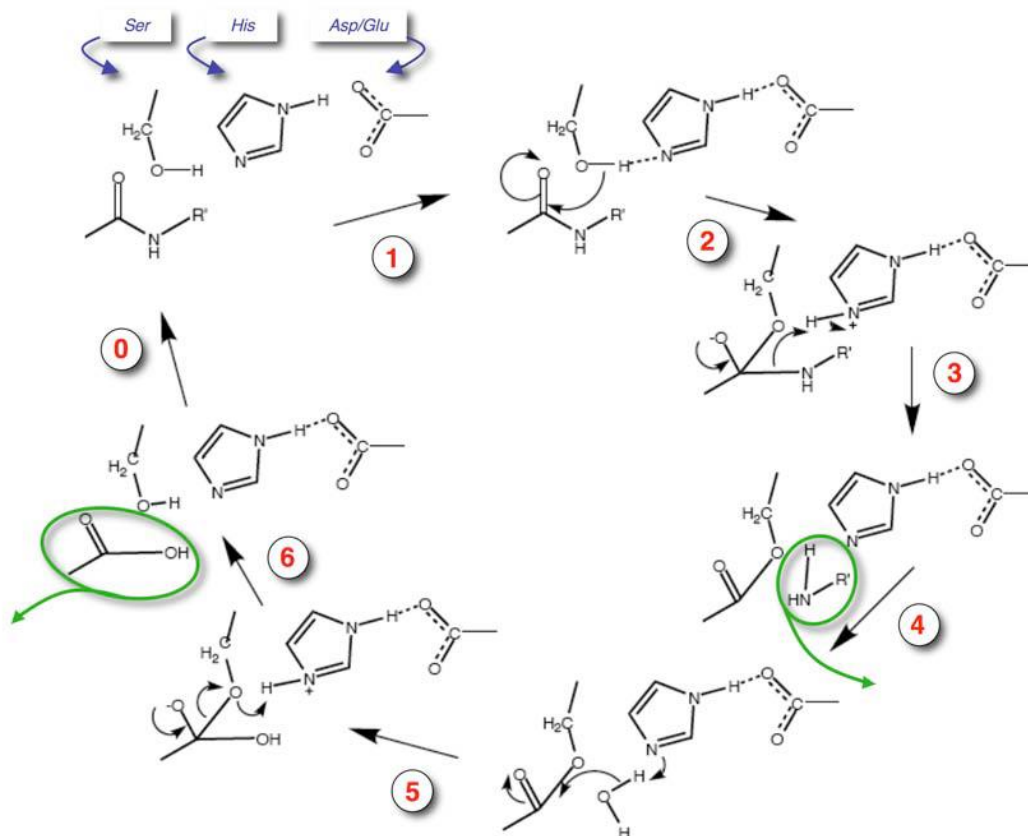


Figure 17. Schéma général d'hydrolyse par une sérine hydrolase (Colletier, 2008)

On peut considérer les étapes suivantes : (0) Formation du complexe michaëlien ; (1) Attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le substrat ; (2) Formation du 1^{er} intermédiaire tétraédrique ; (3) Libération du 1^{er} produit ; (4) Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la sérine acylée ; (5) Formation du 2^{ème} intermédiaire tétraédrique ; (6) Libération du 2^{ème} produit.

1.2. Inhibiteurs des cholinestérasés (IChE)

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont largement utilisés comme pesticides, agents thérapeutiques dans plusieurs maladies et, malheureusement, comme arme en guerre chimique (Tōugu, 2001 ; Pope et al., 2005). Les inhibiteurs des cholinestérasés (IChE) ou anticholinestérasés font partie du groupe de composés chimiques, naturels ou synthétiques, capables d'inhiber l'activité hydrolytique des cholinestérasés augmentant à la fois le niveau et la durée de l'action des neurotransmetteurs. Les inhibiteurs connus se distinguent par la sélectivité pour AChE et BChE, le mécanisme d'inhibition et la réversibilité (Camps et al., 2002 ; Pohanka, 2011).

1.2.1. Mécanisme d'action des anticholinestérases

En accord avec son rôle physiologique clé, l'AChE est la cible d'une gamme très large de molécules actives, parmi lesquelles autant de toxines naturelles que de poisons de confection humaine. Les différents inhibiteurs de l'AChE interagissent soit directement dans son site actif, et dans ce cas, en se liant de façon covalente (inhibition irréversible) ou non-covalente (inhibition réversible) ; soit au niveau de son site périphérique (inhibition réversible). L'inhibition irréversible de l'AChE entraînera, d'une façon générale, la mort de l'individu concerné ; mais son inhibition réversible, si elle est maîtrisée, peut être bénéfique (Colletier, 2008).

1.2.2. Classification des inhibiteurs de l'acetylcholinesterase

Les inhibiteurs de la cholinestérase connus peuvent être classés en fonction de plusieurs aspects (Štěpánková et Komers, 2008).

a. Structure chimique

- dérivés de la pipéridine (donépézil)
- carbamates (rivastigmine, physostigmine, eptastigmine)
- alcaloïdes (galantamine, huperzine)
- acridines (tacrine)
- organophosphorés (métrifonate).

b. Type et durée d'effet

Selon le mode d'action, les inhibiteurs de l'AChE peuvent être divisés en deux groupes : irréversibles et réversibles. Les inhibiteurs réversibles, compétitifs ou non compétitifs, ont pour la plupart des applications thérapeutiques, tandis que les effets toxiques sont associés à des modulateurs de l'activité AChE irréversibles (Imbimbo, 2001 ; Pohanka, 2008 ; Čolović et al., 2013).

b.1. Inhibiteurs réversibles

Des agents réversibles ou à action brève, tels que la tacrine et le donépézil, interagissent avec une enzyme proche de son site catalytique, sans produire de complexe covalent. Ils se lient à l'enzyme en utilisant des liaisons faibles, similaires à celles utilisées pour la liaison du substrat. Ces liens se forment rapidement mais se rompent facilement. En conséquence, les inhibiteurs réversibles ont effectivement une action instantanée, mais ne désactivent pas l'enzyme de manière permanente. Les durées d'action de ces agents sont très courtes (seulement quelques minutes) (Štěpánková et Komers, 2008).

Plusieurs inhibiteurs de l'AChE réversibles sont étudiés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, seuls la tacrine (1), le donezepil (2), la rivastigmine (3) et la galanthamine (4) (Fig. 18) ont été approuvés par la Food and Drug Administration aux États-Unis (Zarotsky *et al.*, 2003). Cependant, ces médicaments possèdent certains effets secondaires (Schneider, 2001).

a) Tacrine

La drogue synthétique de tacrine (Cognex) a été le premier IChE à être homologué, mais son utilisation systématique a été largement limitée en raison de son hépatotoxicité (Watkins *et al.*, 1994).

b) Donépézil

Donépézil a été développé afin de surmonter les inconvénients de la physostigmine et de la tacrine, et plus tard approuvé par la FDA pour le traitement de la MA. Il est hautement sélectif pour l'acétylcholinestérase avec une affinité significativement plus faible pour la butyrylcholinestérase (Racchi *et al.*, 2004).

c) Rivastigmine

La rivastigmine est un inhibiteur carbamylisant pseudo-réversible de l'acétylcholinestérase qui, dans les études biochimiques précliniques, a montré une sélectivité importante du système nerveux (Racchi *et al.*, 2004).

d) Galantamine

La galanthamine, un alcaloïde des plantes de la famille des Amaryllidacées, est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (IChE) sélectif, réversible, compétitif et à longue durée d'action. Ce composé est considéré comme plus efficace dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) et possède moins de limitations que la physostigmine et la tacrine (Gordon *et al.*, 2000 ; Rhee *et al.*, 2001).

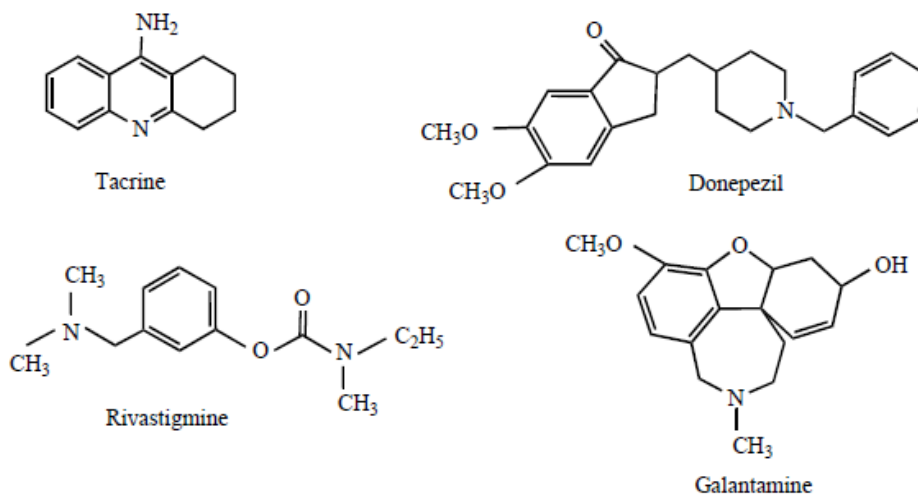


Figure 18. Structure de quelques inhibiteurs réversibles

b. Inhibiteurs pseudo-irréversibles

Les inhibiteurs pseudo-irréversibles ou à action intermédiaire se lient de manière covalente à l'enzyme. La liaison covalente se décompose lentement et la molécule d'enzyme redevient disponible. Cette classe des IChE comprend un groupe de carbamates (Štěpánková et Komers, 2008).

Les carbamates sont des composés organiques dérivés de l'acide carbamique (NH₂COOH). La structure des carbamates biologiquement actifs est illustrée sur la figure 19, où X peut représenter un atome d'oxygène ou de soufre (thiocarbamate), R₁ et R₂ représentent généralement des substituants organiques ou alkyle, mais R₁ ou R₂ peuvent également représenter un atome d'hydrogène et R₃ est principalement un substituant organique ou parfois un métal (Ćolović et al., 2013).

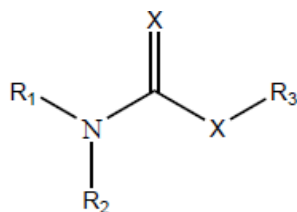


Figure 19. Structure chimique générale des carbamates biologiquement actifs

Ils forment un complexe carbamyle avec le résidu sérine de la triade catalytique d'AChE, qui est hydrolysée spontanément à une vitesse plus lente que la forme acylée résultant de l'interaction avec l'ACh (temps de décarbamylation : 30-40 minutes) (Darvesh et al., 2008 ; Jokanović, 2009 ; Vale et Lotti, 2015).

Le prototype de cette classe de composés est la physostigmine, qui a été le premier inhibiteur de l'AChE à faire l'objet d'études cliniques pour le traitement de la MA. De nombreux autres carbamates (eptastigmine, quilstigmine, phensérine, tolsérine, par exemple) ont été testés pour leur activité anticholinestérase, mais seule la rivastigmine le métabolite secondaire de la plante *Physostigma venenosum* a été approuvée par le FDA (Camps et Muños-Torrero, 2002).

En plus de leur utilisation en tant que médicaments thérapeutiques en médecine, ces inhibiteurs réversibles de l'AChE ont été appliqués sous forme de pesticides en agriculture (Fukuto, 1990).

b.3. Inhibiteurs irréversibles

Les agents à action prolongée ou les inhibiteurs irréversibles sont également appelés inactivateurs d'enzymes. Cette classe comprend certains organophosphates (OP) et leur effet inhibiteur est basé sur la phosphorylation ou la phosphonylation du groupe hydroxyle de la sérine au site estérasique du site actif de l'enzyme (Fig. 20). L'enzyme phosphorylée subit deux réactions : une réactivation spontanée et une désalkylation, appelée vieillissement. L'enzyme vieillie ne peut plus être réactivée spontanément. La déphosphorylation est encore plus lente que la décarbamylation (Štěpánková et Komers, 2008).

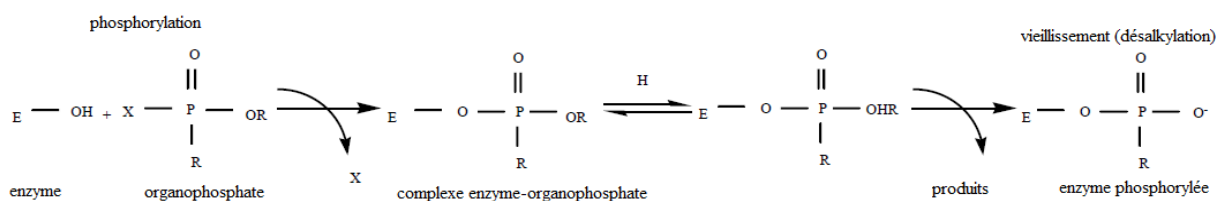


Figure 20. Étapes de l'interaction d'une estérase avec un inhibiteur organophosphoré. Mécanisme de la phosphorylation de la cholinestérase et de la désalkylation de l'enzyme phosphorylée (Brufani et Filocamo, 2000).

Les OP sont des esters ou des thiols dérivés d'acide phosphorique, phosphonique, phosphinique ou phosphoramidique (Fig. 21).

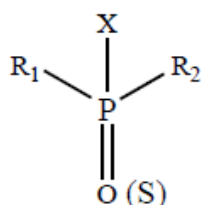


Figure 21. Formule structurelle générale des organophosphorés

R1 et R2 sont des groupes aryle ou alkyle liés à l'atome de phosphore. Le groupe -X, peut appartenir à une large gamme de groupes halogène, aliphatiques, aromatiques ou hétérocycliques. Ce «groupe partant» est libéré de l'atome de phosphore lorsque l'OP est hydrolysé par des phosphotriestérasés ou lors d'une interaction avec des cibles protéiques. En médecine et en agriculture, le terme «organophosphates» désigne un groupe d'insecticides et d'agents neurotoxiques qui inhibent l'AChE (Fukuto, 1990 ; Bajgar, 2004 ; Ćolović *et al.*, 2013). Les OP exercent leurs principaux effets toxicologiques par une phosphorylation irréversible des estérasés dans le système nerveux central. Les effets toxiques aigus sont liés à l'inactivation irréversible de l'AChE. En fait, les OP sont des analogues de substrat à l'ACh et, comme un substrat naturel, entrent dans le site actif en se liant de manière covalente au groupe sérine-OH. Comme dans l'acétylation, l'OP est scindé et l'enzyme est phosphorylée (Fig. 6). Alors que l'enzyme acyle est rapidement hydrolysée pour régénérer l'enzyme libre, la déphosphorylation est très lente (de l'ordre de quelques jours) et une enzyme phosphorylée ne peut pas hydrolyser le neurotransmetteur (Jokanović, 2009 ; Vale et Lotti, 2015). L'inhibition de l'enzyme entraîne une accumulation d'ACh dans la fente synaptique, ce qui entraîne une stimulation excessive des récepteurs ACh nicotiques et muscariniques et une neurotransmission entravée. Les symptômes typiques d'une intoxication aiguë sont l'agitation, la faiblesse musculaire, les fasciculations musculaires, le myosis, l'hypersalivation, la transpiration. Les intoxications graves peuvent provoquer une insuffisance respiratoire, une perte de conscience, une confusion mentale, des convulsions et / ou la mort (Jokanović, 2009 ; Vale et Lotti, 2015). Les agents neurotoxiques, tels que le sarin, le soman, le tabun et certains composés hautement toxiques, utilisés autrefois comme pesticides (paraaxon, parathion, malaaxon, malathion) en sont des exemples (Pohanka, 2014).

1.3. Classes chimiques d'anticholinestérasés dérivés de plantes

Barbosa Filho *et al.* (2006) ont revu 260 molécules naturelles chimiquement définies dans la littérature, qui ont été évaluées pour leur activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase. Les composés testés, isolés et identifiés, appartiennent aux classes des alcaloïdes (139), des monoterpènes (27), des coumarines (18), des triterpènes (17), des flavonoïdes (14), benzénoïdes (13), diterpènes (8), hétérocycles oxygénés (5), sesquiterpènes (5), stilbènes (3), lignanes (2), composés soufrés (2), protéïdes (2), polycycliques (1), quinoïdes (1), benzoxazinone (1), caroténoïde (1) et alycycloïque (1) Dans une autre revue, Ahmed *et al.* (2013) ont rapporté 119 composés ayant une activité anti-AChE et 67 composés ayant une activité anti-BChE. La majorité de ces composés phytochimiques ayant une activité inhibitrice potentielle de l'AChE

et de la BChE sont des alcaloïdes, suivis des terpènes, des stérols, des flavanoïdes et des glycosides. Les alcaloïdes triterpénoïdes, les alcaloïdes stéroïdiens, les alcaloïdes indoliques, l'alcaloïde d'isoquinoline et l'alcaloïde de type lycopodane sont les principaux types d'alcaloïdes ayant une activité anticholinestérase significative qui en font des candidats prometteurs à utiliser comme inhibiteurs de la cholinestérase dans la pratique clinique.

La plupart des composés ayant une activité anticholinestérasique potentielle sont isolés d'Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae et Fumariaceae, Buxaceae, Amaryllidaceae, Lycopodiaceae, Lamiaceae, Chenopodiaceae, Papaveraceae, Apocynaceae. Ces trois dernières sont les familles importantes ayant des composés potentiels à utiliser comme inhibiteurs de l'anticholinestérase. Étant donné que la plupart des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont connus pour contenir de l'azote, l'activité supérieure de ces extraits peut être due à leur contenu alcaloïde riche. Les alcaloïdes sont les principaux composés isolés de ces espèces et présentent une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer plus avant les actions de ces alcaloïdes dans la recherche d'un traitement prometteur pour la MA (Barbosa Filho *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2013).

2. Antimicrobiens

Les HE et autres extraits de plantes aromatiques et médicinales sont connus de manière empirique pour leurs propriétés antimicrobiennes depuis l'Antiquité, qui n'ont pas été scientifiquement prouvés avant le début du XXe siècle. On croit que De La Croix en 1881 fut la première personne à effectuer une analyse antimicrobienne des vapeurs d'HE. Depuis de nombreuses autres recherches sur la composition chimique et les activités antimicrobiennes des HE ont été largement rapportées (Cowan, 1999 ; Burt 2004 ; Saad *et al.*, 2013).

Les recherches sur les activités antimicrobiennes, le mode d'action et les utilisations potentielles des huiles volatiles et des extraits de plantes ont repris de la vigueur. Il semble y avoir un regain d'utilisation des méthodes traditionnelles comme alternatives potentielles aux antibiotiques, aux conservateurs chimiques dans les aliments (Holley et Patel, 2005 ; Gutierrez *et al.*, 2009 ; Calo *et al.*, 2015) et les cosmétiques (Maccioni *et al.*, 2002 ; Kunicka-Styczynska *et al.*, 2009 ; Herman *et al.*, 2013) et dans le traitement de diverses maladies infectieuses (Mabona *et al.*, 2013 ; Orchard et van Vuuren, 2017) au cours des quatre dernières décennies. Cela est particulièrement vrai en ce qui concerne les huiles volatiles de plantes et leur évaluation antimicrobienne, comme le montre la gamme complète d'organismes contre lesquels les huiles volatiles ont été testées.

2.1. Principaux groupes de composés antimicrobiens dérivés de plantes

La plupart des plantes contiennent plusieurs composés dotés de propriétés antimicrobiennes pour la protection contre les agents agresseurs, en particulier les microorganismes. Selon [Cowan \(1999\)](#), les composés bioactifs antimicrobiens des plantes sont divisés en 5 classes principales consistant en : terpénoïdes et huiles essentielles ; composés phénoliques et polyphénols ; alcaloïdes ; polypeptides et mélanges (extrait brut). Des exemples de certains composés antimicrobiens ainsi que leurs mécanismes antimicrobiens sont expliqués dans le tableau 7.

Tableau 7 : Principaux groupes de composés de plantes avec leurs mécanismes antimicrobiens (Cowan, 1999).

Classe	Sous-classe	Exemples	Mécanisme	
Composés phénoliques	Phénols Simples	Catéchol	Dépravation en substrat	
		Epicatéchine	Rupture de la membrane	
	Acides phénoliques	Acide cinnamique	?	
	Quinones	Hypéricine	Adhésion liaison, complexe avec la paroi cellulaire, inactivation d'enzyme	
	Flavonoïdes	Chrysine	Adhésion liaison	
	Flavones	–	Complexe avec la paroi cellulaire	
		Abyssinone	Inactivation d'enzyme Inhibition du HIV inverse transcriptase	
	Flavonols	Totarol	?	
	Tannins	Ellagitannins		Liaison protéine
				Adhésion liaison
			Inhibition d'enzyme	
			Dépravation en substrat	
			Complexe avec la paroi cellulaire	
			Rupture de la membrane	
Coumarines	Coumaphène ou warfarine		Complexation des ions métalliques	
			Interaction avec AND des eucaryotes (activité antiviral)	
Terpénoïdes, huiles essentielles	–	Capsaïcine	Rupture de la membrane	
Alcaloïdes	–	Berbérine	Intercalation dans la paroi cellulaire et/ou ADN	
		Pipérine		
Lectines and polypeptides	–	Agglutinine spécifique du mannose	Blocage de la fusion ou de l'adsorption of virale	
		Falxatin	Formation des ponts disulfures	
Polyacétylènes	–	8s-heptadeca2(Z), 9(Z)-diene4 ,6-diyne-1,8-diol	?	

2.2. Mécanisme d'action antimicrobienne

Les mécanismes d'action des composés naturels sont liés à la désintégration de la membrane cytoplasmique, à la déstabilisation de la force proton-motrice (FPM), au flux d'électrons, au transport actif et à la coagulation du contenu cellulaire. Tous les mécanismes d'action ne fonctionnent pas sur des cibles spécifiques et certains sites peuvent être affectés par d'autres mécanismes (Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002 ; Burt, 2004 ; Cushnie et Lamb, 2005). Le mécanisme d'action antimicrobien semble avoir un lien avec un grand nombre de constituants complexes notamment dans les HE, au lieu de métabolites bioactifs spécifiques, ce qui peut entraîner des modes d'action différents et une identification difficile du point de vue moléculaire (Burt, 2004).

En général, les actions antimicrobiennes des HE sont décrites en trois phases (Ultee *et al.*, 2002 ; Carson *et al.*, 2002 ; Burt 2004 ; Turina *et al.*, 2006).

- Premièrement, la propagation des HE dans la paroi cellulaire d'une bactérie grâce aux composants hydrophobes, améliore la perméabilité de la membrane, ce qui entraîne une perturbation et la perte ultérieure de composants cellulaire.
- La seconde correspond à une acidification à l'intérieur de la cellule qui bloque la production d'énergie cellulaire (ATP) en raison de la perte d'ions, de l'effondrement des pompes à protons et de la réduction du potentiel de la membrane (Fig. 22). En effet, Les hydrocarbures cycliques agissent sur les ATPases, des enzymes connues pour être situées au niveau de la membrane cytoplasmique et entourées de molécules lipidiques. De plus, les hydrocarbures lipidiques peuvent fausser l'interaction lipide-protéine et l'interaction directe de composés lipophiles avec des parties hydrophobes de la protéine est également possible.
- La dernière mais non le moindre est la destruction du matériel génétique qui entraîne la mort de la bactérie. De plus, certaines études ont montré que les HE pouvaient également coaguler avec le cytoplasme et endommager les lipides, les protéines, les parois cellulaires et les membranes, ce qui pouvait entraîner une fuite de macromolécules et la lyse ultérieure. De plus, Certaines huiles essentielles stimulent la croissance des pseudo-mycéliums, démontrant qu'ils peuvent agir sur les enzymes impliquées dans la synthèse des composants structurels de la bactérie (Sikkema *et al.*, 1994 ; Sikkema *et al.*, 1995 ; Helander *et al.*, 1998 ; Cox *et al.*, 2000 ; Lambert *et al.*, 2001 ; Di Pasqua *et al.*, 2006 ; Turgis *et al.*, 2009 ; Saad *et al.*, 2013).

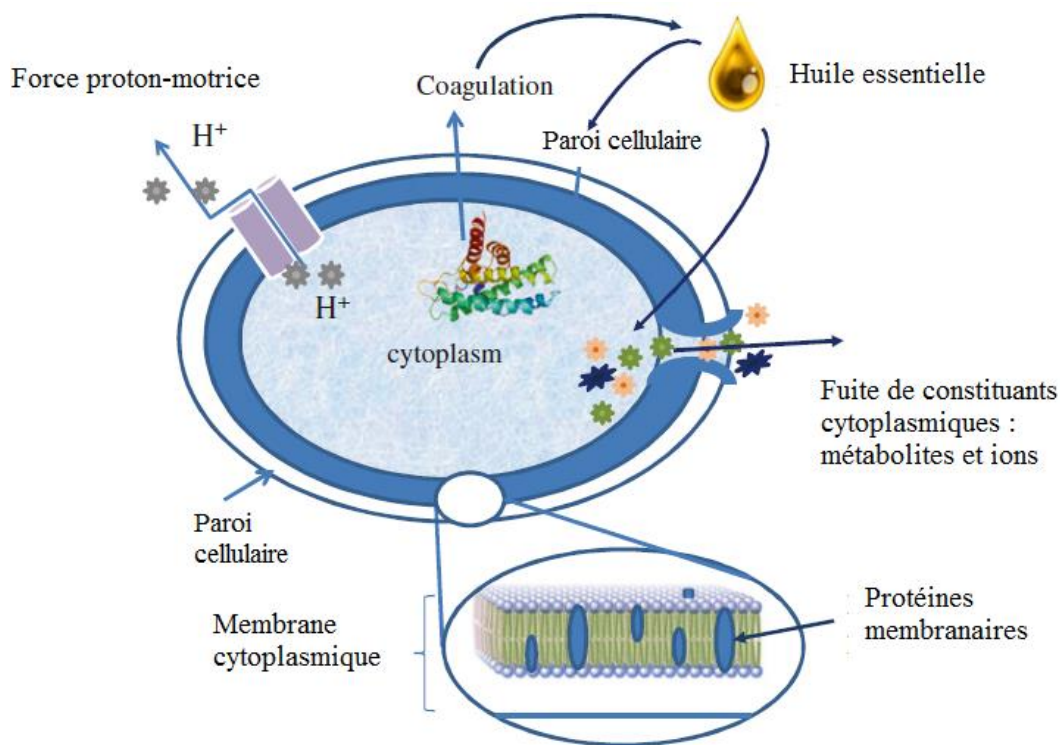


Figure 22. Sites d'une bactérie dans lesquels des composés naturels sont actifs (Burt, 2004)

2.3. Facteurs influençant la détermination de l'activité antimicrobienne

Premièrement, il est important de souligner qu'outre la nécessité de développer et de mettre en œuvre des tests standardisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits, la majorité des techniques appliquées à la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et extraits *in vitro* ont été adaptées de l'évaluation des activités antibiotiques (Hammer *et al.*, 1999 ; Burt, 2004 ; Ríos et Recio, 2005 ; NCCLS, 2006). Les difficultés rencontrées pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sont bien connues et sont principalement dues à ses propriétés volatiles ainsi qu'à leur insolubilité dans l'eau. Leur nature hydrophobe et leur viscosité élevée sont particulièrement importantes, ce qui entraîne une distribution irrégulière dans tout le milieu de culture ainsi qu'une dilution inégale. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser un agent dispersant afin d'empêcher la distribution irrégulière de l'HE dans le milieu de culture. Plusieurs caractéristiques sont distinguées comme facteurs clés dans l'évaluation de l'activité des huiles essentielles ; la composition du milieu de culture, la technique de dosage, l'espèce microbienne à étudier, la méthode d'extraction, la valeur du pH, la solubilité de l'huile essentielle dans le milieu de culture et la température, entre autres (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2007 ; Faleiro, 2011). Certains de ces facteurs seront examinés ultérieurement.

2.3.1. La technique de dosage

Différents types de tests ou méthodes de laboratoire d'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une huile essentielle, d'un extrait ou d'un composé pur sont utilisés et le choix de chaque technique semble être effectué en fonction de plusieurs caractéristiques, à savoir la demande, la technique et le coût. On distingue généralement trois types de méthodes les plus connues qui sont la diffusion, la dilution et les techniques bioautographiques (Manou *et al.*, 1998 ; Burt, 2004 ; Wilkinson, 2006 ; Saad *et al.*, 2013 ; Balouiri *et al.*, 2016). D'autres méthodes sont utilisées comme la micro-atmosphère et la technique des aliments empoisonnés notamment employée pour les tests antifongiques. Pour approfondir l'effet antimicrobien d'un agent en profondeur, il est recommandé d'effectuer un test de destruction du temps et des méthodes cytofluorométriques en flux fournissant des informations sur la nature de l'effet inhibiteur (bactéricide ou bactériostatique) (dépendant du temps ou de la concentration) et des dommages infligés au microorganisme à tester (Balouiri *et al.*, 2016).

a. La méthode de la diffusion en gélose

La diffusion sur gélose est l'une des plus utilisées et se caractérise par une grande simplicité et une rentabilité élevée. Dans cette technique, plusieurs réservoirs de l'agent antimicrobien (huile essentielle ou extrait) peuvent être utilisés. La technique la plus courante consiste à utiliser des disques en papier filtre (Kim *et al.*, 1995 ; Senatore *et al.*, 2000 ; Cimanga *et al.*, 2002 ; Burt et Reinders, 2003 ; Baydara *et al.*, 2004 ; Faleiro *et al.*, 2005 ; Chorianopoulos *et al.*, 2007), ou des cylindres en acier inoxydable répartis sur la surface du milieu gélosé. Des trous ou puits perforés dans le milieu gélose peuvent également être utilisés comme réservoirs de l'huile essentielle ou de l'extrait (Baratta *et al.*, 1998 ; Dorman et Deans, 2000 ; Abdollahzadeh *et al.*, 2014). Dans tous les cas, la quantité d'huile et le diamètre du réservoir sont des paramètres cruciaux. Le réservoir contenant l'agent antimicrobien à évaluer, après avoir été en contact avec le milieu inoculé et la période d'incubation requise, le diamètre de la zone transparente autour du réservoir (zone d'inhibition) est mesuré. Cette méthode a d'abord été conçue pour évaluer les propriétés antibiotiques d'extraits bruts. Alors que la méthode de diffusion en gélose peut être considérée comme très précise dans la détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, plusieurs aspects moins favorables peuvent être soulignés, tels que les caractéristiques volatiles des composants de l'huile essentielle entraîneront leur perte, simultanément avec le solvant pendant l'incubation, tandis que les composés moins solubles peuvent ne pas diffuser de manière appropriée à travers le milieu de culture (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004 ; Balouiri *et al.*, 2016).

Les paramètres à prendre en compte incluent le diamètre du disque ou du cylindre / trou, la quantité d'huile et le solvant ou l'émulsifiant utilisé. Ce dernier facteur semble différer de manière significative entre les études et plusieurs substances ont été utilisées notamment l'éthanol (Marino *et al.*, 2001 ; Vagi *et al.*, 2005 ; Zarai *et al.*, 2011), le Tween-20 (Hammer *et al.*, 1999), le Tween-80 (Cosentino *et al.*, 1999 ; Mourey et Canillac, 2002 ; Knowles *et al.*, 2005), le méthanol (Güllüce *et al.*, 2003 ; Rasooli *et al.*, 2006 ; Bajpai *et al.*, 2007) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Hili *et al.*, 1997 ; Candan *et al.*, 2003 ; Celiktas *et al.*, 2007 ; Kivrak *et al.*, 2009). Une importance particulière doit être accordée à l'utilisation de concentrations sûres de solvant ou d'émulsifiant afin de ne pas perturber la croissance microbienne. Un autre aspect à prendre en compte est d'avoir un contrôle négatif (tel que de l'eau stérile ou un solvant).

Le degré d'activité de l'huile essentielle (ou l'extrait) est révélé par la taille de la zone d'inhibition qui est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition mentionnée (en mm ou en cm) et le diamètre du disque / trou / cylindre est généralement inclus. En raison de la nature simple de ce test et de la quantité réduite d'huile essentielle requise, l'utilisation de cette technique est généralement recommandée pour l'évaluation de nombreuses huiles essentielles (et/ou extraits), et elle met en évidence celles qui présentent la plus haute activité permettant de les soumettre davantage caractérisation en profondeur. Cette technique est également utilisée pour déterminer la susceptibilité d'une gamme significative d'espèces microbiennes à une huile essentielle particulière. Cependant, cette technique convient moins à des fins de quantification, telles que la détermination des valeurs de CMI et de CMB. Les techniques nécessitant une dispersion homogène dans l'eau (méthode de la dilution ; en gélose ou en milieu liquide) sont généralement appliquées afin de déterminer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) par analyse de la courbe de croissance par comparaison avec la culture cultivée en l'absence de l'huile essentielle (culture témoin). Les paramètres CMI et CMB sont largement utilisés dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, mais des différences significatives ont été constatées quant à leur définition précise (Lambert *et al.*, 2001 ; Kalemba et Kunicka, 2003 ; Hood *et al.*, 2003 ; Burt, 2004 ; Saad *et al.*, 2013 ; Balouiri *et al.*, 2016).

b. La méthode de dilution en gélose ou en milieu liquide

La méthode de dilution en gélose ou en milieu liquide est utilisée à la fois pour les bactéries et les champignons (Chandrasekaran et Venkatesalu, 2004 ; Prabuseenivasan *et al.*,

2006 ; Tohidpour *et al.*, 2010). Les volumes de bouillon de culture supplémentés avec différentes concentrations en huiles essentielles varient considérablement, mais on a actuellement tendance à utiliser des volumes réduits variant de 1 à 5 ml (Dimitrijević *et al.*, 2007 ; Rasooli *et al.*, 2006) à 10 ml (Bachir *et Benali*, 2012).

L'utilisation de méthodes basées sur les microdilutions est plus intense et semble être très appropriée pour la détermination des valeurs de CMI et de CMB (Burt *et Reinders*, 2003 ; Tepe *et al.*, 2005 ; Jiang *et al.*, 2012 ; Ballester-Costa *et al.*, 2013). L'efficacité de l'activité antimicrobienne lorsque cette méthode est appliquée à la fois à l'aide de tubes ou de microplaques est vérifiée par le changement de densité optique (DO) (Devienne *et Raddi*, 2002), par colorimétrie en utilisant des indicateurs (généralement des sels de tétrazolium ou un colorant à la résazurine) (Salie *et al.*, 1996 ; Umeh *et al.*, 2005). Cette méthode peut être réalisée dans des conditions contrôlées de vapeur (Mondello *et al.*, 2009).

c. Bioautographie

La méthode bioautographique est particulièrement appliquée à l'évaluation d'extraits de plantes (Marston *et Hostettmann*, 1999 ; Nostro *et al.*, 2000 ; Schmourlo *et al.*, 2004). Les extraits de plantes sont constitués de divers composants pouvant être séparés tout au long d'une technique de chromatographie sur couche mince ou sur papier. Lorsque le solvant s'évapore, le milieu de culture inoculé peut être distribué à travers le papier ou les plaques chromatographiques et, après la période d'incubation adéquate, la croissance microbienne est mesurée. Si l'activité est positive, aucune croissance n'est observée et les composants de l'extrait sont élués puis identifiés. La méthode bioautographique est rarement utilisée pour l'évaluation de l'activité des HE (Sartoratto *et al.*, 2004). Néanmoins, une version de cette méthode associant la chromatographie en couche mince et la méthode bioautographique (TLC-bioautographic) a récemment été développée et appliquée pour tester l'activité antibactérienne des HE de thym, lavande, eucalyptus, menthe verte et cannelle (Horváth *et al.*, 2010 ; Horváth *et al.*, 2013).

d. Autres méthodes

D'autres méthodes non conventionnelles telles que la microatmosphère et les mesures d'impédance ou de conductance peuvent également être utilisées dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Burt, 2004).

d.1. Diffusion en phase vapeur ou Microatmosphère

La méthode à la microatmosphère est le résultat d'une légère modification de la diffusion de la gélose et convient mieux à la détermination de l'activité de l'HE en phase vapeur. Cette

méthode est appliquée aux HEs destinées au contrôle de l'atmosphère. La procédure de cette méthode consiste à inoculer le milieu solidifié avec le microorganisme à tester comme pour l'analyse par diffusion en milieu solide, mais le disque avec l'HE est placé sur le couvercle au milieu d'une boîte de Pétri qui est inversée et après le temps d'incubation approprié. L'activité est déterminée, comme pour la méthode de diffusion en gélose, la zone d'inhibition de la croissance microbienne est mesurée. La concentration minimale inhibitrice (CMI) peut être déterminée lorsque plusieurs concentrations sont testées (Edris et Farrag, 2003 ; López et al., 2007 ; Goñi et al., 2009 ; Doran et al., 2009).

Lopez et al. ont évalué l'activité antimicrobienne en phase vapeur d'un grand nombre d'HE et de leurs principaux constituants (Lopez et al., 2005, 2007b) avec des résultats prometteurs, qui ont abouti à la mise au point d'un conditionnement antimicrobien (Lopez et al., 2007a ; Rodriguez et al., 2007), qui ont obtenu une inhibition similaire pour les tests *in vitro* et les analyses effectuées avec des aliments (Rodriguez et al., 2008).

d.2. La méthode de l'impédance ou de la conductance

La méthode de l'impédance ou de la conductance est caractérisée par sa grande rapidité, ses similitudes avec les méthodes les plus rapides. Cette technique repose sur la corrélation entre le changement des paramètres électriques de la croissance microbienne qui sont liés, de manière restreinte, à l'activité métabolique du microorganisme à tester et également au nombre de cellules viables. Les résultats de cette évaluation sont exprimés par le temps de détection (TD). Ce paramètre est défini comme le temps nécessaire à une culture microbienne pour atteindre une quantité seuil qui est généralement égale à 10^6 cfu.mL⁻¹ (Marino et al., 2001).

2.3.2. Le microorganisme testé

Globalement, l'activité des HE sur les cellules microbiennes des mêmes genres et espèces déterminés dans les mêmes conditions semble être similaire. Cependant, certains isolats bactériens peuvent présenter une réponse différente de celle des souches de type. Il est important d'utiliser un nombre important de souches d'origines différentes afin de simuler une situation plus réaliste plutôt que d'utiliser simplement des souches de laboratoire qui peuvent ne pas refléter le comportement des souches que l'on peut trouver dans la nature. L'activité antimicrobienne pouvant augmenter lorsque la taille de l'inoculum est réduite, il est donc crucial d'utiliser une densité microbienne standard (Canillac et Mourey, 2004 ; Chorianopoulos et al., 2007).

2.3.3. Conditions de culture

L'utilisation de milieux de culture spécifiques pour la détermination de la sensibilité aux agents antimicrobiens tels que les antibiotiques est normalisée et l'utilisation du milieu de Mueller-Hinton est recommandée (NCCLS, 2006) et a été adoptée pour la détermination de l'activité antibactérienne des HE et extraits de plantes (Hammer *et al.*, 1999). Le milieu de culture peut non seulement activer ou diminuer l'activité des HE mais peut également protéger les cellules microbiennes de leur action, comme le permet le milieu riche en nutriments. Il est donc nécessaire d'assurer l'uniformité entre les différentes études, car ce facteur est essentiel pour la comparaison des différentes actions antimicrobiennes entre différentes études (Burt, 2004).

En ce qui concerne l'effet de la valeur du pH sur l'activité de l'HE, il est connu que seuls les composés phénoliques et les acides carboxyliques peuvent traverser la membrane cellulaire microbienne lorsqu'ils sont sous une forme non chargée et l'activité des composants de l'HE eugénol, l-carvone, d-carvone et le menthol sont supérieurs lorsque la valeur du pH du milieu de culture augmente de 6 à 8 . La valeur du pH influence également les modifications de la charge à la surface de la cellule et, de ce fait, la liaison du composant chargé de l'HE à la cellule microbienne peut être compromise (Bloomfield, 1991).

Partie II :

Etude

Expérimentale

Chapitre V :

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique

Trois (3) espèces de plantes endémiques de la méditerranée choisies essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi traditionnelle, ont fait l'objet de ce travail expérimental. Il s'agit de : *Thymus algeriensis*, *Teucrium polium* subsp *capitatum* (Lamiaceae) et *Ammoides verticillata* ou *pusilla* (Apiaceae).

Les feuilles de *Thymus algeriensis* avant la floraison et les parties aériennes de *Teucrium polium* subsp *capitatum* et *Ammoides verticillata* au stade de la floraison (Fig. 26) ont été récoltées en 2016 dans les régions de Relizane, Bouira et Mascara respectivement. Les plantes ont été authentifiées par le Pr. H. Abdelkrim, département de botanique, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (Alger).

Le matériel végétal fraîchement collecté a été séché sur du papier à l'ombre, à température ambiante et dans un endroit sec à l'abri de l'humidité pendant 8 jours jusqu'au moment de l'extraction des huiles essentielles et des extraits non volatils (Laouer et al., 2003).



Figure 23. Echantillons de plantes sèches utilisées dans l'extraction (de gauche à droite : *A. verticillata*, *T. algeriensis* et *T. polium* subsp *capitatum*)

1.1. Extraction des composés phénoliques

25 g de la plante séchée en poudre ont été extraits dans un appareil Soxhlet pendant 6 heures avec 400 ml d'éthanol absolu (Kerbouche et al., 2015). Le solvant a été éliminé dans un évaporateur rotatif et les traces résiduelles ont été éliminées par balayage avec de l'azote. Finalement, le résidu a été pesé et maintenu dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à son analyse.

1.2. Isolement des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été isolées par hydrodistillation de 100 g de feuilles séchées à l'ombre de *Thymus algeriensis* et de parties aériennes de *Teucrium polium* subsp *capitatum* et *Ammoides verticilatta* en utilisant un appareil de type Clevenger pendant trois heures. Les huiles recueillies ont été séchées dans du sulfate de sodium anhydre et stockées à 4-6 °C pour une analyse ultérieure ([European pharmacopeia, 2007](#)).

1.3. Analyse de l'huile essentielle

L'analyse des huiles obtenues a été réalisée par GC et GC-MS au moyen d'un système Hewlett-Packard 6890 GC-FID équipé d'une colonne capillaire de silice fondue avec HP5MS phase stationnaire apolaire (épaisseur de film 30 mx 0,25 mm x 0,25 µm). Les conditions de fonctionnement sont identiques à celles rapportées précédemment ([Benchabane et al., 2015](#)).

La température de la colonne a été programmée à 60 °C pendant 8 minutes, augmentant de 2 °C / min à 280 °C et maintenue à 280 °C pendant 15 minutes. 0,2 µL d'échantillons dilués (1/10 hexane, v/v) ont été injectés par fractionnement, et le rapport de division était de 1:25. L'injection a été réalisée à 250 °C. Un débit de 0,5 ml / min de gaz porteur (N₂) a été utilisé. La détection par ionisation de flamme a été effectuée à 320 °C. Les données quantitatives ont été obtenues par voie électronique à partir des données de la zone FID sans utiliser de facteurs de correction.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse par ionisation électronique (GC-MS) a été réalisée avec un système informatisé Hewlett-Packard comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A utilisant la colonne apolaire HP5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm d'épaisseur). Les conditions pour les spectres GC-MS étaient : He comme gaz porteur à un débit de 0,5 ml / min; mode divisé (1:25); 0,2 pl (1/10 dans de l'hexane, v/v) sous la forme d'un volume injecté; et 250 °C comme température d'injection. Le programme de température du four est décrit ci-dessus pour l'analyse GC. Nous avons utilisé un mode d'ionisation avec ionisation électronique à 70 eV sur une plage de balayage de 30 à 550 unités de masse atomique.

1.4. Identification des composés des huiles essentielles

Les composants huileux ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention déterminés en référence à une série homologue de n-alcanes en C6-C20 avec ceux de la littérature ([Babushok et al., 2011](#)) et avec ceux des étalons authentiques disponibles. La confirmation de l'identification des constituants des huiles essentielles a été faite par

comparaison de leurs données spectrales de masse avec les spectres de référence (bibliothèques NIST 2005 et Wiley 7N) dans la base de données et avec les données de la littérature des spectres de masse (Adams, 2007).

1.5. Analyse des extraits phénoliques par HPLC-DAD-UV

Les solutions d'extraits de plantes ont été préparés dans de l'éthanol. Tous les échantillons ont été préparés et utilisés immédiatement pour l'analyse ou conservés à 4 °C s'ils n'ont pas été analysés pendant plus d'une heure (Tzima *et al.*, 2018).

L'analyse chromatographique a été effectuée à l'aide d'un appareil HPLC-DAD de marque Agilent série 1100 équipé d'un détecteur UV / DAD, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur en ligne et d'un injecteur automatique. Le détecteur à barrette de diodes (=DAD) avec plusieurs longueurs d'ondes d'absorption maximum, (choisis en fonction des absorbances maximums λ_{max} des molécules recherchées) est fixé avec la colonne analytique Hypersil (BDS-C18, 5 μ m, 250 \times 4,6 mm) constituant la phase stationnaire.

La phase mobile utilisée est un mélange de deux solvants, le premier est un mélange d'eau et d'acide acétique (0,2%) à pH = 3,1 (solvant A) et le second est de l'acétonitrile (solvant B). Les deux solvants sont utilisés dans un gradient d'élution linéaire pendant 30 minutes à 1 ml / min, en commençant par 95% de solvant A et en terminant par 100% de solvant B.

Le débit est de 1,5 ml / min, le volume d'injection de 20 μ l et la longueur d'onde du détecteur est fixée à 220 nm (DAD1 A), 255 nm (DAD1 B), 280 nm (DAD1 C), 300 nm (DAD1 D) et 355 nm (DAD1 E), choisie en fonction des absorbances maximales des molécules identifiées.

L'identification des composés séparés a été effectuée en comparant les temps de rétention des pics du chromatogramme de l'échantillon obtenu avec les temps de rétention et les spectres UV des pics des étalons précédemment analysés dans les mêmes conditions opératoires enregistrés dans la banque de données de l'HPLC (Tzima *et al.*, 2018).

Les composés étalons utilisés pour l'identification, leur temps de rétention et la longueur d'onde sont mentionnés dans le tableau 8 :

Tableau 8 : Données sur les composés étalons utilisés pour l'identification HPLC

Composé	Temps de rétention (min)	Signal (nm)
Acide gallique	3.260	DAD1 C
Acide tannique	3.270	DAD1 C
Résorcinol	3.313	DAD1 A
Catéchine	3.326	DAD1 A
Catéchol	6.206	DAD1 C
Caféine	6.405	DAD1 C
Acide caféique	7.062	DAD1 D
Acide isovanillique	7.390	DAD1 B
Vanilline	8.60	DAD1 D
Rutine	8.644	DAD1 E
Acide n-hydroxycinnamique	8.809	DAD1 C
Lutéoline 7 O-glucoside	9.22	DAD1 E
Acide férulique	9.266	DAD1 D
Acide syringique	9.660	DAD1 D
Acide o-anisique ou acide 2-méthoxybenzoïque	9.668	DAD1 E
Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique	9.677	DAD1 D
Naringinine 7 O-glucoside	10.387	DAD1 C
Acide m-anisique ou acide 3-méthoxybenzoïque	11.865	DAD1 A
Lutéoline	12.776	DAD1 E
Quercétine	12.810	DAD1 E
Acide 3,4,5 triméthoxycinnamique	12.816	DAD1 D
Acide trans-cinnamique	13.821	DAD1 C
Apéginine	14.497	DAD1 E
Acide trans diméthoxycinnamique	14.882	DAD1 D
Isoramenitine	15.059	DAD1 E
Hesperedine	15.070	DAD1 C

1.6. Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule suivante :

$$R \% = \left[\frac{PES}{PE} \right] \times 100$$

R% = Rendement en pourcentage

PES = poids de l'extrait sec (g)

PE = poids de l'échantillon (poudre) (g).

2. Détermination de la teneur en composés phénoliques

2.1. Polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (PT) des extraits non volatils a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu modifiée de [Singleton et al. \(1999\)](#). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

Une solution d'extrait éthanolique (1,25 ml, 1 mg/ml) a été mélangée avec 0,25 ml de réactif Folin-Ciocalteu (dix fois dilué) et 1 ml (75 g / l) de carbonate de sodium. Le mélange a été agité au vortex pendant 10 secondes et laissé au repos pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait éthanolique par l'éthanol.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg / g d'équivalent acide gallique (EAG) et a été déterminé en utilisant l'équation basée sur la courbe d'étalonnage : $Y = 0,0111X - 0,0067$, où : X est l'absorbance et Y est l'équivalent en acide gallique (mg / g).

2.2. Flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes (FT) a été déterminée en utilisant la méthode de [Lamaison et Carnet \(1990\)](#). Cette méthode basée sur la formation de complexes de couleur jaune entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent des groupements hydroxyles des flavonoïdes.

Un volume de 1 ml de solution d' $AlCl_3$ à 2% a été ajouté à 1 ml de solution d'échantillon d'extrait d'éthanol (1 mg/mL). Après une heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm.

La teneur en flavonoïdes totaux a été calculée en équivalent quercétine (mgEQ/g), en utilisant l'équation basée sur la courbe d'étalonnage : $Y = 0,0344X + 0,008$, où X est l'absorbance et Y est l'équivalent de quercétine (mg / g).

3. Inhibition de la (butyryl) acétylcholinestérase

L'activité inhibitrice d'AChE et BuChE a été mesurée en utilisant un dosage colorimétrique quantitatif en utilisant un lecteur de microplaque de 96 puits selon la méthode décrite par Rhee *et al.* (2001) basée sur la méthode d'Ellman (1961). L'enzyme hydrolyse le substrat acétylthiocholine ou butyrylthiocholine aboutissant au produit thiocholine qui réagit avec le réactif d'Ellman : l'acide 5,5'-dithio-bis- [2-nitrobenzoïque] (DTNB) pour produire la 2-nitrobenzoic-5-mercaptothiocholine et le 5-thio. -2-nitrobenzoate qui peut être détecté à 412 nm.

Dans cette méthode, le volume réactionnel total (200 µl) constitué de 150 µl (0,1 mol / l) de tampon phosphate de sodium (pH 8,0), 20 µl d'AChE ou BuChE (0,45 U / ml), 10 µl de solution d'extrait (50 µg / ml à 400 µg / ml), 10 µl de DTNB (0,03 mmol / l) et 10 µl d'iodure d'acétylthiocholine ou d'iodure de butyrylthiocholine (concentration finale de 0,68 mmol / l).

Le bromhydrate de galantamine a été utilisé comme témoin positif. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule :

$$\text{Inhibition de ChE (\%)} = \left[\frac{(Ac - As)}{Ac} \right] \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du contrôle.

As : absorbance de l'échantillon d'essai.

La concentration fournissant une inhibition de 50% ou IC₅₀ a été calculée à partir des pourcentages d'inhibition du traçage du graphique par rapport aux concentrations de l'extrait.

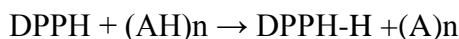
4. Détermination de l'activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques et des huiles essentielles des 3 plantes étudiées, 6 tests ont été réalisés à savoir : le pouvoir de piégeage des radicaux DPPH[•], ABTS^{•+} et superoxyde, test de blanchiment au β-carotène par peroxydation de l'acide linoléique et pouvoir réducteur du fer et de cuivre.

4.1. Pouvoir du piégeage du radical DPPH[•]

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable, dû à la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule entière. Ainsi, DPPH[•] ne se dimérise pas, comme c'est le cas avec la plupart des radicaux libres. La délocalisation sur la molécule DPPH[•] détermine l'apparition d'une couleur pourpre, avec une bande d'absorption avec un maximum

d'environ 520 nm. Lorsque DPPH[•] réagit avec un donneur d'hydrogène, la forme réduite (moléculaire) (DPPH) est générée, accompagnée de la disparition de la couleur violette. Par conséquent, la diminution de l'absorbance dépend linéairement de la concentration en antioxydant (Thaipong *et al.*, 2006 ; Pisoschi *et al.*, 2009). On peut résumer la réaction de la manière suivante :



Où (RH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm (Brand-williams *et al.*, 1995).

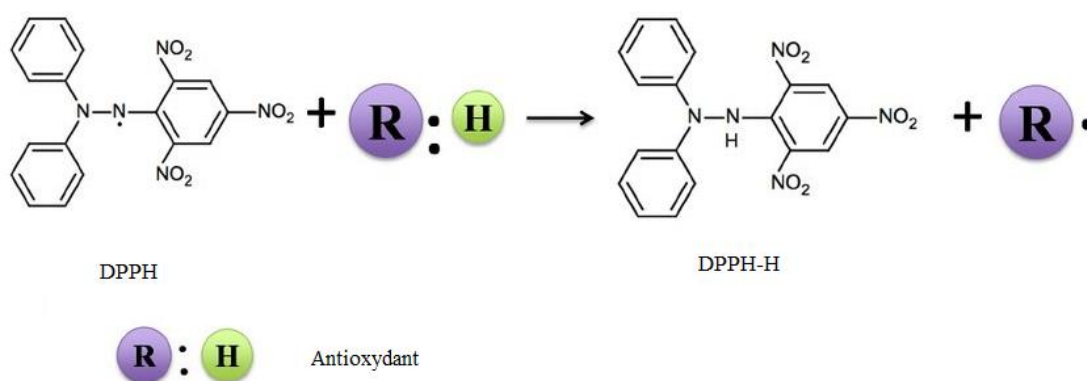


Figure 24. Réaction entre le radical DPPH[•] et l'antioxydant pour former le DPPH stable

La méthode décrite par Hazzit *et al.* (2009) a été utilisée. 975 µl de solution éthanolique de 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH) (0,0024%), 25 µl d'échantillon ont été mélangés et la solution résultante a été laissée à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorption a été mesurée à 517 nm contre un blanc (éthanol).

Le BHT (Butylhydroxytoluène) a été utilisé comme contrôle positif. Le piégeage du radical DPPH exprimé en pourcentage d'inhibition a été calculé de la manière suivante :

$$\text{Piégeage du DPPH (\%)} = \left[\frac{(\text{Ab} - \text{As})}{\text{Ab}} \right] \times 100$$

Où :

- **Ab** est l'absorbance de la réaction de contrôle (contenant tous les réactifs sauf le composé d'essai).
- **As** est l'absorbance du composé d'essai.

La concentration inhibitrice de 50 % de radicaux ou IC₅₀ a été calculée comme décrit précédemment.

4.2. Pouvoir du piégeage du radical ABTS^{•+}

Le radical cation ABTS (ABTS^{•+}) qui absorbe à 743 nm (donnant une couleur vert bleuté) est formé par la perte d'un électron par l'atome d'azote de l'ABTS (2,2'-azino -bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (Marc *et al.*, 2004). En présence de Trolox (ou d'un autre antioxydant donneur d'hydrogène), l'atome d'azote éteint l'atome d'hydrogène, produisant la décoloration de la solution. Les ABTS peuvent être oxydés par le persulfate de potassium (Pellegrini *et al.*, (2003) ; Thaipong *et al.*, 2006) ou le dioxyde de manganèse (Su *et al.*, 2007), donnant naissance au radical cationique ABTS (ABTS^{•+}), dont la diminution de l'absorbance à 743 nm a été suivie en présence de Trolox, choisi comme antioxydant standard.

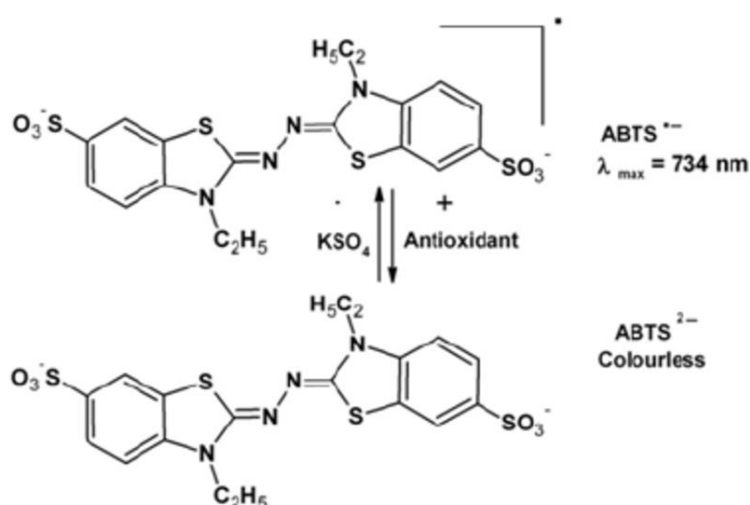


Figure 25. Formation de l'ABTS^{•+} par un oxydant persulfate de potassium

La méthode décrite par Re *et al.* (1999) a été utilisée. Des aliquotes de 10 µL de chaque échantillon testé ont été ajoutées à 1,0 mL de solution ABTS^{•+} diluée (absorbance à 734 nm égale à 0,700 ± 0,020). Le radical ABTS a été produit en faisant réagir la solution mère ABTS (ABTS a été dissous dans l'eau à une concentration de 7 mM avec 2,45 mM persulfate de potassium et laisser le mélange reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 heures avant utilisation).

Le BHT et le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique acide) ont été utilisés comme témoins positifs. L'absorbance à 734 nm a été enregistrée puis le pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ ont été calculés comme décrit dans le test DPPH.

4.3. Activité de piégeage du radical superoxyde

Le superoxyde a été généré selon la méthode DMSO alcalin décrite par [Elizabeth et Rao \(1990\)](#). Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est généré par l'addition d'hydroxyde de sodium à l'air saturé de DMSO. Le superoxyde généré reste stable en solution et réduit le nitrobleu tétrazolium (NBT) en colorant de formazan à température ambiante qui peut être mesuré à 560 nm.

Le volume final utilisé (1,4 mL) pour la mesure de l'absorbance était de 0,1 mL de NBT (1 mg / mL) dans le mélange réactionnel contenant 1 mL de DMSO alcalin (1 mL de DMSO contenant 5 mM de NaOH dans 0,1 mL d'eau) et 0,3 mL de l'échantillon testé à diverses concentrations. L'acide ascorbique et l' α -tocophérol ont été utilisés comme témoin positif. Les pourcentages d'inhibition (%) et les concentrations inhibitrices de 50% de radicaux (IC_{50}) ont été calculés comme décrit précédemment.

4.4. Test de blanchiment au β -carotène- acide linoléique

Ce test est l'une des méthodes rapides de screening des antioxydants, reposant principalement sur le principe selon lequel l'acide linoléique, qui est un acide gras insaturé, est oxydé par les « espèces réactives de l'oxygène » produites par l'eau oxygénée. Les produits formés initieront l'oxydation du β -carotène, ce qui conduira à sa décoloration. Les antioxydants diminuent l'importance de la décoloration, mesurée à 470 nm et l'activité est mesurée ([Kulisic et al., 2004](#) ; [Alam et al., 2013](#)).

La méthode décrite par [Tepe et al. \(2005\)](#) a été utilisée. Une solution d'émulsion de β -carotène et d'acide linoléique a été préparée en dissolvant 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme et en ajoutant 25 μ l d'acide linoléique avec 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C sous vide pendant 4 minutes. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés au résidu. A 2,5 ml de ce mélange, 300 μ l de chaque extrait ont été ajoutés. Les tubes à essai ont été incubés pendant 2 heures ensemble à 50 °C.

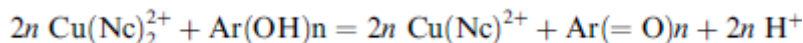
Un blanc sans antioxydant a été utilisé comme contrôle négatif. BHT et Trolox ont été utilisés comme témoins positifs. L'absorbance a été mesurée à 470 nm.

$$\text{Inhibition de blanchiment (\%)} = \left[\frac{1 - (At_0 - AE)}{(At_0 - At_1)} \right] \times 100$$

- **AE** : Absorbance de l'échantillon après 120 min.
- **At₀** : Absorbance de témoin à t₀.
- **At₁** : Absorbance de témoin après 120 min.

4.5. Test de capacité antioxydante réduisant les ions cuivriques (CUPRAC)

Le réactif oxydant chromogène de la méthode CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) développée, à savoir le chlorure de cuivre (II) II (néocuproïne) [Cu (II) -Nc], réagit avec les polyphénols [Ar (OH) n] de la manière suivante.



où les protons libérés peuvent être tamponnés avec la solution tampon d'acétate d'ammonium relativement concentrée. Dans cette réaction, les groupes Ar-OH réactifs des polyphénols sont oxydés aux quinones correspondantes et Cu (II) -Nc est réduit au chélate de Cu (I) -Nc fortement coloré, présentant une absorption maximale à 450 nm.

La capacité antioxydante réductrice cuprique a été déterminée selon la méthode CUPRAC d'Apak *et al.* (2004).

1 ml de chlorure de cuivre (II) (10^{-2} M), de néocuproïne (Nc) ($7,5 \times 10^{-3}$ M) préparés dans de l'éthanol à 96% et de tampon d'acétate d'ammonium (pH 7,0) sont mélangés dans un tube à essai. Ensuite, un échantillon d'antioxydant (ou une solution standard) (1,0 mM dans 96% d'EtOH) (0,5 ml) et H₂O (0,6 ml) a été ajouté au mélange initial afin d'obtenir un volume final de 4,1 ml. Après 1h, l'absorbance à 450 nm a été enregistrée contre un blanc. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif.

La valeur d'IC₅₀ correspondant à l'absorbance de 0,5 a été calculée à partir du graphique représentant l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

4.6. Pouvoir réducteur

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (Huang *et al.*, 2005). Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions Fe³⁺ qui seront réduits en Fe²⁺ par les antioxydants présents dans l'extrait végétal

La méthode d'Oyaizu (1986) a été utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant réducteur. 125 µl de solutions d'éthanol des échantillons testés ont été mélangés avec du tampon phosphate (2,5 ml ; 0,2 M ; pH 6,6) et du ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆; 2,5 ml, 1%].

Après avoir laissé le mélange incuber pendant 20 minutes à 50 °C, 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10%) ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tr / min. Le surnageant (2,5 ml) a été mélangé avec de l'eau distillée (2,5 ml) et du FeCl₃ (0,5

ml, 0,1% en poids / volume) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique et le BHT ont été utilisés comme témoins positifs. La valeur IC₅₀ a été déterminée comme décrit pour la méthode CUPRAC.

5. Etude de l'activité anti-hémolytique

Cette activité permet de refléter de façon globale le potentiel de défense d'un individu vis-à-vis d'une agression aux radicaux libres. Dans le but de démontrer l'effet protecteur de ces extraits sur la préservation de l'intégrité cellulaire, qui est essentiellement liée aux membranes, nous avons soumis les érythrocytes à des conditions du stress oxydant par l'ajout de l'AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Le potentiel anti-hémolytique des extraits a été investigué par la procédure spectrophotométrique comme décrite par [Magalhaes et al. \(2009\)](#).

Le 2,2-azobis (2-méthylpropionamidine) dihydrochlorure de composé azoïque (AAPH, parfois aussi abrégé en ABAP) peut être décomposé à la température physiologique pour produire des radicaux peroxy, en amorçant la peroxydation lipidique. Une fois que l'AAPH est soluble dans l'eau, le taux de génération de radicaux libres peut être contrôlé. L'AAPH a été largement utilisé comme initiateur de radicaux libres dans les études biologiques ([Niki et al., 1988](#) ; [Dai et al., 2006](#) ; [Ramchoun et al., 2015](#)). Les radicaux peroxy, générés par la décomposition de l'AAPH à 37 °C, pourraient attaquer la membrane des érythrocytes pour induire une peroxydation des lipides et des protéines et ainsi provoquer une hémolyse ([Ng et al., 2000](#) ; [Zheng et al., 2016](#)).

Du sang (5 à 10 ml) a été prélevé sur un donneur consentant en bonne santé par ponction veineuse et recueilli dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant. Les échantillons ont été immédiatement centrifugés à 1500 tr / min pendant 10 min à 4°C, puis le plasma et la couche leuco-plaquettaire ont été soigneusement déchargés. Les érythrocytes ont été lavés trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS; pH 7,4), puis remis en suspension en utilisant le même tampon au niveau d'hématocrite souhaité. Afin d'induire une oxydation radicalaire des chaînes dans les érythrocytes, des radicaux peroxy aqueux ont été générés par décomposition thermique de AAPH (dissous dans du PBS; concentration finale 50 mM).

Afin d'étudier les effets protecteurs des extraits éthanoliques contre l'hémolyse induite par l'AAPH, une suspension d'érythrocytes à 2% d'hématocrite a été préincubée avec les extraits (dissoutes dans du PBS; concentrations finales 100–1000 µg / ml) à 37 °C pendant 30 min,

suivie d'une incubation avec et sans AAPH 50mM. Ce mélange réactionnel a été agité pendant 3 h à 37 °C. Dans toutes les expériences, un contrôle négatif (érythrocytes dans du PBS), ainsi que des témoins extraits (érythrocytes dans du PBS avec chaque extrait) ont été utilisés.

L'étendue de l'hémolyse a été déterminée par spectrophotométrie comme décrit précédemment (Ko *et al.*, 1997). En bref, des aliquotes du mélange réactionnel ont été prélevées, diluées avec une solution saline et centrifugées à 4000 tr / min pendant 10 min pour séparer les érythrocytes. Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé en mesurant l'absorbance du surnageant (A) à 545 nm et comparé à celui d'une hémolyse complète (B) en traitant une aliquote avec le même volume du mélange réactionnel avec de l'eau distillée. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à l'aide de la formule :

$$\text{Inhibition d'hémolyse (\%)} = \left[\frac{A}{B} \right] \times 100$$

La concentration d'extrait fournissant une inhibition de 50% (IC₅₀) au bout de 3 h a été calculée à partir de la courbe dose-réponse obtenue en traçant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par rapport aux concentrations en extrait.

La quercétine et l'acide ascorbique (100–1000 µg / ml) traité de manière similaire ont été utilisés comme composés de référence.

6. Etude de l'activité antimicrobienne

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination l'activité antibactérienne : la méthode de diffusion par disque (analyse qualitative) et la méthode des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (analyse quantitative).

Les CMI des huiles essentielles contre les microorganismes testés ont été déterminées par la méthode de microdilution en bouillon selon le protocole de NCCLS (2000, 2002) décrit par Çeliktas *et al.* (2007). Tous les tests ont été effectués en double.

6.1. Souches microbiennes testées

Cinq (5) souches bactériennes de références issues de la collection ATCC (American Type Culture Collection) ont été testées afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits. La liste des souches microbiennes est mentionnée dans le tableau 9.

Tableau 9. Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	Bacillaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9627	-	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella oxytaca</i>	13182	-	Enterobacteriaceae
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriaceae

6.2. Méthode de diffusion sur disque ou « Technique de l'aromatogramme »

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 6 ou 9 mm de diamètre imprégné de la solution d'HE ou d'extrait, sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant, appelée : *Halo* ou *zone d'inhibition* (Çeliktas et al., 2007). L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HEs et des extraits sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes.

La méthode de diffusion du disque décrite par Çeliktas et al. (2007) a été appliquée pour la détermination des activités antimicrobiennes des huiles essentielles et extraits éthanoliques. Les HE et EE ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Une dilution de 125 mg / ml d'extraits et d'huiles essentielles a été préparée. Une suspension du micro-organisme testé (0,1 ml de $1,5 \times 10^6$ UFC / ml) a été étalée sur la surface de gélose Mueller-Hinton (MHA). Les disques en papiers filtres ayant un diamètre de 6 mm, imbibés de 20 µl d'extrait éthanolique (ou huile essentielle) ont été placés sur la gélose inoculée. Avant l'incubation, toutes les boîtes Pétri ont été conservées au réfrigérateur (4°C) pendant 2 h. puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les diamètres de l'inhibition les zones ont été mesurées en millimètres.

La suspension cellulaire d'environ $1,5 \times 10^6$ UFC / ml a été obtenue à partir d'un étalon de turbidité 0,5 McFarland correspondant à une suspension standardisée en ajustant la densité optique à 0,1 à 600 nm (Kuetze et al., 2011).

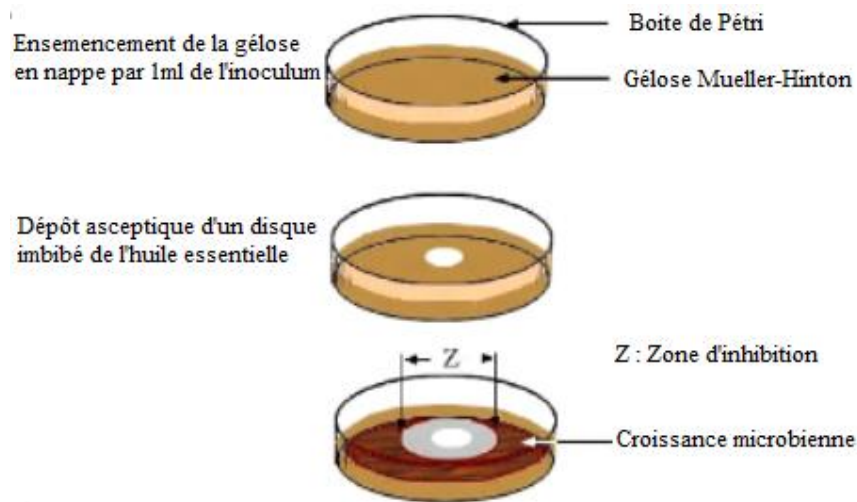


Figure 26. Illustration de la méthode d'aromatogramme

6.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La susceptibilité par le test de la microdilution dans un bouillon a été réalisée en utilisant la méthode NCCLS décrite par Çeliktas *et al.* (2007) pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI. Ce test n'a été appliqué uniquement qu'aux extraits qui ont montré des zones d'inhibition ≥ 8 mm (Ben Othman *et al.*, 2017).

Tous les tests ont été réalisés dans un bouillon Mueller Hinton (MHB) complété avec du détergent Tween 80 (0,5% (v / v)). Les souches bactériennes ont été cultivées pendant une nuit à 37°C dans le MHB. Des dilutions géométriques de l'huile essentielle allant de 20 à 0,31 mg/ml ont été préparées dans une microplaque de 96 puits (volume étant 20 μ l). Puis, 160 μ l de MHB ont été ajoutés. Finalement, 20 μ l des 10^6 unités formatrices de colonies (UCF/ml) (selon Normes de turbidité Mc Farland) de suspensions microbiennes standardisées ont été inoculées et le test a été réalisé dans un volume de 200 μ l.

Les dilutions géométriques ont été obtenues selon la procédure suivante : les puits de la microplaque ont été remplis avec 160 μ l de milieu au premier rang et les rangées restantes avec 100 μ l de milieu MHB. Les huiles essentielles et l'inoculum bactérien approprié ($1,0 \times 10^6$ UFC) ont été ajoutés en parties aliquotes de 20 μ l par puits dans la première rangée. Le volume final dans la première rangée était de 200 μ l, puis 100 μ l ont été retirés et placés dans une autre rangée, en continuant ainsi jusqu'à la fin de la plaque. En utilisant cette méthode de dilution en série, la concentration a été réduite de moitié à chaque fois. Les microplaques ont été incubées pendant 24 h à 37 °C. Les mêmes tests ont été effectués simultanément pour le contrôle de la croissance (MHB + Tween 80 + microorganisme) et contrôle de la stérilité (MHB + Tween 80 + Huile testée).

Les concentrations les plus faibles sans croissance visible (en comparant la densité optique à 600 nm de l'échantillon avec celle de contrôle de la stérilité) ont été définies comme des concentrations qui inhibaient complètement la croissance bactérienne (CMI)

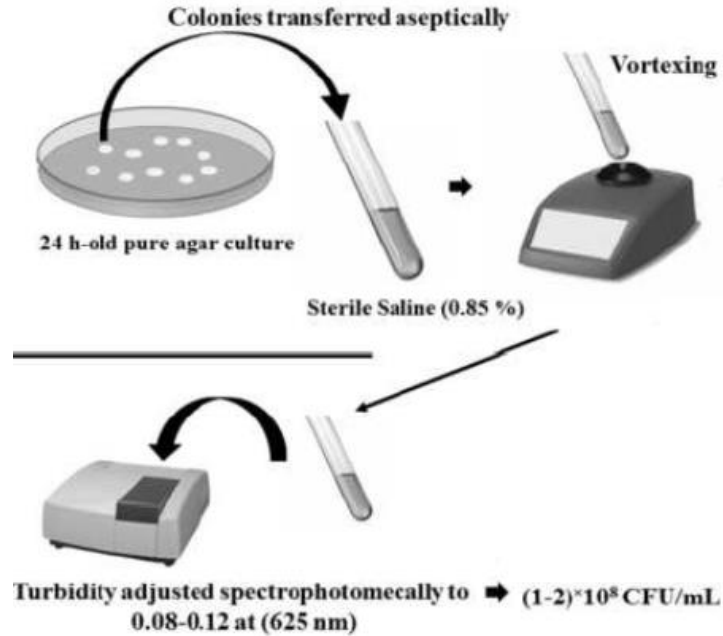


Figure 27. Préparation d'inoculum microbien McFarland par la suspension directe de colonies, conformément aux recommandations du CLSI (Balouiri *et al.*, 2016).

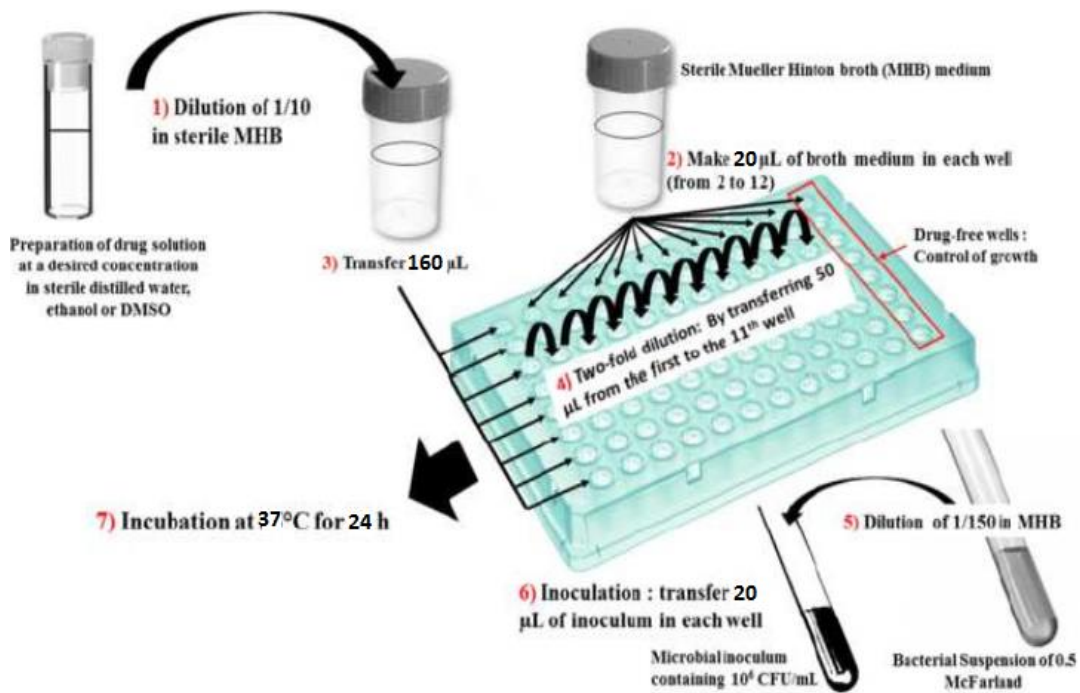


Figure 28. Microdilution en bouillon pour le test antibactérien, conformément aux recommandations du protocole CLSI (Balouiri *et al.*, 2016).

7. Analyses statistiques des données

Dans cette étude, trois analyses de chaque échantillon ont été effectuées et chaque expérience a été réalisée en triple ($n = 3$). La valeur moyenne et l'écart type ont été calculés à partir de données obtenues. Les données des essais biologiques ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics version 22.0, suivie du test de Tukey. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

Chapitre VI :

Résultats & Discussion

1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles

Les rendements, les classes chimiques et les données GC des constituants identifiés des huiles essentielles de *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, de *Thymus algeriensis* et d'*Ammoides verticillata* (ou *pusilla*) sont présentés dans les tableaux 10, 11, 12 respectivement.

Les huiles essentielles ces plantes ont fait l'objet de nombreuses études. Selon l'origine végétale étudiée, les quantités des huiles essentielles ainsi que des constituants principaux différaient notablement.

1.1. *T. polium* subsp. *capitatum*

Un rendement en huile essentielle de 0,27% (v / m) a été obtenu pour la plante *T. polium* subsp. *capitatum*. Cette valeur appartient à l'intervalle des valeurs rapportées dans la littérature.

En effet, [Antunes et al. \(2004\)](#) ont rapporté un rendement inférieur de 0,15 (v/m) en moyenne pour plusieurs populations de *T. capitatum* de Portugal, tandis que [Kerbouche et al. \(2015\)](#) ont obtenu un rendement similaire de 0,3 % (% v/m) pour le *T. polium* subsp. *capitatum* de la région de Lakhdaria, cependant des valeurs supérieures ont été signalés par [Cozzani et al. \(2005\)](#) (0.6%), [De Martino et al. 2010](#) (0.7%) et [Djabou et al. \(2012\)](#) (0.49–0.62% , m/m) pour la même sous-espèce. D'autres valeurs ont été rapportées pour d'autres sous-espèces comme *Teucrium polium* subsp. *urasiacum* (1.7 %, m/m) ([Kabouche et al., 2007](#)) et *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (0.29%) ([Ben Othman et al., 2017](#)).

Concernant la composition chimique, les données chromatographiques ont montré que l'HE de *T. polium* subsp. *capitatum* est principalement constituée d'hydrocarbures sesquiterpéniques et caractérisée par le germacrène D (25%) comme composant le plus important, suivi par le β -pinène (11,3%) et le bicyclogermacrène (10,4%). Ce profil est plus ou moins similaire à celui de la région de Boussaada (Algérie) rapporté par [Kerbouche et al. \(2015\)](#), mais très différent de celui de la Corse rapporté par [Cozzani et al. \(2005\)](#) et ([Djabou et al., 2012](#)) qui ont trouvé une composition dominée par les hydrocarbures monoterpéniques à forte teneur en α -pinène (28,8-24,1 %).

[Menichini et al. \(2009a\)](#) et [De Martino et al. \(2010\)](#) ont signalé le carvacrol (10,1 et 9,6%) parmi les composants les plus abondants dans l'HE de *T. polium* subsp. *capitatum* de Grèce et de l'Italie, en plus de β -caryphyllène (9,8 et 10,1%), torreyol (7,6 et 6.5 %) et l'oxyde de caryophyllène (5,0%) respectivement.

Le germacrène D constituant majeur de notre échantillon a été rapporté parmi les constituants dominants principalement sesquiterpéniques de l'HE des parties aériennes de *T. polium* subsp. *capitatum* prélevés en Serbie pendant la période de floraison avec une forte teneur (31,8%), à côté de trans-caryophyllène (8,8%) et le bicyclogermacrène (6,2%), en plus des monoterpènes, le linalol (14,0%) et le β -pinène (10,7%), alors que dans l'HE de la Bulgarie caractérisée par un pourcentage élevé de monoterpènes (le β -pinène (26,8%), α -pinène (9,3%) et de limonène (6,4%)), le sesquiterpène germacrène D ne représentait que 17,7% (Mitić et al., 2012).

Par ailleurs, Khani et Heydarian (2014) ont identifié l' α -cadinol (46,2%), l'oxyde de caryophyllène (25,9%), l' α -muurolol épi (8,1%), le cadalène (3,7%) et la longiverbénone (2,9%) comme étant des composés majeurs du *Teucrium polium* subsp. *capitatum* d'Iran. La composition de cette HE est complètement différente de la nôtre.

Comme noté par Antunes et al. (2004) qui ont étudié la composition chimique des huiles essentielles de cinq populations de *T. capitatum* cultivées au Portugal, il existe un grand polymorphisme dans les huiles volatiles de *T. capitatum* avec différences importantes constatées concernant les principaux constituants, probablement dû à des facteurs génétiques. En fait, même pour les plantes récoltées au même stade de développement et dans des localités très proches présentant des caractéristiques écologiques similaires, les huiles diffèrent notamment.

Généralement, les HEs des espèces *Teucrium* sont principalement constituées d'hydrocarbures sesquiterpéniques et / ou de sesquiterpènes oxygénés et se caractérisent par un polymorphisme chimique (Kerbouche, et al., 2015 ; Antunes et al., 2004 ; Velasco-Negueruela et Pérez-Alonso, 1990 ; Hachicha et al., 2007 ; Kabouche et al., 2006 ; Baher et Mirza, 2003).

Dans ce sens, Sadeghi et al. (2014) ont étudié la variabilité dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. de différentes populations latitudinales dans quatre sites et rapporté que le rapport sesquiterpène / monoterpène des plantes récoltées à la haute altitude était plus élevé que celui recueilli à la basse altitude. Il semble que l'augmentation de la latitude a tendance à produire plus de sesquiterpènes et moins de monoterpènes.

Tableau 10. Composition chimique (%) de l'huile essentielle de *Teucrium polium* subsp. *capitatum*

N°	Composé ^a	IR ^b	%	Identification ^c
1	α -Thujene	930	0.1	RI-MS
2	α-Pinene	937	3.3	RI-MS-St
3	Camphene	951	0.1	RI-MS
4	Verbenene	965	t	RI-MS-St
5	Sabinene	973	0.1	RI-MS-St
6	β-Pinene	977	11.3	RI-MS-St
7	β -Myrcene	990	1.7	RI-MS-St
8	α -Phellandrene	1004	t	RI-MS-St
9	α -Terpinene	1017	0.1	RI-MS-St
10	p-Cymene	1024	1.1	RI-MS-St
11	Limonene	1030	4.0	RI-MS-St
12	cis- β -Ocimene	1038	0.1	RI-MS-St
13	trans- β -Ocimene	1048	0.3	RI-MS-St
14	γ -Terpinene	1060	0.8	RI-MS-St
15	α -Terpinolene	1087	0.1	RI-MS-St
16	α -Campholenaldehyde	1124	0.1	RI-MS-St
17	Pinocarveol	1140	0.2	RI-MS
18	Pinocarvone	1162	0.3	RI-MS
19	Myrtenal	1193	0.5	RI-MS-St
20	Carvone	1242	0.1	RI-MS-St
21	Bornyl acetate	1285	0.1	RI-MS-St
22	2-Undecanone	1293	0.1	RI-MS
23	α -Cubebene	1351	0.1	RI-MS
24	α -Copaene	1376	0.1	RI-MS-St
25	β -Bourbonene	1384	1.1	RI-MS
26	β -Cubebene	1388	t	RI-MS
27	β -Caryophyllene	1419	0.5	RI-MS-St
28	β -Gurjunene	1432	0.2	RI-MS
29	Aromadendrene	1440	0.2	RI-MS
30	α -Humulene	1454	0.2	RI-MS
31	Alloaromadendrene	1461	0.3	RI-MS
32	γ -Muurolene	1477	0.4	RI-MS

33	Germacrene D	1481	25.0	RI-MS-St
34	β -Selinene	1486	0.3	RI-MS
35	epi-Bicyclosequiphellandrene	1488	0.2	RI-MS
36	Bicyclogermacrene	1495	10.4	RI-MS
37	α -Muurolene	1498	0.3	RI-MS
38	trans- β -Guaiene	1499	0.3	RI-MS
39	γ -Cadinene	1513	0.6	RI-MS-St
40	δ -Cadinene	1524	2.2	RI-MS-St
41	Cadina-1,4-diene	1531	0.2	RI-MS
42	α -Cadinene	1535	0.1	RI-MS
43	α -Calacorene	1542	0.2	RI-MS
44	1,5-Epoxysalvial-4(14)-ene	1544	0.3	RI-MS
45	Spathulenol	1576	5.8	RI-MS-St
46	Salvial-4-(14)-en-1-one	1593	0.7	RI-MS
47	t-Cadinol	1635	3.5	RI-MS
48	α -Cadinol	1653	2.6	RI-MS
49	Cadalene	1672	0.5	RI-MS
50	Hexahydrofarnesyl acetone	1845	0.9	RI-MS
	Composés identifiés (%)		81.7	
	Hydrocarbures monoterpènes		23.1	
	Monoterpènes oxygénés		1.3	
	Hydrocarbures sesquiterpènes		43.7	
	Sesquiterpènes oxygénés		13.5	
	Autres		0.1	

a Composés énumérés dans l'ordre d'élution de la colonne HP5MS

b Indices de rétention calculés par rapport aux n-alcanes C6 – C19

c Identification

St, comparaison avec le composé authentique (standard)

MS : comparaison des spectres de masse avec ceux des bibliothèques MS et de la bibliographie

IR : comparaison de l'indice de rétention avec ceux de la littérature

principaux composants en gras

t = trace (<0,05%)

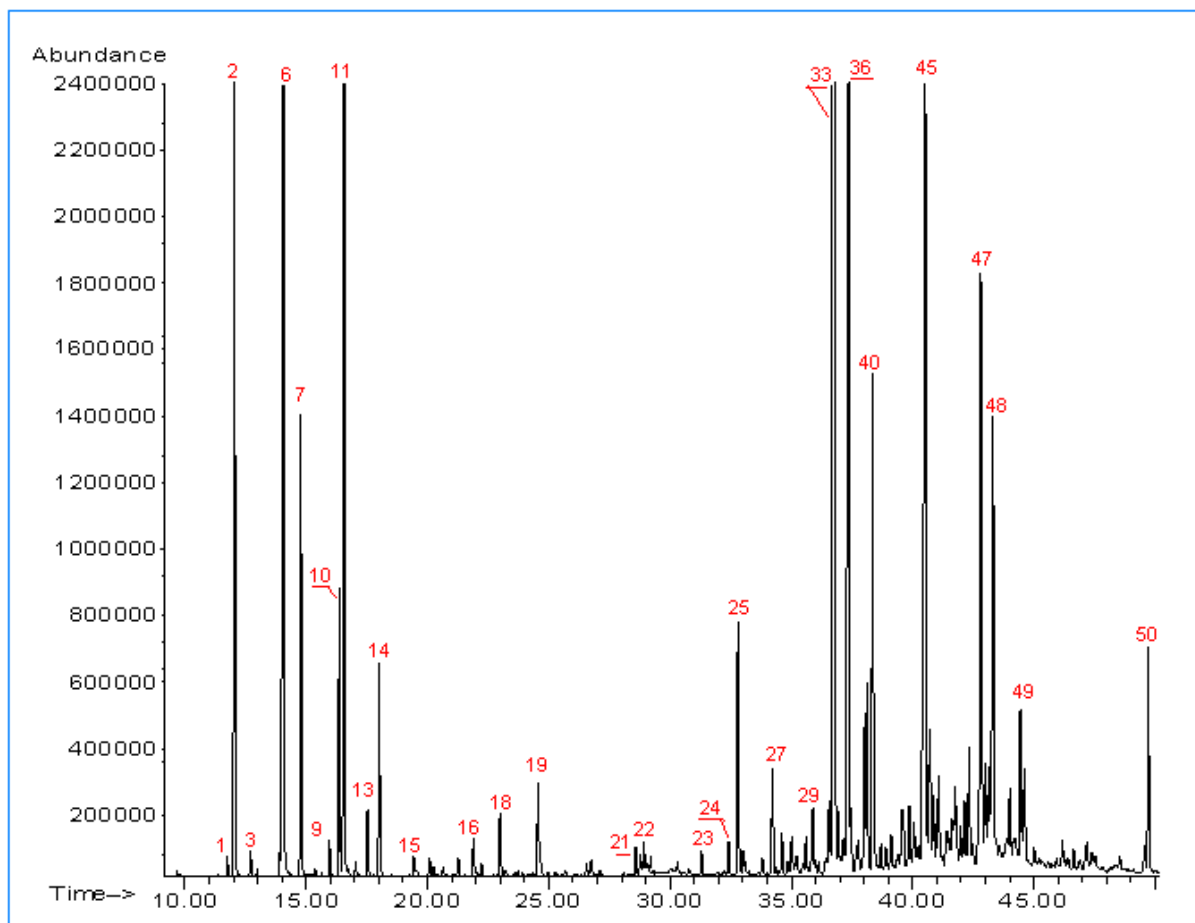


Figure 29. Chromatogramme GC-MS (agrandi) de l'huile essentielle de *Teucrium polium* subsp. *capitatum*. Les numéros sur les pics correspondent au numéros d'ordre des composés du tableau 10)

1.2. *Thymus algeriensis*

Le rendement obtenu en huile essentielle de *T. algeriensis* est de 2.67% (v/m). Cette valeur est supérieure à celles rapportés par d'autres auteurs, qui varient entre 1.45 et 2.5%. (Chemat *et al.*, 2012 (1.45%); Ben El Hadj Ali *et al.*, 2015 (1.52–2.02%), Ait-Ouazzou *et al.*, 2011 (2.2%) et Giweli *et al.*, 2013 (2,5%)).

Quant à la composition chimique, l'HE du *T. algeriensis* était dominée par les hydrocarbures monoterpéniques (43,8%) et les monoterpènes oxygénés (45,5%) où le carvacrol (43,2%) suivi de son précurseur biosynthétique p-cymène (18,7%) et de γ -terpinène (14,8%) représentaient les constituants principaux. Cette composition est en accord avec celle d'un échantillon de la région de Chlef (ouest de l'Algérie) récemment rapporté par Kaouache *et al.* (2017).

Les autres compositions chimiques de cette espèce de thym trouvées dans la littérature concernant différents pays (Libye, Algérie, Tunisie et Maroc) sont caractérisées par des chémotypes différents et une grande variabilité (Giweli *et al.*, 2013 ; Chemat *et al.*, 2012 ; Ben El Hadj Ali *et al.*, 2010 ; Ben Hadj Ali *et al.*, 2015 ; Ait-Ouazzou *et al.*, 2011 ; Kaouache *et al.*, 2017 ; Amarti *et al.*, 2010 ; Salhi *et al.*, 2016 ; El-Ouariachi *et al.*, 2014).

Ainsi, l'huile essentielle de *T. algeriensis* de la Libye était caractérisée par un pourcentage élevé de thymol (36,8-38,50%) comme composé principal (Giweli *et al.*, 2013), tandis que Aboutabl et El-dahmy (1995) ont déclaré que le thymol (36,8%) et le myrcène (20,2%) étaient les principaux composants.

En outre, il a été rapporté que le principal composé des huiles essentielles de *T. algeriensis* collectées à deux endroits différents au Maroc était le carvacrol (80,40% et 49,3%) (Jaafari *et al.*, 2007). Cependant, dans 2 études réalisées sur l'huile essentielle de cette espèce cultivée au Maroc, l'une a montré que les principaux composés étaient le camphre (27,7%) et l' α -pinène (20,5%) (Amarti *et al.*, 2010), alors que l'autre était dominée par le bornéol (18,3%), suivi du camphène a (11,8%), du camphre (10%) et du myrcène (8,6%) (El-Ouariachi *et al.*, 2014).

Contrairement aux autres *T. algeriensis*, les chémotypes tunisiens sont connus par l'absence du thymol et du carvacrol. Ainsi, Les feuilles étaient caractérisées par des niveaux élevés de β -pinène (19,5%), de 1,8-cinéole (11,6%) et de camphre (10,4%) (Ben Hadj Ali *et al.*, 2015). Tandis que, l'huile essentielle des feuilles et fleurs fraîches était dominée par le camphre (7,82%), le 4-terpinéol (7,36%), le β -pinène (6,75%), le 1,8-cinéole (5,54%) et le cis-sabinène hydraté (5,29%) (Zouari *et al.*, 2011).

L'HE *T. algeriensis* montre un grand polymorphisme chimique même dans des échantillons prélevés dans la même localité, comme indiqué par Hazzit *et al.* (2009). Cette caractéristique semble être commune à toutes les huiles essentielles de *Thymus* spp. (Naghdi-Badi *et al.*, 2004) et sont fréquemment attribués à l'origine, aux conditions environnementales et au stade de développement et / ou au moment de la récolte (saison) du matériel végétal (Marković, 2011).

Bien que le *T. algeriensis* soit l'une des espèces de thymus les plus rares, divers auteurs ont déjà témoigné de la présence de différents chémotypes de l'HE, tels que le thymol (Hazzit *et al.*, 2009), le linalol, le carvacrol, l'acétate de géranyl et l'acétate de terpinyle (Hazzit *et al.*, 2009), les deux premiers étant les plus courants. Le profilage chimique de notre échantillon de l'huile essentielle de *T. algeriensis* a révélé qu'il appartenait au chémotype carvacrol.

Tableau 11. Composition chimique (%) de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis*

N°	Composé	IR	%	Identification
1	Methyl-2-methylbutyrate	773	0.1	RI-MS
2	3-Heptanone	886	T	RI-MS
3	Tricyclene	924	T	RI-MS
4	α -Thujene	930	0.5	RI-MS
5	α -Pinene	937	2.2	RI-MS-St
6	Camphene	951	0.2	RI-MS-St
7	Verbenene		T	RI-MS-St
8	Sabinene	973	T	RI-MS-St
9	β -Pinene	977	0.3	RI-MS-St
10	1-Octen-3-ol	980	0.3	RI-MS
11	3-Octanone	985	0.2	RI-MS
12	β -Myrcene	990	3.0	RI-MS-St
13	3-Octanol	993	0.1	RI-MS
14	δ -2-Carene	1002	T	RI-MS-St
15	α -Phellandrene	1004	0.3	RI-MS-St
16	δ -3-Carene	1011	0.1	RI-MS-St
17	α -Terpinene	1017	2.9	RI-MS-St
18	p-Cymene	1024	18.7	RI-MS-St
19	Limonene	1030	1.8	RI-MS-St
20	1,8-Cineole	1032	0.1	RI-MS-St
21	trans- β -Ocimene	1038	0.1	RI-MS-St
22	γ -Terpinene	1060	14.8	RI-MS-St
23	cis-Linalool oxide	1074	T	RI-MS
24	1-Nonen-3-ol	1085	0.2	RI-MS
25	α -Terpinolene	1087	0.3	RI-MS-St
26	p-Cymenene	1089	T	RI-MS-St
27	Linalool	1099	2.4	RI-MS-St
28	Pinocarveol	1139	T	RI-MS
29	Camphor	1144	T	RI-MS
30	Borneol	1166	0.3	RI-MS-St
31	4-Terpineol	1177	0.4	RI-MS-St
32	p-Cymen-8-ol	1184	0.1	RI-MS-St
33	α -Terpineol	1189	0.1	RI-MS-St

35	trans-Dihydrocarvone	1200	0.3	RI-MS
36	Thymol methylether	1235	0.1	RI-MS-St
37	Carvone	1242	T	RI-MS-St
38	Thymol	1291	0.7	RI-MS-St
39	Carvacrol	1300	43.2	RI-MS-St
40	α -Copaene	1376	T	RI-MS-St
41	β -Bourbonene	1384	T	RI-MS
42	α -Gurjunene	1408	0.8	RI-MS
43	β -Caryophyllene	1419	0.6	RI-MS-St
44	β -Gurjunene	1432	T	RI-MS
45	Aromadendrene	1440	0.4	RI-MS
46	α -Humulene	1454	T	RI-MS
47	Alloaromadendrene	1461	0.2	RI-MS
48	γ -Muurolene	1477	0.1	RI-MS
49	Germacrene D	1481	0.1	RI-MS-St
50	Ledene	1486	0.4	RI-MS
51	Bicyclogermacrene	1495	T	RI-MS
52	α -Muurolene	1498	T	RI-MS
53	γ -Cadinene	1513	0.1	RI-MS-St
54	δ -Cadinene	1524	0.2	RI-MS-St
55	Spathulenol	1576	T	RI-MS-St
56	Caryophyllene oxide	1581	0.2	RI-MS-St
	Composés identifiés (%)		93,3	
	Hydrocarbures monoterpènes		43,8	
	Monoterpènes oxygénés		45,5	
	Hydrocarbures sesquiterpènes		2,9	
	Sesquiterpènes oxygénés		0,2	
	Autres		0,2	

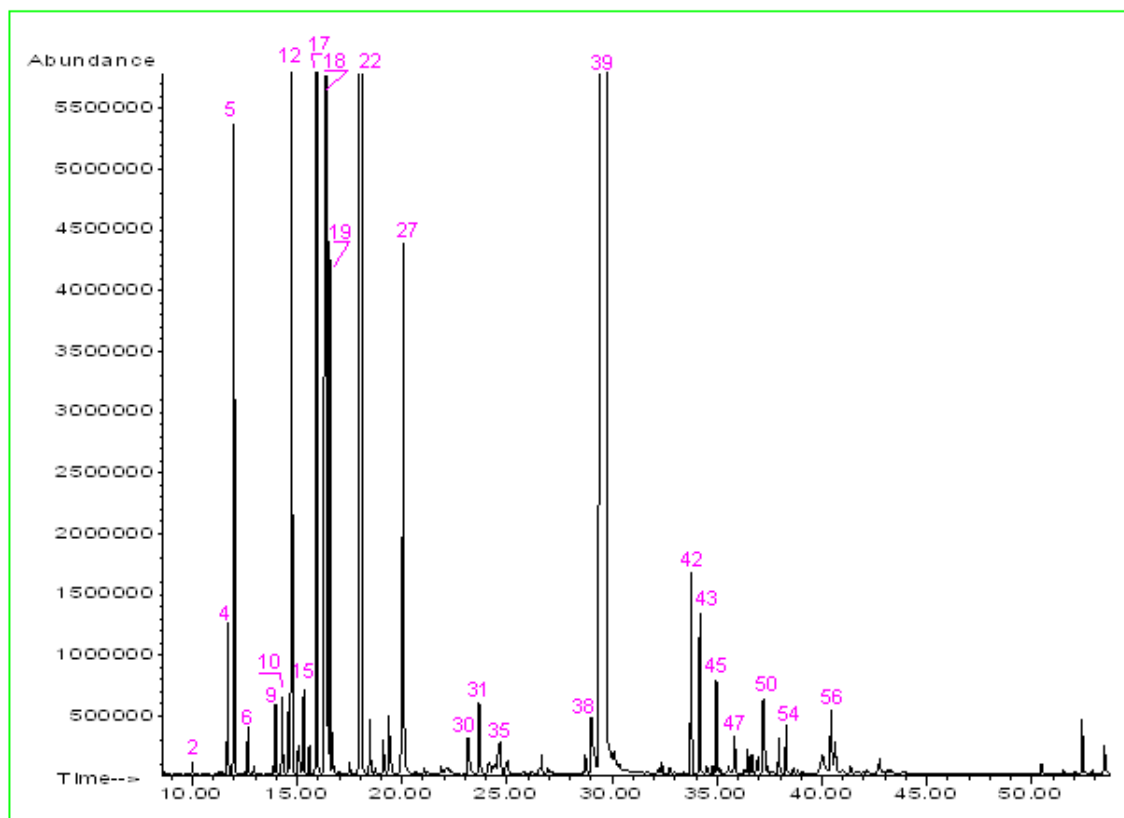


Figure 30. Chromatogramme GC-MS (agrandi) de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* (les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des constituants de l'huile du tableau 11).

1.3. *Ammoides verticillata*

Le rendement obtenu en HE d'*Ammoides verticillata* (ou *pussilla*) (2,58%, v/m) est plus ou moins important ou similaire comparativement à ceux des études réalisées sur cette plante : [Laouer et al. \(2003\)](#) (0,36%) ; [El-Ouariachi et al. \(2011\)](#) (2%, m/m) ; [Tefiani et al. \(2015\)](#) (2,9%, v/m) ; [Tefiani et al. \(2016\)](#) (1,1–3,6%, v/m) ; [Attou et al. \(2017\)](#) (2,58%, m/m).

Concernant la composition chimique de l'HE de cette plante, 26 composés ont été identifiés représentant 97,7% des composés totaux. Cette HE était dominée par les hydrocarbures monoterpéniques (40,2%) et les monoterpènes oxygénés (57,3%). Le thymol (43.3%), le carvacrol (12.0 %) et leur précurseur biosynthétique p-cymène (14.6%), en plus du limonène (11.0 %), et du γ -terpinène (9.9 %) ont été identifiés comme composés majeurs.

Cette composition peut représenter un chémotype car il diffère de celle des autres régions d'Algérie par la présence du carvacrol. En fait, l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) d'*Ammoides pusilla* de la région d'Ouled Faïd de la province de Sétif (région est) se caractérisait par le thymol (44,5%), théroène (32,9%) et le p-cymène (13,5%) comme

composants majeurs (Laouer et al., 2003). Cependant, pour celle de la région de Zeddigua, province de Tlemcen, l'alcool de cumine (44%), le p-cymène (18%), le limonène (14%), le thymol (11%) et le γ -terpinène (7%) prédominaient (Tefiani et al., 2015).

Récemment, Tefiani et al. (2016) ont étudié la composition des huiles essentielles des feuilles et des fleurs et ils ont trouvé que les monoterpènes oxygénés (54-77%) dominaient dans toutes les HE de feuilles d'*A. pusilla*, sauf une, et deux HE de fleurs (53% dans les deux cas). Le thymol dominait pratiquement toutes les HE des feuilles et des fleurs, mais l'alcool de cumine, le p-cymène et le limonène ont également atteint des pourcentages relativement élevés chez certains HE.

De leur part, Attou et al. (2017) ont trouvé un profil de l'huile de l'*Ammoides verticillata* de l'ouest de l'Algérie qui est seulement différent du nôtre par sa teneur plus importante en p-cymène et absence du carvacrol, avec le thymol comme composant majeur (45,77%), suivi de p-cymène (20,19%), limonène (15,70%) et γ -terpinène (8,42%). Cette différence peut s'expliquer par la synthèse de carvacrol à partir de son précurseur biosynthétique p-cymène du stade de développement.

Dans ce sens, Mikio et Taeko (1962) et Yamaura et al. (1992) ont suggéré que la voie de la biosynthèse du thymol comprend: - le terpinène est le composant impliqué dans le processus d'aromatisation qui conduit à la formation de p-cymène, précurseur de dérivés éventuellement oxygénés, de thymol ou de carvacrol (Fig.31). Ils supposaient que la séquence dans ce processus était la suivante : terpinène, p-cymène, thymol ou carvacrol. Nos résultats sont en accord avec Özguven et Tansi (1998) et Alizadeh et al. (2013) qui ont démontré que la teneur maximale en thymol était observée au stade de la floraison, puis diminué au stade post-floraison.

Par ailleurs, pour l'*Ammoides pusilla* de la Tunisie, la composition de l'huile essentielle des feuilles, des fleurs et des parties aériennes étaient caractérisée par le thymol (39,6% et 33,05%), le γ -terpinène (28,97% et 28,19%) et le p-cymène (13,69% et 15,31%) et du thymol méthyléther (7,33% et 8,91%) comme composants principaux respectivement (Souhail et al., 2017). Inversement, l'huile essentielle du Maroc était caractérisée par des teneurs élevées en carvacrol (44,6%) et très faibles en thymol (3,4%). Les autres principaux composants étaient le limonène (18,4%), le g-terpinène (9,5%), le p-cymène (9,4%) (El-Ouariachi et al., 2011).

Tableau 12. Composition chimique (%) de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*

N°	Composé	RI	%	Identification
1	α -Thujene	930	0.2	RI-MS
2	α -Pinene	937	1.1	RI-MS-St
3	Camphene	951	T	RI-MS-St
4	Sabinene	973	0.2	RI-MS-St
5	β -Pinene	977	0.3	RI-MS-St
6	β -Myrcene	990	0.6	RI-MS-St
7	δ -2-Carene	1000	0.1	RI-MS-St
8	α -Phellandrene	1004	0.1	RI-MS-St
9	δ -3-Carene	1011	T	RI-MS-St
10	α -Terpinene	1017	0.7	RI-MS-St
11	<i>p</i> -Cymene	1024	14.6	RI-MS-St
12	Limonene	1030	11.0	RI-MS-St
13	1,8-Cineole	1032	0.3	RI-MS-St
14	γ -Terpinene	1060	9.9	RI-MS-St
15	cis-Sabinene Hydrate		0.1	RI-MS
16	Terpinolene	1087	0.3	RI-MS-St
17	<i>p</i> -Cymenene	1089	T	RI-MS
18	4-Terpineol	1177	0.6	RI-MS-St
19	Thymol methyl ether	1235	0.8	RI-MS-St
20	Carvacrol methyl ether	1240	0.2	RI-MS-St
21	Thymol	1291	43.3	RI-MS-St
22	Carvacrol	1300	12.0	RI-MS-St
23	β -Caryophyllene	1419	T	RI-MS-St
24	γ -Muuroolene	1477	T	RI-MS
25	Germacrene D	1481	T	RI-MS-St
26	γ -Cadinene	1513	T	RI-MS-St
27	δ -Cadinene	1524	T	RI-MS-St
	Composés identifiés (%)		96,4	
	Hydrocarbures monoterpènes		55,3	
	Monoterpènes oxygénés		34,5	
	Hydrocarbures sesquiterpènes		3,9	
	Sesquiterpènes oxygénés		0,5	
	Autres		0,2	

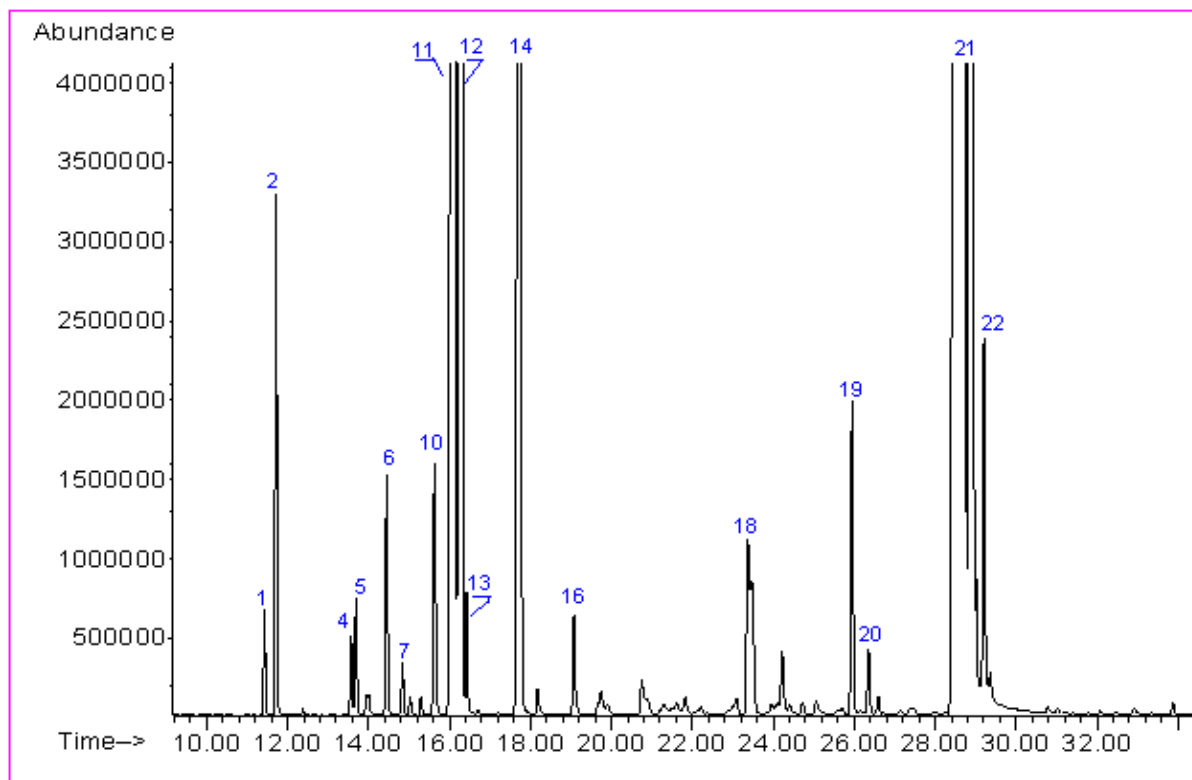


Figure 31. Chromatogramme GC-MS (agrandi) de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*. Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordres des composés du tableau 12.

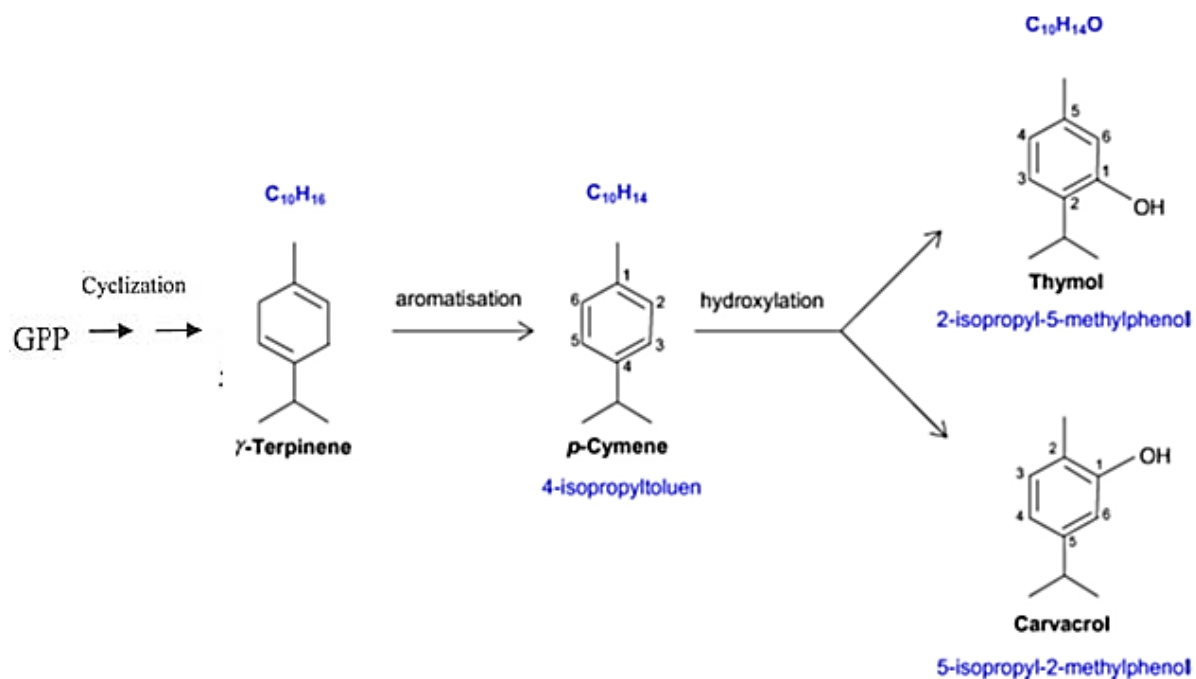


Figure 32. Schéma de biosynthèse de carvacrol et de thymol (Mikio et Taeko, 1962).

Bien que les métabolites secondaires des plantes médicinales et aromatiques soient contrôlés de manière conventionnelle par leurs génotypes, leur biosynthèse est également fortement influencée par des facteurs environnementaux. Cela signifie que des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques affectent les paramètres de croissance, le rendement en huile essentielle et les constituants de ces huiles (Wang *et al.*, 2008 ; Verma *et Shukla*, 2015).

Le modèle de composition de l'huile essentielle, la concentration de composants individuels et le rendement en HE dépendent de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les conditions internes de la plante comprennent la génétique (espèce, écotype et chémotype), la population végétale, l'origine de la plante, le type de partie de la plante, son stade de développement ou la période d'échantillonnage saisonnier, la voie physiologique et biochimique et la physiologie de la plante entière; l'état de développement des tissus synthétiques et des processus métaboliques est particulièrement significatif. Les facteurs externes incluent les facteurs environnementaux (climat et conditions de l'habitat, date de semis et variations des engrais), les conditions de culture (techniques agricoles) (température, humidité, rayonnement, vent, propriétés du sol, lieu géographique, temps et méthodes de récolte) et techniques post-récolte (méthodes de séchage et extraction, temps de distillation, méthodes de quantification et conditions d'analyse) (Yatagai *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2008 ; Figueiredo *et al.*, 2008 ; Moghaddam *et al.*, 2015 ; Yuan *et al.*, 2016 ; Rehman *et al.*, 2016 ; Moghaddam *et Mehdizadeh*, 2017).

Les changements climatiques au cours des saisons (température, humidité, rayonnement UV-B, CO₂ atmosphérique, etc.) ont un impact significatif sur la synthèse des terpènes. Les effets climatiques pourraient être directement influencés par l'activité de plusieurs enzymes, telles que l'isopentényl diphosphate isomérase et les prényltransférases, catalysant la synthèse de nombreux terpènes, ou indirectement par la régulation négative ou la dégradation du métabolisme primaire et, par conséquent, l'insuffisance de métabolites photosynthétiques impliqués dans la voie de biosynthèse des terpènes. Ainsi, le changement des voies biochimiques des plantes et des processus physiologiques en fonction du temps de récolte pourrait réduire ou provoquer la synthèse de différents composés terpéniques ayant des conséquences importantes sur la protection des plantes contre les contraintes environnementales (Rahali *et al.*, 2017).

2. Détermination de la teneur et profil en composés phénoliques

2.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement distribués dans les plantes comestibles et non comestibles. Ces composés ont reçu une attention considérable en raison de leur activité antioxydante et de leurs capacités de piégeage des radicaux libres. Ils peuvent être extraits par différents solvants et méthodes. Les flavonoïdes, l'un des groupes naturels les plus divers et les plus répandus, sont probablement les plus importants phénols naturels et leurs teneurs sont en corrélation avec la capacité antioxydante (Prasad *et al.*, 2009 ; Tung *et al.*, 2009).

Les valeurs des teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et en flavonoïdes totaux (FT) des extraits éthanoliques de *T. algeriensis*, de *T. polium* et d'*Ammoides verticillata* sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 13. Rendement, teneur en composés phénoliques totaux (CPT) et en flavonoïdes totaux (FT)

Espèce	Rendement (%)	Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g MS)
<i>T. algeriensis</i>	29,06	170,46 ± 1,35 ^a	45,12 ± 0,93 ^b
<i>T. polium</i>	26,88	108,60 ± 1,62 ^b	25,33 ± 0,29 ^c
<i>A. verticillata</i>	36,69	170,28 ± 1,45 ^a	67,79 ± 1,34 ^a

Les seules études trouvées dans la littérature concernant les extraits éthanoliques non volatils de *T. algeriensis* en Algérie montrent que la quantité de CPT (170,46 mg EAG / g extrait) est inférieure à celle rapportée pour le *T. algeriensis* tunisien (240,32 mg EAG / g d'extrait) (Megdiche-ksouri *et al.*, 2015) et plus élevé que celui du sud de l'Algérie (18,73 mg de EAG / g d'extrait) (Bakchiche *et al.*, 2013).

Inversement, en comparaison avec le *T. algeriensis* de Tunisie, les FT étaient plus élevés dans notre échantillon de thymus (45,12 vs 15 mg EQ / g d'extrait). En revanche, les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes étaient en quantités proches avec ceux de *T. vulgaris* turc (170,46 contre 158 mg EAG / g d'extrait et 45,12 contre 44,2 EQ / g d'extrait, respectivement) (Köksal *et al.*, 2017).

Quelques autres valeurs relatives à d'autres espèces de *Thymus* peuvent être trouvées dans la littérature, montrant une grande variabilité dans les teneurs de ces composés phénoliques (Nickavar et Esbati, 2012 ; Roby et al., 2013 ; Labiad et al., 2017).

Quant à l'extrait éthanolique d'*Ammoides verticillata*, il a la même teneur en CPT que celui du *Thymus algeriensis* (170,28 vs 170,46 mg EAG / g d'extrait) mais une teneur plus importante en flavonoïdes (67,79 vs 45,12 mg EQ / g d'extrait) ($P < 0,05$).

Comparativement aux seules valeurs rapportées dans la littérature pour cette plante, la teneur en composés phénoliques totaux dans notre échantillon est plus faible que celle des extraits de l'éther diéthylique et de l'acétate d'éthyle l'*Ammoides verticillata* du Maroc (170 contre 251 et 343 mg EAC / g d'extrait. mais plus riche ou d'une même richesse en flavonoïdes ($67,79 \pm 1,34$ vs 27 ± 2 et 73 ± 4 mg EQ / g) respectivement (El-Ouariachi et al., 2011). Cette différence de valeurs des teneurs en composés phénoliques pourrait être expliquée par le type du standard utilisé dans le dosage (acide cafféique vs acide gallique dans cette étude).

En ce qui concerne l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum*, les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes (CPT et FT) étaient toutes les deux plus petites que celles de *T. algeriensis* et d'*Ammoides verticillata* avec des teneurs de $108,60 \pm 1,62$ et $25,33 \pm 0,29$ mg/g respectivement.

. Les valeurs enregistrées pour notre échantillon étaient également inférieures à celles rapportées pour d'autres échantillons de *T. polium* (Abdollahi et al., 2003 ; Al Bahiti et al., 2012 ; Ghara et al., 2016). Par contre, ces valeurs appartiennent à l'intervalle de valeurs rapportées par Stankovic et al. (2012) qui ont évalué le contenu phénolique de vingt extraits différents de la plante entière et de ses parties (feuilles, fleurs et tiges) de *Teucrium polium* subsp. *polium* obtenus à l'aide de cinq solvants différents (eau, méthanol, acétate d'éthyle, acétone et éther de pétrole). Ils ont trouvé que la teneur totale en composés phénoliques variait entre 14,57 et 157,84 mg de EAG / g d'extrait, et celle des flavonoïdes variaient de 6,48 à 139,87 mg de ERu/ g d'extrait.

Il est intéressant de noter que malgré la même teneur en composés phénoliques des extraits de *Thymus algeriensis* et *Ammoides verticillata*, leurs taux d'extraction sont différents (29,06 vs 36,69 mg/g EAG). En fait, Hinneburg et al. (2006) ont trouvé aucune association significative n'a été détectée entre les rendements d'extraction et les phénols totaux provenant d'herbes et d'épices culinaires sélectionnées. En outre, Albano et al. (2012) ont suggéré que les

plantes ayant de bons extraits de rendement mais des phénols totaux faibles peuvent contenir des composés non phénoliques solubles dans l'eau en quantités relativement élevées.

Par ailleurs, l'analyse des composés phénoliques totaux peut être affectée par le traitement des échantillons, la méthode et le solvant utilisés dans l'extraction, la qualité des standards, aussi bien que les caractéristiques spécifiques de chaque espèce et la sous-espèce des plantes (Bohn *et al.*, 2015).

En effet, Dambolena *et al.* (2010) ont conclu que les variables climatiques ($R^2 = 0,70$; $p = 8,3 \times 10^{-6}$) peuvent expliquer 70% de la variabilité de la teneur en phénols totaux et de l'activité de piégeage des radicaux libres, la température étant la variable climatique la plus importante.

Ces facteurs peuvent expliquer les différences observées entre les teneurs phénoliques des extraits analysés en cette étude et les valeurs identifiées dans la littérature pour ces plantes. En dépit de ces différences, les résultats indiquent que ces plantes sont des sources importantes des composés phénoliques.

2.2. Profilage chromatographique des composés phénoliques des extraits éthanoliques

Le profilage chimique par HPLC-DAD-UV des extraits de plantes étudiés a permis d'identifier plusieurs composés acides phénoliques, flavonoïdes et leurs glycosides.

Les composés identifiés sont montrés dans le tableau 14. Les pourcentages donnés à chaque composé représentent son pourcentage dans le total des composés identifiés dans la même longueur d'onde où elle représente son absorption maximale.

Les composés non identifiés représentent soit des composés non phénoliques contenus dans les extraits comme les protéines, sucres ou autres soit des composés phénoliques qui n'ont pas pu être identifiés dû à l'absence du standard d'identification correspondant.

Tableau 14. Composition chimique (%) des extraits éthanoliques des plantes étudiées

N°	Composé	<i>T. polium</i> subsp <i>capitatum</i>	<i>T. algeriensis</i>	<i>A. verticillata</i>
1	Acide gallique	–	0,15	0,24
2	Acide tannique	–	–	0,20
3	Résorcinol	–	1,60	–
4	Catéchine	–	0,41	–
5	Catéchol	–	0,33	–
6	Esculétine	–	4,53	–
7	Acide caféique	3,54	0,53	2,09
8	1,2 dihydroxybenzène	–	2,11	–
9	Rutine	–	8,69	1,34
10	Acide n-hydroxycinnamique	40,17	–	–
11	Lutéoline 7-O-glucoside	6,89	1,96	36,91
12	Acide férulique	4,10	–	–
13	Non identifié	–	51,09	–
14	Acide 2-méthoxybenzoïque	–	–	–
15	Acide 3-hydroxy-4- méthoxycinnamique	4,28	–	8,38
16	Naringinine 7-O-glucoside	–	6,18	–
17	Acide 3-méthoxybenzoïque	–	1,02	15,03
18	Acide 3,4,5 tri-méthoxy cinnamique	1,13	–	–
19	Lutéoline	2,11	–	2,22
20	Apéginine	5,60	1,26	0,13
21	Acide trans-di-méthoxy- cinnamique	–	1,08	–

2.2.1. Profil phénolique de l'extrait de *Teucrium polium* subsp *capitatum*

8 composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, dont 5 acides phénoliques (acide caféique, acide n-hydroxy cinnamique, acide férulique, acide 3 hydroxy 4 méthoxy cinnamique et acide 3,4,5 tri-méthoxy-trans cinnamique) et 3 flavonoïdes (lutéoline 7-O-glucoside, lutéoline et apégenine). L'acide n-hydroxycinnamique représente le composé prédominant (40,17%).

Plusieurs auteurs ont signalé la présence de ces composés dans les différents extraits de *T. polium* comme l'acide férulique et l'acide caféique (Djeridane et al., 2007), la lutéoline et, l'apégenine (Sharififar et al., 2009 ; Goulas et al., 2012), la lutéoline 7-O-glucoside (De Marino et al., 2012), la lutéoline et l'apégenine (Pacifico et al., 2012). L'un des pics non identifiés pourrait représenter le poliumoside, ester de l'acide caféique, est un marqueur chimique spécifique de la section *polium* (Andary et al., 1988 ; El Oualidi et al., 1996).

Le chromatogramme HPLC-DAD-UV des composés phénoliques de l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum* est présenté sur la figure 33.

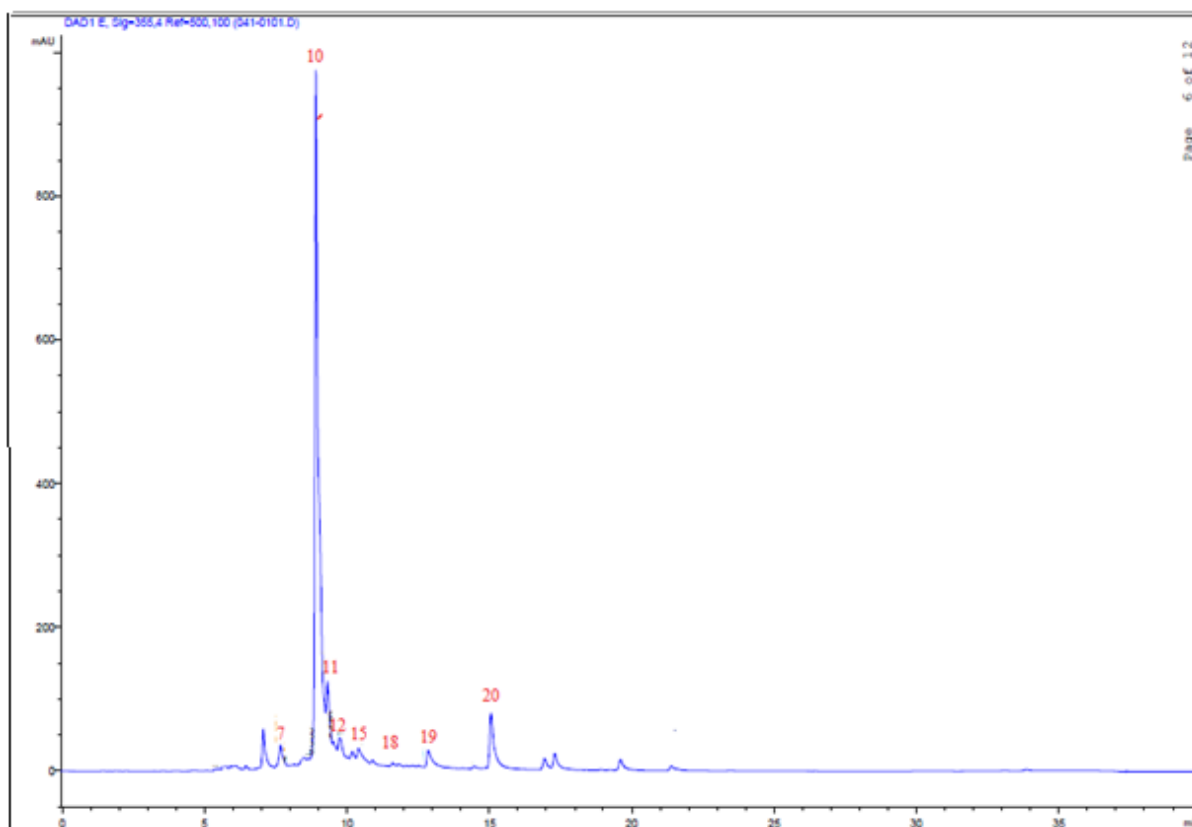


Figure 33. Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait de *Teucrium polium* subsp *capitatum* (Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 14).

2.2.2. Profil phénolique de l'extrait de *Thymus algeriensis*

Au total, 13 composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait de *Thymus algeriensis*, représentés par 3 acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, acide trans-di-méthoxy cinnamique), 6 flavonoïdes (catéchine, lutéoline 7-O-glucoside, naringénine 7-O-glucoside, esculétine, rutine et apigénine) et 2 benzènediols (résorcinol et catéchol). D'autres composés moins importants et non identifiés présentaient des spectres UV ressemblant à ceux des acides hydroxycinnamiques (3,4,5 triméthoxycinnamique, trans-cinnamique) et des dérivés flavonoïdes comme la quecétine.

Le chromatogramme HPLC-DAD-UV des composés phénoliques de l'extrait de *T. algeriensis* est présenté sur la figure 34.

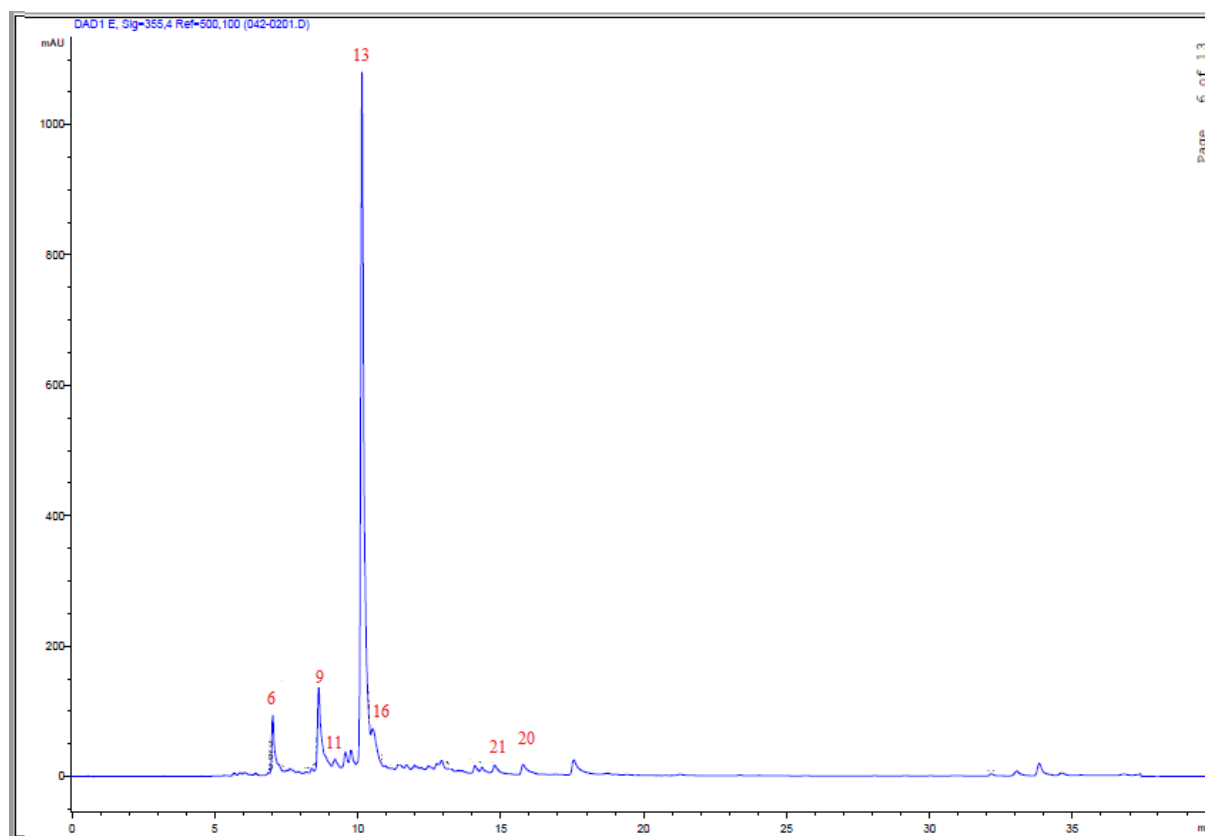


Figure 34. Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait de *Thymus algeriensis* (Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 14)

Le composé majoritaire non identifié serait l'acide rosmarinique (51,09%) qui a été signalé par plusieurs auteurs comme composé prédominant dans les espèces de thymus : *T. vulgaris* (Zheng et Wang, 2001), *T. citriodorus* (Pereira et al., 2013), *T. sipyleus* (Gökbulut,

2015), *T. serpyllum* (Sonmezdag et al., 2016). Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Ziani et al. (2018) sur le *T. algeriensis*.

Autres composés identifiés ont été déjà rapportés par Boutaoui et al. (2018) pour le *Thymus algeriensis* Tunisien comme l'acide gallique, la catéchine, la rutine et la naringénine.

La présence d'acides caféique et rosmarinique, de lutéoline et d'apigénine, a été observé précédemment dans d'autres *Thymus* spp. (Kulišić et al., 2006 ; Özgen et al., 2011 ; Gökbulut, 2015).

De plus, le lutéoline 7-O-glucoside a été identifié les feuilles et thym sauvage (*T. serpyllum* Boiss.) (Zheng et Wang, 2001 ; Miron et al., 2011 ; Sonmezdag et al., 2016).

Boros et al., (2010) ont caractérisé le motif polyphénolique de cinq espèces de thymus hongrois indigènes (*T. glabrescens* Willd., *T. pannonicus* All., *T. praecox* Opiz, *T. pulegioides* L. et *T. serpyllum* L.) et signalé que le composé dominant était l'acide rosmarinique, compris entre 83,49 µg/g et 1,436 mg/g. Autres acides phénoliques (acide férulique, acide caféique et ses autres dérivés, acide chlorogénique et acides p-coumariques) présents chez toutes les espèces de thymus examinées, ainsi que les flavanones : naringénine, ériodictyol et dihydroquercétine; flavones: apigénine et apigénine-7-glucoside ; flavonols : quercétine et rutine. Ils ont suggéré que le motif polyphénolique s'est révélé être un outil chimiotaxonomique supplémentaire utile aux fins de la classification et de la détermination de la localité d'origine.

2.2.3. Profil phénolique de l'extrait d'*Ammoides verticillata*

Pour l'extrait d'*Ammoides verticillata*, nous avons pu identifier 9 composés dont 6 acides phénoliques (acide gallique, acide tannique, acide caféique, acide 3 hydroxy 4méthoxy cinnamique, acide férulique) et 4 flavonoides (rutine, lutéoline 7-O-glucoside, lutéoline, apéginine). Le lutéoline 7-O-glucoside a été identifié comme composé majoritaire (36,91%) suivi de l'acide 3-méthoxybenzoïque (15,03%).

Le chromatogramme HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait de l'*A. verticillata* est présenté sur la figure 35.

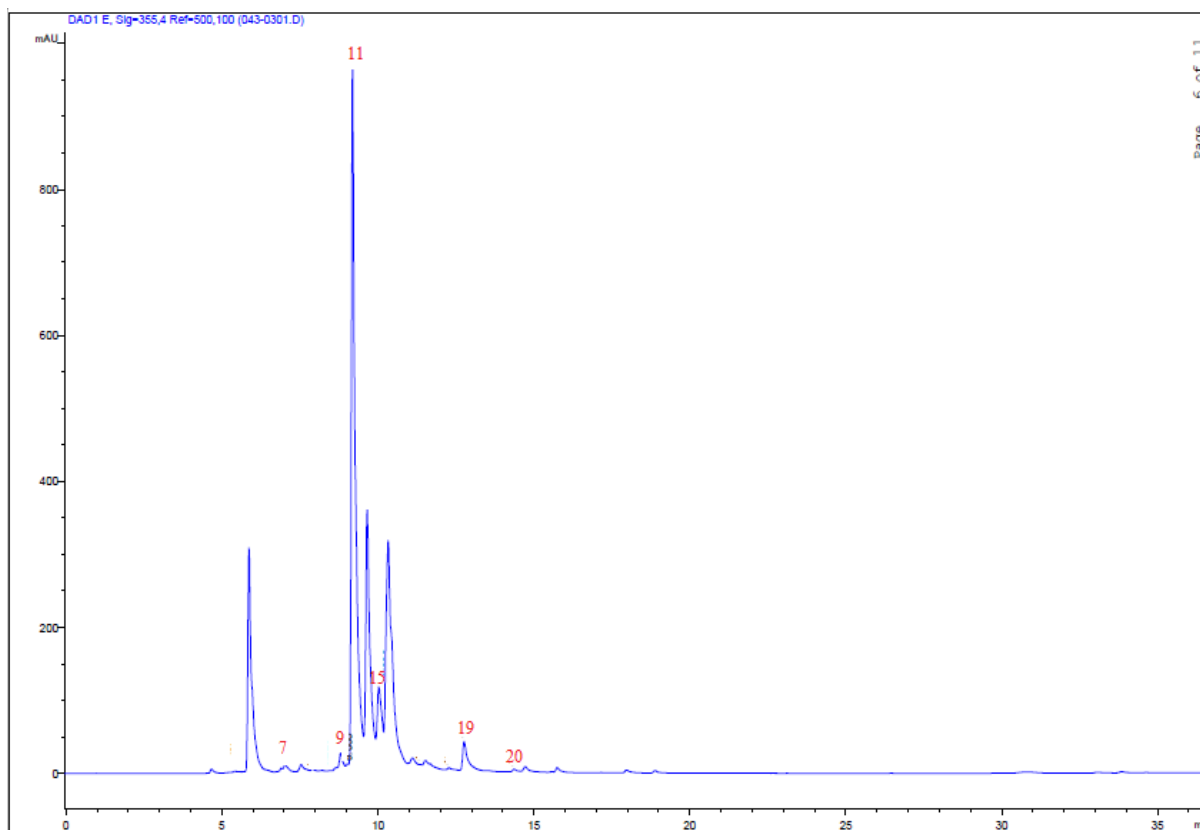


Figure 35. Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 355nm de l'extrait d'*Ammoides verticillata* (Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 14)

Plusieurs auteurs ont identifié ces composés dans le genre *Ammoides*. [Saleh et al. \(1983\)](#) ont signalé le lutéoline 7-O-glucoside chez un *A. pussila égyptien*.

[Bousetla et al. \(2005\)](#) ont isolé l'apigénine 7-O-glucoside en plus de quercétine 3-O-b-glucoside et lutéoline 7-O-a-L-rhamnosyl-(1-6)-b-D-glucopyranoside à partir d'*Ammoides atlantica* espèce endémique algérienne.

En plus de ces 2 composés l'apigénine 7-O-glucoside et le lutéoline 7-O-glucoside, [Laouaar et al. \(2008\)](#) ont isolé et identifié 2 autres flavonoïdes à partir des parties aériennes d'*Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf : l'apigénine ; lutéoline.

Néanmoins, à la connaissance de l'auteur, la composition phénolique individuelle de d'*Ammoides verticillata* n'avait pas été rapportée auparavant. L'un des composés importants non identifié serait l'apigénine 7-O-glucoside.

3. Etude de l'activité anti-cholinestérasique

L'inhibition de la cholinestérase est devenue une approche clinique largement utilisée pour traiter les symptômes de la MA. De nombreuses substances phytochimiques ont démontré une activité inhibitrice de l'AChE et pourraient donc être bénéfiques dans le traitement de troubles neurodégénératifs tels que la MA (Dastmalchi *et al.*, 2007).

De plus, une grande quantité de preuves démontre que le stress oxydatif est intimement impliqué dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge. Il y a eu un grand nombre d'études qui ont examiné les avantages des antioxydants pour réduire ou bloquer les neurones la mort survenant dans la physiopathologie de ces troubles (Ramassamy, 2006).

Dans la mesure où notre étude bibliographique est aussi certaine, il n'existe aucune étude concernant l'activité anti-ChE chez les espèces étudiées. Par conséquent, cette étude est la première. Les résultats pour l'inhibition de l'acétyl (butyryl) cholinestérase par les extraits et les HEs exprimés en termes de pourcentage d'inhibition et d'IC₅₀ sont montrés sur les figures 36, 37 et le tableau 15 respectivement.

Tableau 15. Effet inhibiteur des huiles essentielles et des extraits éthanoliques sur BChE et AChE exprimé en IC₅₀ (µg / ml)

Echantillons		BChE	AChE
<i>T. algeriensis</i>	EE	214,76 ± 2,18 ^e	Nd
	HE	124,09 ± 2,84 ^c	98,84 ± 1,81 ^b
<i>T. polium</i>	EE	Nd	Nd
	HE	89,71 ± 0,41 ^b	261,97 ± 1,70 ^c
<i>A. verticillata</i>	EE	Nd	Nd
	HE	188,90 ± 2,87 ^d	201,43 ± 2,73 ^d
Galanthamine	-	34.75 ± 1.99 ^a	6.27 ± 1.15 ^a

Les valeurs dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Tukey (p <0,05)

Nd : non disponible dans la gamme des concentrations testées

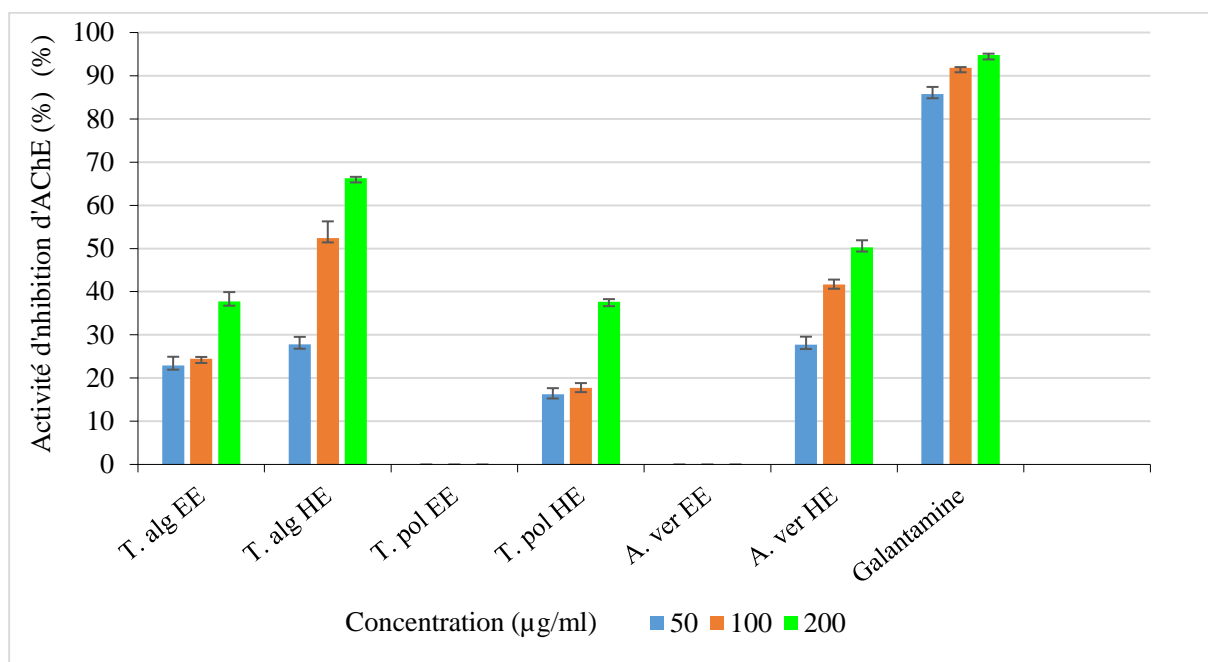


Figure 36. Activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) exprimée en pourcentages

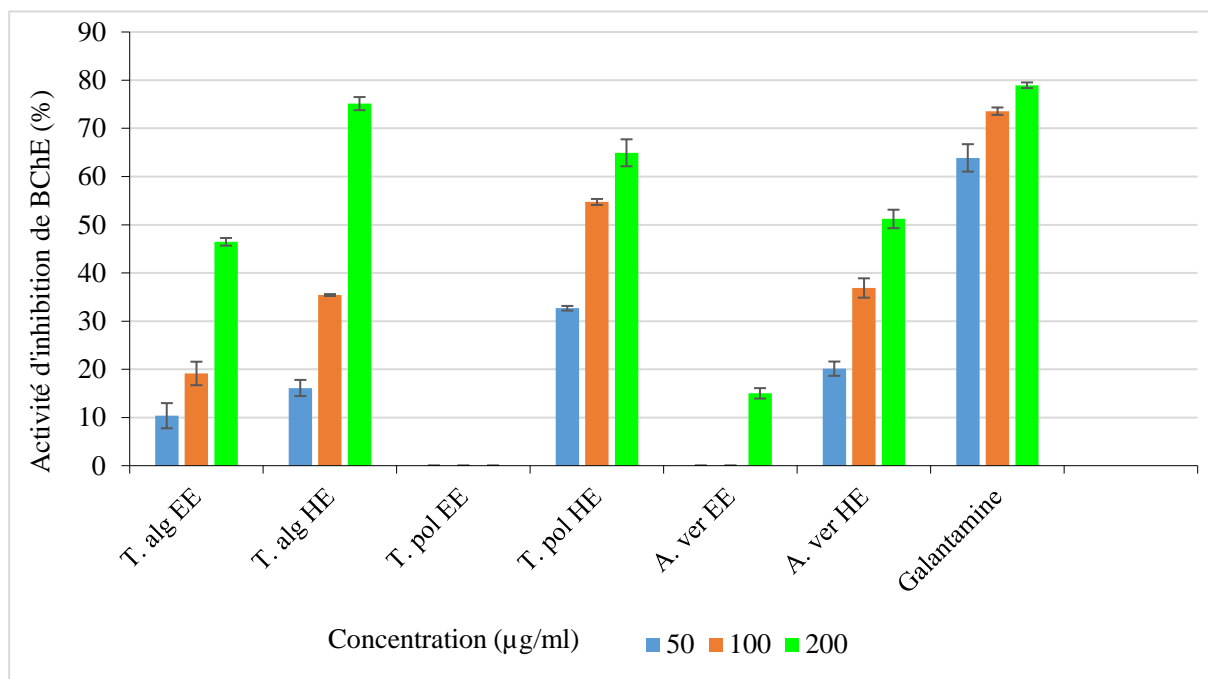


Figure 37. Activité d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE) exprimée en pourcentages

Tous les échantillons testés ont montré une certaine activité inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (Fig. 36) et de la butyrylcholinestérase (Fig. 37) de manière dose-dépendante ($P < 0,05$) mais ils étaient moins actifs que le standard (galantamine, $IC_{50} = 6.27 \pm 1.15$ et 34.75 ± 1.99 $\mu\text{g/ml}$ respectivement).

Les huiles essentielles ont montré de meilleures activités que les extraits. Cette tendance est en accord avec les résultats rapportés par [Mata et al. \(2007\)](#) qui ont étudié les huiles essentielles et les extraits éthanoliques de cinq plantes utilisées comme épices portugaises et ont trouvé que toutes les HE ont eu une meilleure activité AChE que les EE. De plus, parmi les plantes étudiées, le *Thymus serpyllum* riche en carvacrol dont l'HE était moins active que celle d'un *Rosmarinus officinalis* riche en verbénone. En outre, l'huile essentielle de *Teucrium polium* riche en hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques était plus active que l'EE riche en composés phénoliques.

La meilleure activité inhibitrice de l'AChE a été obtenue avec l'HE de *T. algeriensis* qui présentait une IC_{50} de $98,84 \pm 1,81$ $\mu\text{g/ml}$, étant deux fois plus importante que celle d'*Ammoides verticillata* avec une IC_{50} de $201,43 \pm 2,73$ $\mu\text{g/ml}$. L'HE de *T. polium* subsp *capitatum* s'est révélé l'échantillon le moins actif (IC_{50} de $261,97 \pm 1,70$ $\mu\text{g/ml}$).

Une activité similaire à celle de l'HE de *T. polium* subsp *capitatum* a été rapportée par [Tel et al. \(2010\)](#) pour l'huile essentielle de *Salvia chionantha* Boiss dont les principaux composés étaient le germacrène D (25,03%), le b-caryophyllène (8,71%), le spathulénol (5,86%) et l'a-humulène (4,82%) qui présentait une activité inhibitrice modérée de l'acétylcholinestérase ($56,7 \pm 1,9\%$) à une concentration de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Cependant, inversement à l'activité anti-AChE, l'huile de *T. polium* subsp *capitatum* a exercé la meilleure activité inhibitrice de la BChE avec une IC_{50} de $89,71 \pm 0,41$ $\mu\text{g/ml}$, manifestant un effet plus puissant que les 2 huiles essentielles riche en hydrocarbures monoterpéniques. L'HE de *T. algeriensis* s'est montrée plus active que celle d'*A. verticillata* (IC_{50} avec $124,09 \pm 2,84$ vs $188,90 \pm 2,87$ $\mu\text{g/ml}$). Cette forte activité anti-BChE de *Teucrium polium* subsp *capitatum* pourrait être attribuée au β -pinène ([Savelev et al., 2004](#)).

La teneur élevée en monoterpènes peut justifier la bioactivité des huiles essentielles. Différentes études ont démontré l'activité d'inhibition de l'AChE de cette classe de métabolites secondaires. Plusieurs monoterpénoïdes identifiés dans ces huiles essentielles comme le carvacrol, 1,8-cineole, α -pinène et 3-carène ont déjà été étudiés pour leur activité inhibitrice

potentielle de la cholinestérase (Perry et al., 2000, Jukic et al., 2007, Aazza et al., 2011 ; Miyazawa et Yamafuji, 2005).

Mata et al. (2007) ont trouvé que le carvacrol, le composant essentiel de l'huile essentielle du thym sauvage *Thymus serpyllum*, présentait à lui seul une $IC_{50} = 115 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$, ce composé n'étant présent qu'à 56%, n'expliquant pas l'activité retrouvée pour la fraction $IC_{50} = 190 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$. Les autres composants présents dans cette huile contribuent probablement, dans une faible mesure, à l'activité exposée.

La forte activité de *T. algeriensis* par rapport à l'*A. verticillata* est due à leurs principaux constituants le carvacrol, le thymol et le limonène respectivement. En effet, Jukic et al. (2007) ont rapporté que l'effet inhibiteur de l'AChE exercé par le carvacrol était 10 fois plus fort que celui exercé par son isomère thymol avec des valeurs d' IC_{50} de 63 et 540 $\mu\text{g/ml}$, bien que le carvacrol et le thymol aient une structure très similaire. Cela suggérait que la position du groupe hydroxyle dans leur structure moléculaire joue un rôle crucial sur l'effet inhibiteur de l'AChE. En outre, une bioactivité faible a été rapportée pour le limonène (IC_{50} de 225,9 et 456,2 $\mu\text{g/ml}$ pour AChE et BChE, respectivement) (Menichini et al., 2009b).

Parmi tous les extraits éthanoliques, l'activité la plus importante a été enregistrée pour celui de *T. algeriensis* qui a montré une activité anti-BChE avec une IC_{50} de $214,76 \pm 2,18 \mu\text{g/ml}$. Les extraits d'*Ammoides verticillata* et de *T. polium* subsp *capitatum* se sont révélés faiblement actif (15% d'inhibition à 200 $\mu\text{g/ml}$) ou inactif vis-à-vis l'enzyme bytyrylcholinesterase respectivement. De même, l'extrait de *T. algeriensis* a exhibé une activité anti-AChE faible avec une inhibition de 37% à 200 $\mu\text{g/ml}$. Les extraits d'*Ammoides verticillata* et de *T. polium* subsp *capitatum* ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis cette enzyme.

Vinutha et al. (2007) classent l'efficacité de l'inhibition de l'AChE (%) par les extraits comme suit :

- puissant (inhibition > 50%),
- modéré (inhibition 30-50%),
- faible (inhibition <30%) et
- nul (inhibition <5%).

Selon cette classification, les extraits de *T. polium* subsp *capitatum* et *Ammoides verticillata* plantes peuvent être considérées comme nulles. L'extrait de *T. algeriensis* et l'huile de *T. polium* subsp *capitatum* comme faibles, l'HE d'*Ammoides verticillata* comme modéré et l'HE de *T. algeriensis* comme inhibiteur puissant.

Ces résultats montrent que la richesse en composés phénoliques n'est pas un atout majeur dans l'inhibition de l'AChE du fait que la plupart des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont connus pour contenir l'azote, l'activité faible de ces extraits peut être due à leur teneur faible en alcaloïdes (Orhan et al., 2004).

L'activité de l'extrait de *Thymus algeriensis* par rapport aux autres, pourrait être attribuée à sa composition en acides phénoliques actifs. Dans ce sens, Szwajgier (2013) a étudié l'aptitude de 36 acides phénoliques et de leurs dérivés à inhiber l'acétyl- et la butyrylcholinestérase et trouvé que les inhibiteurs d'acétylcholine les plus efficaces étaient les suivants : acide carnosique = acide gentisique > acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique = férulate d'éthyle = vanillate d'éthyle = acide nordihydroguaiarétique > 4-hydroxybenzoate d'éthyle = méthyl-férulate. L'ordre d'efficacité vis-à-vis de la butyrylcholinestérase était : acide carnosique > acide nordihydroguaiarétique = éthylférulate > acide salicylique > acide gentisique > acide rosmarinique = acide caftarique > acide homogentisique. L'activité inhibitrice dépendait du nombre / de la position des groupes OH et / ou OCH₃ attachés à un cycle phénolique. Il spéculait que la substitution de l'OCH₃ dans le noyau phénolique pouvait favoriser une activité anti-butrylcholinestérase plus élevée (bien que non statistiquement confirmé à p < 0,05). La présence d'un groupe CH=CH-COOH a eu un effet très favorable sur l'activité antiacétylcholinestérase par rapport à un groupe CH₂-CH₂-COOH ou COOH. Les esters méthyliques et éthyliques étaient des inhibiteurs plus puissants que les acides libres correspondants. Le poids moléculaire des composés (de l'ordre de M = 154,12 - 474 g / mol) a joué un rôle mineur dans ce contexte.

La bioactivité des terpénoïdes contre l'AChE peut être liée à leur hydrophobicité. En fait, le site actif hydrophobe de l'AChE est signalé être sensible aux interactions hydrophobes (Loizzo et al., 2008).

Les monoterpènes consistent en un squelette hydrocarboné, cyclique ou acyclique, ce qui peut contribuer à leur activité anti-AChE. Pour les monoterpénoïdes bicycliques avec un squelette carane ou pinane, la puissance de l'inhibition de l'AChE était associée à la position de la double liaison (Houghton et al., 2006). Cependant, l'activité inhibitrice de l'huile essentielle

résulte généralement d'une interaction complexe entre ses constituants, qui produisent des réponses à la fois synergiques et antagonistes (Perry *et al.*, 2000 ; Tundis *et al.*, 2012).

Les molécules d'huiles peuvent non seulement moduler dynamiquement l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme AChE, mais peuvent également avoir des effets stériques et / ou allostériques sur dernier (Tai *et al.*, 2002). La présence d'une double activité anti-cholinestérase chez les plantes peut être expliquée comme un mécanisme défensif contre les herbivores (Schmeller *et al.*, 1997). Li *et al.* (2000) ont démontré que BuChE n'est pas une cholinestérase mineure mais abondante dans les tissus des mammifères.

4. Etude de l'activité antioxydante

Les tests antioxydants *in vitro* sont conçus pour imiter les réactions d'oxydation-réduction survenant couramment dans les systèmes biologiques vivants et sont utilisés pour estimer le potentiel antioxydant de divers échantillons chimiques et biologiques (Amiri, 2012). L'activité antioxydante d'un extrait, en particulier lorsqu'il s'agit d'échantillons alimentaires et biologiques, dépend de plusieurs paramètres tels que l'effet de matrice, les paramètres d'oxydation, les conditions et les mécanismes de réaction de l'antioxydant. Afin d'évaluer l'activité antioxydante d'un produit naturel, il est crucial de mettre en œuvre plusieurs méthodes antioxydantes, en tenant compte des divers aspects de l'oxydation dans les systèmes examinés (Gioti et al., 2009).

Bien que la bioactivité des flavonoïdes semble provenir de divers mécanismes, une attention particulière a été portée à leurs actions antioxydantes directes et indirectes. Les propriétés antioxydantes sont conférées aux flavonoïdes par les groupes hydroxyles phénoliques attachés aux structures cycliques et ils peuvent agir comme piègeurs de radicaux libres, agents réducteurs et chélateurs de métaux (Carocho et Ferreira, 2013).

Dans ce contexte, 6 tests de ce type les plus utilisés, à savoir capacité de piégeage des radicaux DPPH[•], ABTS^{•+} et superoxyde (O₂^{•-}), capacité de prévention de la peroxydation lipidique par le test du blanchiment du β-carotène et capacités réductrices des ions cuivriques et ferriques ont été appliqués pour évaluer les capacités antioxydantes des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *T. polium* subsp *capitatum*, de *T. algeriensis* et d'*A. verticillata*, et comparées à l'activité des antioxydants bien connus que sont l'acide ascorbique (vitamine C), l'α-tocophérol (vitamine E), le BHT, Trolox, thymol et le carvacrol.

De plus, les valeurs d'I₅₀, qui font référence à la plus petite concentration d'antioxydants nécessaires pour 50% de réactivité, ont été calculées. L'efficacité des propriétés antioxydantes est inversement corrélée avec leurs valeurs IC₅₀ (µg/ml). Une valeur IC₅₀ inférieure indique une activité plus élevée.

4.1. Activité anti-radicalaire

Les capacités de piégeage des radicaux libres ont été mesurées à l'aide des radicaux DPPH, cation ABTS et superoxyde. Les résultats de ces tests, exprimés en IC₅₀ (µg / mL) sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Activité anti-radicalaire des huiles essentielles et des extraits éthanoliques exprimée en IC₅₀ (µg / ml)

Echantillon		ABTS	DPPH	O₂^{•-}
<i>T. algeriensis</i>	EE	7,44 ± 0,04 ^f	30,67 ± 0,17 ^b	22,96 ± 1,07 ^b
	HE	3,84 ± 0,08 ^d	547,68 ± 2,95 ^a	Nd
<i>T. polium</i>	EE	16,36 ± 0,54 ⁱ	47,45 ± 0,29 ^d	22,3 ± 0,24 ^b
	HE	12,05 ± 0,29 ^g	Nd	Nd
<i>A. verticillata</i>	EE	6,01 ± 0,02 ^e	31,69 ± 0,26 ^b	23,3 ± 1,26 ^b
	HE	1,82 ± 0,05 ^a	139,28 ± 0,48 ^e	Nd
BHT		12,99 ± 0,41 ^h	22,32 ± 1,19 ^a	–
Thymol		2,08 ± 0,02 ^b	40,45 ± 0,71 ^c	–
Carvacrol		2,36 ± 0,07 ^c	200,19 ± 3,09	–
Trolox		3,69 ± 0,06 ^d	–	–
Acide ascorbique		–	–	7,59 ± 1,16 ^a
α- tocophérol		–	–	31,52 ± 2,22 ^c

Les valeurs dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Tukey (p < 0,05)

Nd : non disponible dans la gamme des concentrations testées

4.1.1. Capacité de piégeage du radical DPPH

Le test au radical DPPH[•], qui évalue principalement la capacité de piégeage du radical protonique. est l'un des composés qui possède un radical libre de proton avec une absorption caractéristique, qui diminue de manière significative lors de l'exposition aux piègeurs de radicaux protons (Yamaguchi et al., 1998). En outre, il est bien admis que le piégeage des radicaux libres DPPH[•] par les antioxydants est dû à leur capacité de donner de l'hydrogène (Chen et Ho, 1995). Diverses concentrations des extraits volatils et non volatils ainsi que le thymol et carvacrol ont été étudiées pour leur activité de piégeage du radical DPPH[•]. Une relation concentration-réponse pour les activités de piégeage des huiles et extraits testées a été observée (P < 0,05) (Fig. 38).

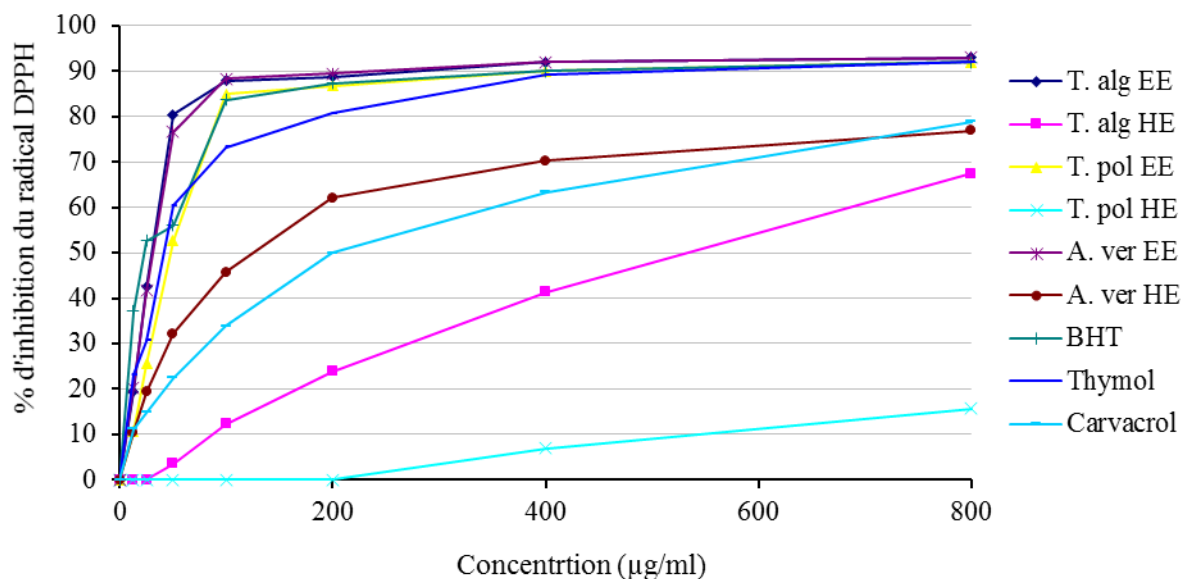


Figure 38. Pouvoir de piégeage du radical DPPH exprimé en pourcentage d'inhibition (%)

Remarquablement, seules les activités de piégeage du radical DPPH^{*} des extraits de *T. algeriensis* et *A. verticillata* étaient comparables à celle du BHT avec des valeurs d'IC₅₀ plus ou moins proches (30,67 et 31,69 vs 22,32 µg/ml respectivement). Tandis que celle de l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum* s'est montrée la moins efficace avec une IC₅₀ de 47,45 µg/ml en étant de fois plus importante que celle de BHT. Dans ce sens, une activité antioxydante similaire (IC₅₀ de 48,9 µg/ml) a été obtenue par [Ardestani et Yazdanparast \(2007\)](#) pour l'extrait d'acétate d'éthyl de *T. polium*.

De plus, les extraits des trois plantes étaient beaucoup plus efficaces au piégeage du radical DPPH^{*} que les HE ainsi que le thymol et carvacrol. L'HE d'*A. verticillata* a exercé la meilleure activité d'inhibition avec une valeur d'IC₅₀ de 139,28 µg/ml étant 4 fois plus importante que celle de *T. algeriensis* dont la valeur d'IC₅₀ s'élève à 547,68 µg / ml traduisant une activité modérée, tandis que l'HE *T. polium* a eu une activité faible qui ne dépasse pas les 20% d'inhibition radicalaire à la concentration maximale testée (800 µg / ml).

Le thymol et le carvacrol ont suivi la même tendance que les 2 huiles essentielles les constituants avec des IC₅₀ de 40,45 et 200,19 µg / ml respectivement. Ces valeurs d'IC₅₀ plus faibles par rapport à celles de leurs HE suggèrent que les autres composants jouent un rôle antagoniste. Il est à noter que pour des concentrations supérieures à 50 µg / ml, les extraits ont presque la même efficacité que le BHT (P<0,05).

Ces résultats sont en accord avec ceux de [Mahmoudi et Nosratpour \(2013\)](#) qui ont trouvé que l'huile essentielle de *Teucrium polium* n'a pu réduire le radical libre stable DPPH[•] qu'avec une IC₅₀ trop élevée dépassant les 9 mg /ml.

De même, [Tefiani et al. \(2015\)](#) ont montré que les HE des fleurs et des feuilles d'*Ammoides verticillata* inhibaient le radical DPPH[•] avec des IC₅₀ qui variaient entre 106-380 ± 11 et 73-338 ±18 µg/ml respectivement.

Cependant pour l'HE de *Thymus algeriensis*, nos résultats sont très meilleurs à ceux trouvés par [Zouari et al. \(2011\)](#) (IC₅₀ = 800µg/ml) et [El-Ouariachi et al. \(2014\)](#) (IC₅₀ = 1800 µg/ml) pour l'HE de *T. algeriensis* de la Tunisie et du Maroc caractérisées par une faible richesse en composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol généralement retrouvés dans les espèces du Thym.

La faible activité de l'HE essentielle de *T. polium* subsp *capitatum* par rapport aux autres HE est due à l'absence des composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol. L'activité de piégeage du radical DPPH[•] des huiles de thym algériens aurait été attribuée à la présence de composés phénoliques tels que le thymol ou le carvacrol ([Hazzit et al., 2009](#)). Le rôle clé des composés phénoliques en tant que piègeurs de radicaux libres est également décrit dans des articles précédents.

[Nikolić et al. \(2014\)](#) ont rapporté que l'huile essentielle de *Thymus serpyllum* présentait l'activité la plus élevée de piégeage des radicaux du DPPH[•] (IC₅₀ : 0,96 µg / ml), suivie des huiles de *Thymus algeriensis* (IC₅₀ : 1,64 µg / ml) et de *Thymus vulgaris* (IC₅₀ : 4,80 µg / ml). Ces auteurs ont expliqué cette différence par la teneur de ces huiles essentielles en monoterpènes phénoliques comme le thymol et le carvacrol.

Similairement, [Safaei-Ghomi et al. \(2009\)](#) ont suggéré le pourcentage élevé de carvacrol dans l'huile essentielle de *Thymus caramanicus* a conduit à son potentiel inhibiteur modéré du DPPH[•] par rapport à celui faible des autres espèces de *Thymus* riches en thymol.

En effet, [Jukic et Milos \(2005\)](#) ; [Milos et Makota \(2012\)](#) ont montré que le pouvoir antioxydant des constituants de l'huile essentielle de thym selon la méthode de piégeage radicalaire DPPH[•] et le test de pouvoir réducteur / pouvoir antioxydant FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que le thymol était plus efficace que le carvacrol et que ces deux monoterpènes phénoliques était plus actifs que les composés non phénoliques le thymoquinone et le p-cymène (ont des valeurs d'IC₅₀ approximativement égales). En outre, ces auteurs ont

étudié la capacité antioxydante de ces composés en mélanges et indiqué que la majorité des mélanges d'antioxydants présentaient un certain niveau de divergence dans la capacité antioxydante par rapport aux valeurs individuelles de leurs constituants. Les mélanges de trois antioxydants (thymol, carvacrol et p-cymène) ont montré une diminution de la capacité antioxydante par rapport à leurs valeurs en paires (thymol et carvacrol) ou individuelles. Les résultats obtenus pour des mélanges plus complexes de quatre antioxydants ont montré une diminution de la capacité antioxydante dans l'ordre suivant : Thymol ou carvacrol > Thymol + carvacrol > Thymol + p-cymène > Carvacrol + p-cymène > thymol + carvacrol + p-cymène > thymol + carvacrol + p-cymène + thymoquinone. De plus, toutes les autres combinaisons de deux antioxydants ont clairement montré un effet plus ou moins synergique à l'exception de pair (p-cymène + thymoquinone), ce qui indique que la présence du groupe hydroxyle dans le thymol et le carvacrol joue un rôle crucial pour ce phénomène.

Ces différences d'activité peuvent s'expliquer par l'absence ou la faible concentration de composés phénoliques. Dans ce sens, [Shahidi et al. \(1992\)](#) ; [Sánchez-Moreno et al. \(1999\)](#) ont démontré que l'effet antioxydant des plantes aromatiques est dû à la présence de groupes hydroxyles dans leurs composés phénoliques, et que le nombre et la structure des groupes hydroxyles sont associés à la plus haute activité antioxydante autrement dit si leur concentration ou degré d'hydroxylation augmente, leur activité de piégeage des radicaux DPPH[•] augmente également.

Si l'activité de piégeage du radical DPPH[•] des extraits de *T. algeriensis* et *A. verticillata* est attribuée à leur richesse en composés phénoliques et notamment les flavonoïdes. Les expériences de DPPH[•] en ligne réalisées par [Goulas et al. \(2012\)](#) ont montré que le poliumoside est le composant le plus actif des extraits de *T. polium* et que le potentiel antioxydant des extraits polaires est principalement attribué aux glycosides de phénylpropanoïde (66 à 80%).

L'activité anti-radicalaire du DPPH des huiles, extraits et BHT a diminué dans l'ordre de BHT>T. alg EE = A. ver EE > T. pol EE > Thymol > Carvacrol > A. ver HE > T. alg HE > T. pol HE.

4.1.2. Capacité de piégeage du radical ABTS^{•+}

L'ABTS^{•+} est généralement utilisé pour tester l'activité préliminaire d'élimination des radicaux par les composés antioxydants ou d'extraits de plantes. L'ABTS^{•+}, généré par l'oxydation de l'ABTS^{•+} par le persulfate de potassium, est présenté comme un excellent outil pour déterminer l'activité antioxydante des antioxydants donneurs d'hydrogène et des

antioxydants briseurs de chaîne (Leong et Shui, 2002). Ce schéma de détermination de l'action antioxydante est également pertinent pour les classes hydrophiles et lipophiles d'antioxydants tels que ; flavonoïdes, hydroxycinnamates, caroténoïdes et antioxydants dans le plasma (Gülçin et al., 2002).

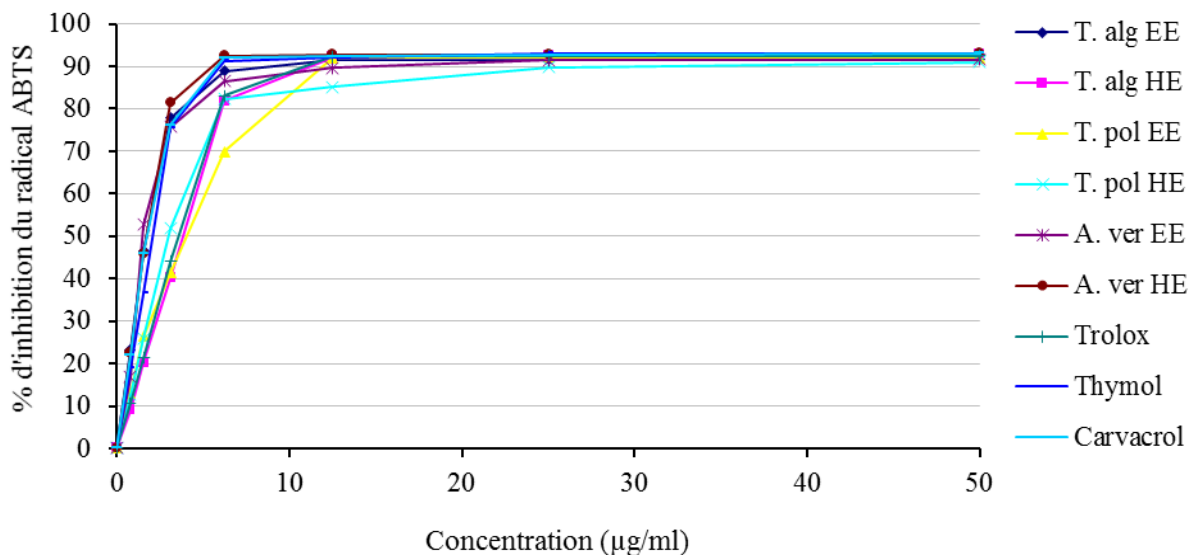


Figure 39. Pouvoir de piégeage du radical $ABTS^{*+}$ exprimé en pourcentage d'inhibition (%)

Remarquablement, tous les échantillons (HE et EE) des trois plantes ont montré des activités significatives similaires ou supérieures à celles des standards (Trolox et BHT) ($P < 0,05$) (Fig. 39). On peut également noter qu'à l'inversement au test DPPH, les HE étaient plus efficaces que leurs EE correspondantes.

Ces résultats sont corroborés par ceux d'Öztürk (2012) qui a étudié l'activité anti-radicalaire des extraits volatils et non volatils de *Satureja thymbra* L. et trouvé une activité plus faible pour l'HE que l'extrait méthanolique et le standard antioxydant dans le test DPPH*. Au contraire, dans le test $ABTS^{*+}$, l'HE a montré une plus grande activité de piégeage des radicaux que l'extrait méthanolique. Malgré le même mécanisme de transfert d'électrons unique rapporté pour ces deux méthodes, le même composé phénolique peut avoir des cinétiques d'oxydation différentes selon le test utilisé et par conséquent avec un comportement différent (Özgen et al., 2006). Dans certains composés volumineux, le test $ABTS^{*+}$ est supérieur au test DPPH en raison de l'encombrement stérique. En outre, les composés hydrophiles et lipofiliques peuvent être testés pour leur activité anti-radicalaire en utilisant le test $ABTS^{*+}$ (Öztürk, 2012).

La capacité de piégeage la plus élevée a été observée pour l'HE d'*A. verticillata* riche en thymol qui était plus active que les composés individuels thymol et carvacrol avec une valeur d'IC₅₀ de 1,82 contre 2,08 ; 2,35 µg/ml respectivement. De plus, cette activité est 2 fois plus importante que celle du Trolox et de l'HE de *T. algeriensis* qui ont montré une activité similaire (P>0,05) avec des IC₅₀ de 3,69 et 3,84 µg/ml respectivement. Quant à l'HE de *T. polium* subsp *capitatum*, elle a montré une activité inférieure à celles d'*A. verticillata*, *T. algeriensis* et Trolox mais similaire à celle du standard BHT 12,05 vs 12,99 µg/ml (P<0,05).

Concernant les extraits, ceux-ci étaient moins actifs que leurs huiles essentielles correspondantes, ceux les plus riches en flavonoïdes étaient les plus actifs dans l'ordre *A. verticillata* (6,01 µg/ml) suivi de *T. algeriensis* (7,44 µg/ml) tandis que l'extrait de *T. polium* était le moins actif parmi tous les échantillons testés avec IC₅₀ de 16,36 µg/ml.

La forte activité des huiles essentielles par rapport aux extraits pourrait être due à leur caractère lipophile et leur faculté à accéder au radical ABTS^{•+} comme expliqué précédemment. En outre, les différences dans les capacités de piégeage des radicaux libres entre les HE peuvent être expliquées par leurs principales composantes. Dans ce sens, le thymol et le carvacrol sont considérés comme des piègeurs efficaces des radicaux libres. Les études antérieures ont montré que les espèces riches en thymol-carvacrol comme l'Origan, le Thym ou d'autres HE présentaient de fortes activités de piégeage sur DPPH[•] et ABTS^{•+} (Hyun *et al.*, 2014; Sarikurkcu *et al.*, 2015).

En effet, Ben El Hadj Ali *et al.* (2015) ont rapporté des niveaux modérés d'activité antioxydante des huiles essentielles obtenues à partir de plusieurs populations de *Thymus algeriensis*, estimé par les tests DPPH[•] (IC₅₀ = 4,31 à 9,23 mg / ml) et ABTS^{•+} (11,69 à 28,23 µg d'équivalent Trolox / mg) à cause de leur très faible teneur en thymol qui ne dépassait pas 0,3% et de l'absence de carvacrol dans les huiles essentielles de feuilles étudiées.

De plus, Tefiani *et al.* (2015) ont observé une activité plus élevée chez l'HE d'*A. pusilla* (1,21 ± 0,01 µg/ml) riche en alcool de cumin et relativement en thymol (11%) par rapport à *Thymus munbyanus* (1,73 ± 0,2 µg/ml) riche en carvacrol (71,4%).

De surcroît, Tefiani *et al.* (2016) ont étudié l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs et de feuilles de *Ammoides pusilla* de populations de différents sites et trouvé une forte corrélation négative (p <0,01) entre les valeurs de IC₅₀ de l'ABTS^{•+}, du DPPH[•] et de l'activité de piégeage de l'hydroxyle et les pourcentages de p-cymène et d'alcool cumin

présents, montrant ainsi l'importance du p-cymène sur la capacité de ce terpène aromatique sur l'activité de piégeage des radicaux libres.

L'activité anti-radicalaire de l'ABTS^{•+} des huiles, extraits et BHT a diminué dans l'ordre de A. ver HE > Thymol > Carvacrol > T. alg HE = Trolox > A. ver EE > T. alg EE > T. pol HE > BHT > T. pol EE.

4.1.3. Pouvoir de piégeage du radical superoxyde (O₂^{•-})

Bien que l'anion superoxyde (O₂^{•-}) soit un oxydant faible, il en résulte une génération de radicaux hydroxyles puissants et dangereux ainsi que l'oxygène singulet (¹O₂), les deux initient la peroxydation des lipides. Par conséquent, il est important d'étudier l'activité de piégeage de ce radical (Dahl et Richardson, 1978 ; Meyer et Isaksen, 1995). Dans ce test, l'anion superoxyde (O₂^{•-}) réduit le nitro-bleu tétrazolium (NBT) en formazan qui est suivi par spectrophotométrie. Les résultats exprimés en termes d'inhibition de la réduction du NBT sont montrés sur la figure 40.

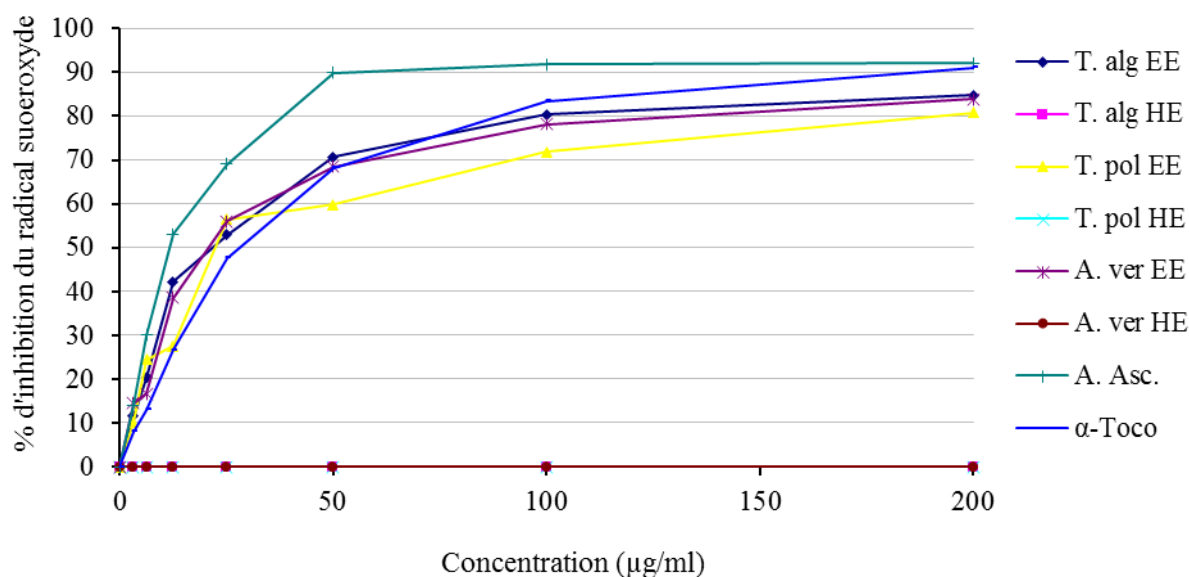


Figure 40. Activité du piégeage du radical superoxyde (O₂^{•-}) exprimée en % de réduction en formazan.

Il est remarquable que toutes les HE n'aient pas exercé activité inhibitrice contre ce radical. En revanche, les extraits l'ont piégé et ont ainsi inhibé la formation de formazan de manière concentration-dépendante ($P < 0,05$). En outre, aucune différence significative d'activité n'a été observée chez les extraits des trois plantes d'où les valeurs d'IC₅₀ très proches ($P > 0,05$).

Toutefois, les extraits de *T. algeriensis* et *A. verticillata* étaient plus actifs pour des concentrations élevées ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) par rapport à celui de *T. polium* subsp *capitatum* (Fig. 40). Cette tendance est en bonne corrélation avec la teneur en flavonoïdes des trois plantes.

Comparativement aux antioxydants naturels, les extraits se sont avérés moins actifs que l'acide ascorbique avec des IC_{50} très supérieures ($P < 0,05$), connue comme un très fort agent antioxydant et qui a donné les pourcentages d'inhibition les plus élevés atteignant les 90% seulement à une concentration de $50 \mu\text{g/ml}$ dépassant ceux de tous les extraits même à une concentration de $200 \mu\text{g/ml}$. Contrairement, ces extraits se sont montrés plus efficaces que l' α -tocophérol avec des IC_{50} très inférieures ($P < 0,05$).

Les teneurs en composés phénoliques seuls ne peuvent pas être strictement liés à l'activité de piégeage des radicaux superoxydes sans tenir compte de la structure des composés de ces composés phénoliques.

En effet, [Albano et al. \(2012\)](#) ont signalé qu'aucune corrélation entre les phénols totaux et l'activité de piégeage des radicaux anions superoxydes n'a été détectée confirmant que l'activité de piégeage d'un extrait ne peut être prédite sur la base de son contenu phénolique total ([Parejo et al., 2002](#)).

En outre, [Chun et al. \(2003\)](#) ont rapporté que l'inhibition du radical superoxyde était étroitement liée aux structures de polyphénols. Il a été rapporté que les flavonols tels que la quercétine exercent une forte activité de piégeage du radical superoxyde ([Cos et al., 1998](#)), qui peuvent réagir de deux manières, en inhibant la xanthine oxydase et en piégeant les radicaux superoxydes ([Salaris et al., 1991](#)).

Il convient de noter que la relation entre la teneur en antioxydants particuliers et l'activité des antioxydants est difficile à expliquer sur la base d'une analyse quantitative uniquement, car une action synergique entre les composants phénoliques présents dans les extraits naturels peut contribuer aux différences de capacité antioxydante. d'extraits de plantes ([Dambolena et al., 2010](#)).

[Rice-Evans et al. \(1995\)](#) suggèrent que les caractéristiques des composés phénoliques peuvent affecter l'activité antioxydante. Ainsi, la substitution ortho avec des groupes alkyle ou méthoxy de phénols donneurs d'électrons augmente la stabilité du radical libre et donc son potentiel antioxydant. La position et le degré d'hydroxylation des composés phénoliques jouent un rôle primordial dans la détermination de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

Les positions ortho et para des groupes hydroxyle contribuent de manière marquée à l'activité antioxydante, tandis que la méta position n'a que peu ou pas d'effet sur l'antioxydant (Muchuweti et al., 2007).

La présence de groupes hydroxyles aux positions 3', 4' et 5' du cycle B des flavonoïdes augmente l'activité antioxydante par rapport aux composés à un groupe hydroxyle. De même, la présence d'un groupe hydroxyle en position 3' et d'une double liaison 2,3 conjuguée avec le groupe 4-oxo semble avoir une importance dans les propriétés antioxydantes (Rice-Evans et al., 1995; Heim et al., 2002).

En conclusion, les résultats obtenus dans la présente étude démontrent clairement que les extraits et les huiles essentielles contiennent un certain nombre de composés antioxydants, qui peuvent efficacement piéger diverses espèces d'oxygène réactives / radicaux libres dans des conditions *in vitro*.

4.2. Activité réductrice

Différentes études ont indiqué que la capacité de don d'électrons, reflétant le pouvoir réducteur, des composés bioactifs est associée à une activité antioxydante (Arabshahi-Delouee et Urooj, 2007 ; Sarikurkcu et al., 2015). Les antioxydants peuvent être expliqués comme des réducteurs, et l'inactivation des oxydants par les réducteurs peut être décrite comme des réactions redox dans lesquelles une espèce de réaction est réduite au détriment de l'oxydation de l'autre (Chung et al., 2002).

Un certain nombre d'essais sont conçus pour mesurer l'activité antioxydante globale ou le potentiel de réduction, ce qui indique la capacité totale de l'hôte à résister au stress des radicaux libres (Wood et al., 2006). Pour ces raisons, le pouvoir réducteur des ions ferriques et cuivriques a été examiné. Les résultats des valeurs d'IC₅₀ de pouvoir réducteur du fer et Cuprac ainsi que le pouvoir d'inhibition de blanchiment du β -carotène sont rapportés dans le tableau 17.

Tableau 17. Pouvoir réducteur ferrique et cuivrique et pouvoir d'inhibition de blanchiment du β -carotène exprimés en IC₅₀ (μ g/ml)

Echantillons		Pouvoir réducteur	CUPRAC	β -carotène
<i>T. algeriensis</i>	EE	58,82 \pm 1,72 ^c	19,40 \pm 0,78 ^e	43,34 \pm 0,84 ^e
	HE	174,27 \pm 2,13 ^e	9,82 \pm 0,25 ^b	33,47 \pm 0,51 ^d
<i>T. polium</i>	EE	76,35 \pm 2,01 ^d	13,59 \pm 0,87 ^c	44,04 \pm 0,67 ^e
	HE	282,03 \pm 3,5 ^f	88,28 \pm 0,92 ^f	78,15 \pm 2,08 ^f
<i>A. verticillata</i>	EE	40,97 \pm 1,92 ^b	15,68 \pm 0,55 ^d	11,62 \pm 0,25 ^b
	HE	62,3 \pm 0,83 ^c	5,11 \pm 0,12 ^a	15,83 \pm 0,16 ^c
BHT		61,67 \pm 0,4 ^c	9,62 \pm 0,87 ^b	1,03 \pm 0,01 ^a
Trolox		–	–	1,00 \pm 0,02 ^a
Acide ascorbique		9,01 \pm 1,46 ^a	–	–

Les valeurs dans la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes par le test à plages multiples de Tukey ($p < 0,05$)

Nd : non disponible dans la gamme des concentrations testées

4.2.1. Pouvoir réducteur du fer

La réduction de Fe (III) est souvent utilisée comme indicateur de l'activité donneuse d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique (Yildirim et al., 2001).

Le potentiel réducteur des EE et des HE repose sur la réduction des ions ferriques en forme ferreuse en présence de réducteurs (antioxydants). Les résultats exprimés en absorbance, sont indiqués sur la figure 41.

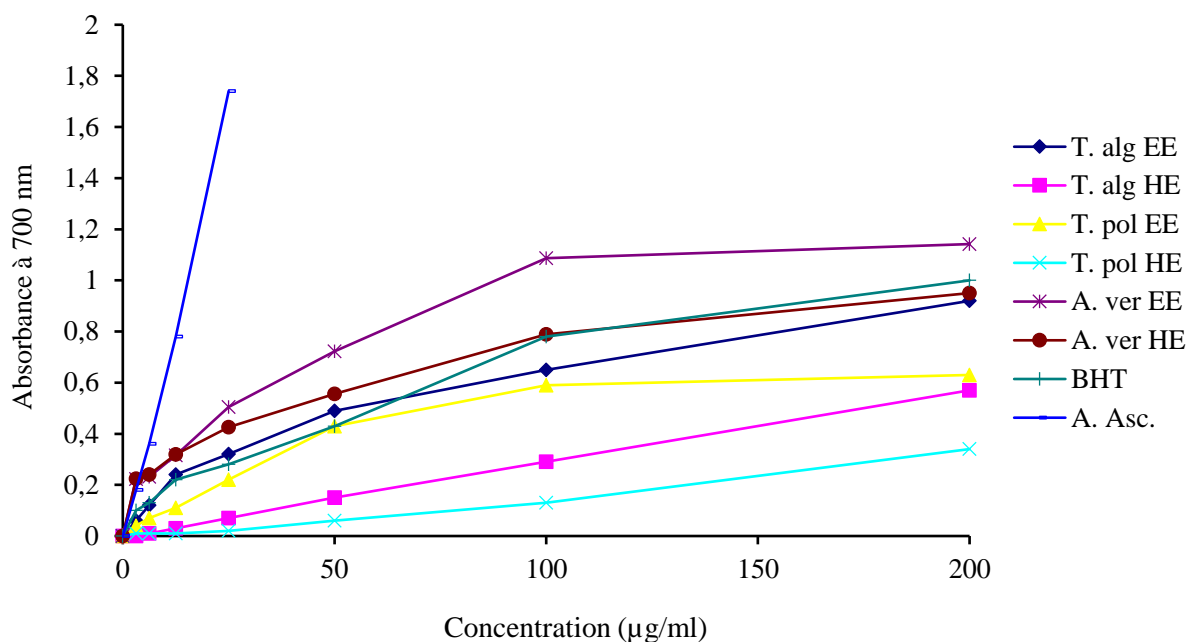


Figure 41. Pouvoir réducteur du fer exprimé en absorbance à 700nm

Comme on peut le voir, tous les échantillons testés présentaient des niveaux de capacité de don d'électrons nettement inférieurs ($P < 0,05$) à ceux de l'acide ascorbique bien connu comme un très fort réducteur (Zou *et al.*, 2004). Cependant, comparativement au BHT, les extraits volatils et nos volatiles ont eu différentes tendances (Fig. 41).

En effet, l'extrait d'*A. verticillata* était le plus actif avec une IC_{50} de 40,97 $\mu\text{g/ml}$, suivi de l'extrait de *T. algeriensis* (58,82 $\mu\text{g/ml}$). L'activité de ces deux extraits était significativement plus importante que celle du BHT ($P < 0,05$). Par contre, aucune différence significative dans les activités de réduction n'a été détectée entre l'huile essentielle d'*A. verticillata* et le BHT (62,3 vs 61,67 $\mu\text{g/ml}$) ($P > 0,05$) montrant ainsi une activité similaire. Cependant, une activité réductrice inférieure ($p < 0,05$) de l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum* a été détectée avec une IC_{50} de 76,35 $\mu\text{g/ml}$ et qui correspondait au contenu phénolique total le plus faible.

Les HEs de *T. algeriensis* et surtout de *T. capitatum* se sont révélées les moins actives avec des IC_{50} élevées de 174,27 et 282,03 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Un tel résultat était attendu, car une seule réaction basée sur le transfert d'électrons est le mécanisme impliqué dans cet essai, comme pour les méthodes de piégeage des radicaux libres DPPH^{*} et ABTS^{**} dans lesquelles ces HEs étaient aussi des antioxydants moindres que celle d'*A. verticillata* (Tefiani *et al.*, 2015).

Compte tenu de la richesse de chaque extrait en composés phénoliques principalement les flavonoïdes, cette tendance était prévisible. Le potentiel réducteur peut être dû aux substitutions di- et monohydroxylées dans le cycle aromatique qui possèdent de puissantes capacités de transfert de l'hydrogène, comme décrit par [Shimada et al. \(1992\)](#). [Chen et Ahn \(1998\)](#) ont constaté que les composés phénoliques naturels, y compris la quercétine, la rutine, la catéchine et l'acide caféique agissent en tant que chélateurs de Fe^{2+} .

[Tepe et al. \(2011\)](#) ont rapporté des résultats inférieurs à ceux trouvés dans cette étude où l'extrait de *T. polium* a montré un modèle d'activité modérée par rapport à l'antioxydant synthétique BHT. Le pouvoir réducteur de *T. polium* a été déterminé à 0,12 à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ et 0,6 de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

L'activité réductrice du fer des huiles, extraits, BHT et acide ascorbique a diminué dans l'ordre : A. asc > A. ver EE > T. alg EE = A. ver HE = BHT > T. pol EE > T. alg HE > T. pol HE.

4.2.2. CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity)

La méthode CUPRAC est un test de la capacité antioxydante, simple et polyvalent, utile pour une grande variété de polyphénols, y compris les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les flavonoïdes, caroténoïdes, anthocyanes, ainsi que pour les thiols, antioxydants synthétiques, et les vitamines C et E ([Özyurek et al., 2011](#)). Le réactif CUPRAC est stable, facilement accessible, peu coûteux et sensible aux antioxydants de type thiol, contrairement au FRAP (Ferric reducing-antioxidant power). La réaction est effectuée à presque pH physiologique par opposition au pH acide du FRAP ou au pH alcalin des méthodes Folin, constituant un avantage de base pour le dosage réaliste des fluides biologiques ([Apak et al., 2008](#)).

Concernant la méthode CUPRAC, Il s'agit d'un essai redox dans lequel les groupes réactifs Ar-OH des antioxydants polyphénoliques sont généralement oxydés en quinones correspondantes (Ar = O), et Cu (II) -Nc est réduit à la teneur en chélate Cu (Nc) $^{2+}$ fortement colorés avec une absorption maximale de la lumière à 450 nm. Si un échantillon réduit Cu (II) en Cu (I), en même temps, il sera oxydé, de sorte que l'échantillon puisse agir comme antioxydant ([Apak et al., 2005](#) ; [Apak et al., 2007](#)). Les résultats exprimés en absorbance, sont indiqués sur la figure 42.

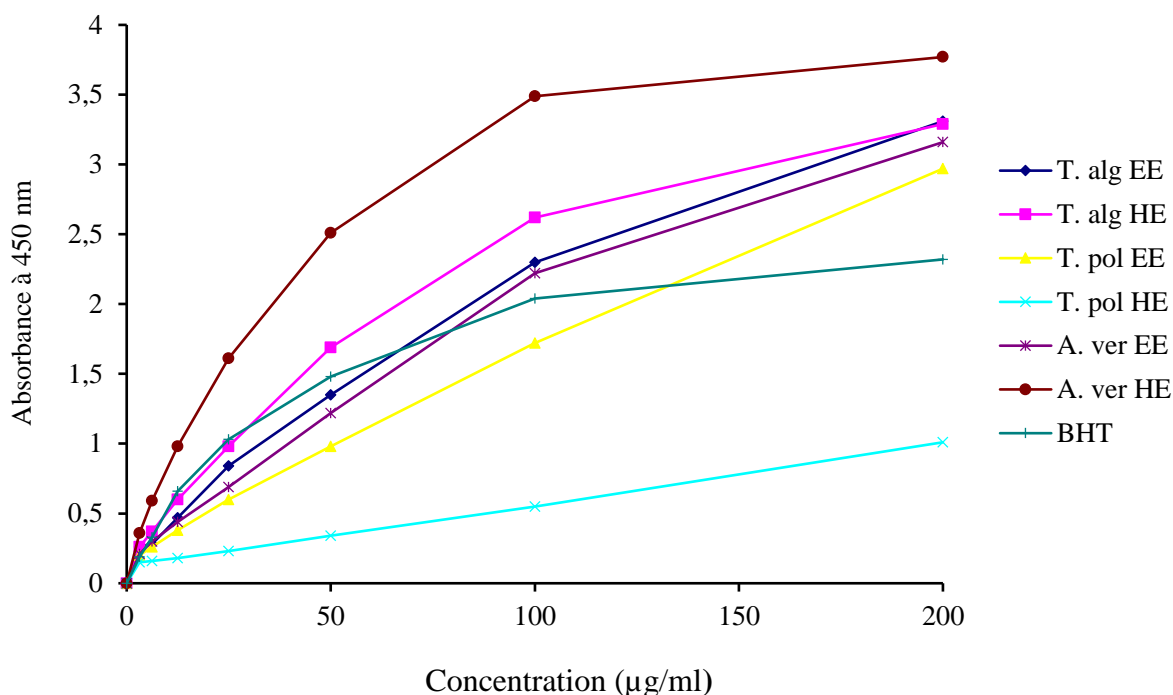


Figure 42. Pouvoir réducteur cuivrique (CUPRAC) exprimé en absorbance à 450 nm

Comme le montre la figure 42, Le pouvoir des extraits éthanoliques et des huiles essentielles à réduire le cuivre était bien corrélé avec des concentrations croissantes d'échantillons ($P < 0,05$) et tous les extraits testés présentaient un PR.

Les résultats obtenus pour CUPRAC résumés dans le tableau 1 indiquent des activités réductrices plus élevées des HEs par rapport à leurs extraits correspondants. L'HE essentielle d'*A. verticillata* a exhibé la meilleure activité avec une IC_{50} de 5,11 µg/ml parmi tous les antioxydants testés.

L'HE de *T. algeriensis* a également exhibé une excellente activité réductrice similaire à celle de l'antioxydant synthétique BHT avec des valeurs d' IC_{50} de 9,82 et 9,62 µg/ml, respectivement ($P > 0,05$). L'HE de *T. polium* subsp. *capitatum* était l'échantillon le moins actif (9 fois que le BHT, $IC_{50} = 88,28$ µg/ml) et cela serait dû à sa pauvreté en composés phénoliques.

Les extraits se sont révélés moins actifs que le BHT, mais contrairement au pouvoir réducteur du fer, l'extrait de *T. algeriensis* a montré une meilleure activité que celui de l'*A. verticillata* en enregistrant des IC_{50} de l'ordre de 13,59 et 15,68 µg/ml. L'extrait de *T. polium* subsp *capitatum* a exhibé une activité moins bonne avec une IC_{50} 19,59 µg/ml.

Il est à noter qu'au-delà de la concentration de 100 µg/ml, tous les échantillons ont montré une meilleure activité que le standard BHT, à l'exception de l'HE de *T. polium* subsp *capitatum*,

dont le taux d'augmentation l'activité a diminué fortement qui passe de 2,04 nm à 2,34 (à 200 µg/ml). Ceci serait dû à une extinction des groupes réactifs Ar-OH de l'antioxydant phénolique BHT qui seront oxydés en quinones correspondantes (Ar = O) et par conséquent il y aura pas de réduction de Cu d'où la diminution de l'absorbance.

Consistent avec les résultats la capacité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, le pouvoir réducteur des HEs d'*A. verticillata* et de *T. algeriensis* était significativement supérieur à celle de *T. polium* subsp *capitatum* ($p < 0,05$). D'après ces résultats, il semble que le thymol et le carvacrol soient d'excellents réducteurs dans ces tests (Sarikurku et al., 2015). De plus, les résultats pouvoir réducteur cuivrique ont suivi la même tendance que ceux du test ABTS suggérant que le caractère lipophile de certains composés joue un rôle important.

Dans des études récentes, des activités de pouvoir réducteur (cuivrique et ferrique) ont été signalées pour certaines espèces de *Thymus* (El Bouzidi et al., 2013 ; Ballester-Costa et al., 2017).

Les rapports de littérature suggèrent que les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence des réductones. Les réductones se sont avérées exercer une activité antioxydante en rompant la chaîne des radicaux libres (Pin-Der Duh, 1998).

L'activité réductrice du cuivre des huiles, extraits et BHT a diminué dans l'ordre de A. ver HE > T. alg HE = BHT > T. alg EE > A. ver EE > T. pol EE > T. pol HE.

4.3. Inhibition de la peroxydation lipidique

L'inhibition de la peroxydation lipidique par les HE et les EE de *T. polium* ssp *capitatum*, *T. algeriensis*, et *Ammoides verticillata* a été évaluée par le test de blanchiment non enzymatique au β-carotène (oxydation couplée du β-carotène et de l'acide linoléique). Le mécanisme impliqué dans cette méthode est un phénomène à médiation libre résultant des hydroperoxydes générés par l'oxydation de l'acide linoléique. En l'absence de l'antioxydant, le β-carotène est attaqué par les radicaux libres de l'acide linoléique et subit une rapide décoloration résultant de la perte de ses doubles liaisons. La perte de sa couleur orange peut être surveillée par spectrophotométrie (Jayaprakasha et al., 2003).

Les activités antioxydantes des huiles essentielles et des extraits de ces plantes dépendaient significativement de la concentration ($P < 0,05$) (Fig. 43).

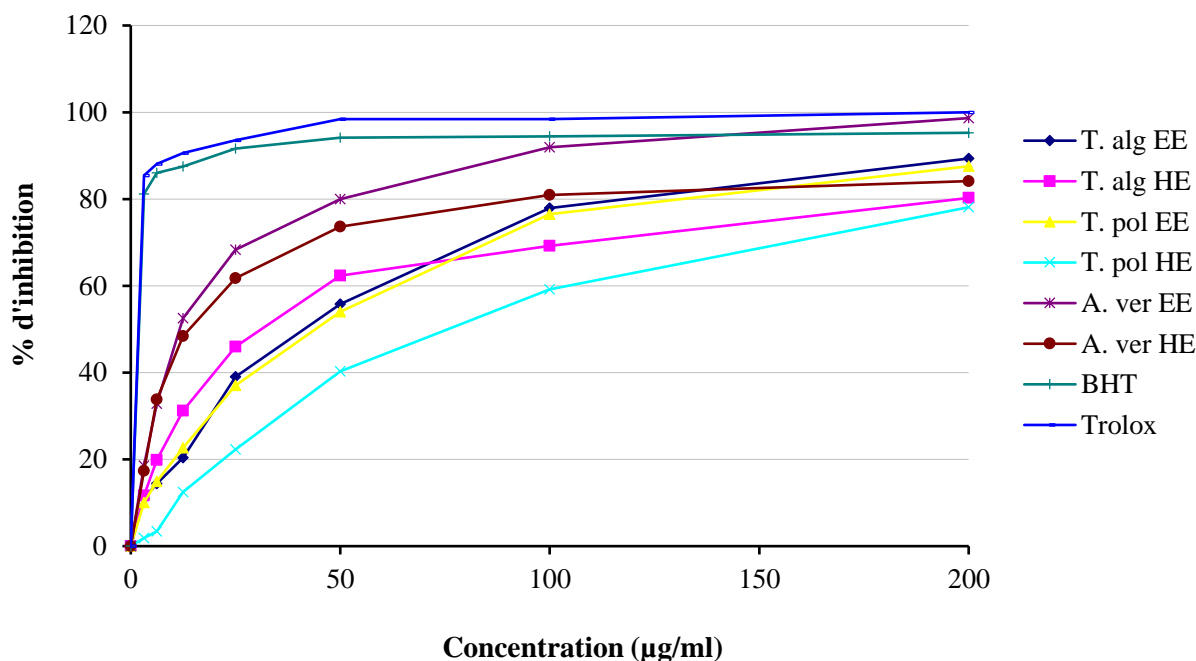


Figure 43. Activité d'inhibition de blanchissement de β -carotène en exprimée en pourcentages

Les extraits des différentes plantes ont montré une meilleure activité que leurs huiles essentielles correspondantes. Les meilleures activités ont été observées pour l'extrait et l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* avec des IC_{50} de 11,62 et 15,83 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Cette HE s'est montrée deux fois plus efficace que l'HE de *T. algeriensis* avec une IC_{50} de 33,47 $\mu\text{g/ml}$.

Les extraits de *T. polium* subsp *capitatum* et de *T. algeriensis* ont exhibé ont une efficacité similaire et par conséquent il n'y a pas de différence significative ($P < 0,05$) dans leur valeurs d' IC_{50} (44,04 et 43,34 $\mu\text{g/ml}$ respectivement). L'HE essentielle de *T. polium* subsp *capitatum* pauvre en composés phénoliques a montré l'activité la plus faible.

Cependant, tous les échantillons testés ont montré une activité nettement inférieure aux standards BHT et Trolox (1,03 et 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivement).

L'activité antioxydante des extraits et huiles essentielles en ce qui concerne la méthode de blanchissement de β -carotène peut être classée comme suit : BHT=Trolox > A. ver EE > A. ver HE > T. alg EE > T. alg HE = T. pol EE > T. pol HE.

L'efficacité différentielle des extraits et des huiles essentielles d'empêcher l'oxydation de l'émulsion d'acide linoléique est une indication de la complexité des extraits et des huiles

essentielles aussi bien que l'interaction potentielle entre l'extrait ou l'huile essentielle et les composants d'émulsion. Les recherches de [Yanishlieva et Marinova \(1996, 1998\)](#) ont montré que les isomères de position de certains antioxydants phénoliques, par exemple la quercétine et la morine peuvent exercer différents comportements antioxydants en fonction du substrat lipidique et de la température.

De même, de nombreux auteurs ont signalé que les HEs végétales riches en thymol comme l'Origan, le Thymus ou d'autres espèces exerçaient une forte activité inhibitrice sur l'oxydation de l'acide linoléique ([Amiri, 2012 ; Loizzo et al., 2009](#)). Ainsi, le thymol peut être responsable de la forte capacité inhibitrice de l'HE de l'*A. pusilla*.

Il a été déjà établi ([Aeschbach et al., 1994](#)) que le thymol et le carvacrol inhibent la peroxydation des phospholipides de liposomes d'une manière dépendant de la concentration. Il est apparu ([Lagouri et al., 1993](#)) que les deux isomères étaient également efficaces dans l'autoxydation du saindoux à 35 °C à une concentration de 0,1%. L'inhibition de l'oxydation par les huiles essentielles de plantes d'origan dépendait fortement de la teneur en carvacrol + thymol ([Lagouri et Boskou, 1995](#)).

En général, lors de l'autoxydation des lipides à la température ambiante, le thymol est un antioxydant plus efficace et plus actif que le carvacrol. Les deux antioxydants diffèrent par le mécanisme de leur action inhibitrice qui dépend du caractère du milieu lipidique. Le thymol est un meilleur antioxydant dans les lipides que le carvacrol. Ce fait est dû au plus grand encombrement stérique du groupe phénolique dans le thymol que dans le carvacrol ([Yanishlieva et al., 1999](#)).

L'autoxydation de triacylglycérols de saindoux et d'huile de tournesol (TGS et TGHT) contenant 0,02, 0,05, 0,10 et 0,20% de thymol et de carvacrol a été étudiée à la température ambiante. Le thymol est un meilleur antioxydant dans le TGHT que dans le TGS, alors que l'activité du carvacrol dans les deux systèmes lipidiques ne diminue pas de façon significative. Le thymol et le carvacrol ont participé à une réaction secondaire lors de l'oxydation des TGS inhibés, et le thymol à deux réactions secondaires lors de l'oxydation du TGHT. Les molécules de carvacrol n'ont pas participé aux réactions secondaires lors de l'oxydation du TGSO. Le thymol et le carvacrol ont contribué à l'initiation de la chaîne à un degré plus élevé pendant l'oxydation du TGSO que lors de l'oxydation du TGL. Les radicaux thymol n'ont pas participé à la propagation de la chaîne lors de l'oxydation du TGL et du TGSO. Les radicaux carvacrol

ont pris part à une réaction de propagation de chaîne dans les deux systèmes lipidiques (Yanishlieva et al., 1999).

D'après les résultats obtenus, il semblerait que la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes ne joue apparemment pas un rôle déterminant dans cette activité d'inhibition. Cependant, la corrélation de contenu phénolique et des flavonoïdes avec le potentiel d'inhibition de blanchissement de β -carotène a été bien rapporté par plusieurs chercheurs (Barros et al., 2007 ; Sahreen et al., 2010 ; Afsar et al., 2016).

Les résultats de tous les tests, exprimés en IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{ml}$) présentés au tableau 14 et 15 ont montré pour toutes les méthodes utilisées, sauf pour le test CUPRAC, une bonne corrélation entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des extraits des 3 plantes. En effet, les extraits d'*A. verticillata* et *T. algeriensis*, plus riches en ces composés, étaient généralement significativement plus actifs que l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum*.

En revanche, ce dernier extrait était plus actif que son HE avec toutes les méthodes testées sauf pour le test ABTS. Ce résultat peut être dû aux phénols présents dans l'extrait, qui sont absents dans l'HE. En effet, l'HE de *T. polium* subsp *capitatum* est essentiellement constituée d'hydrocarbures mono- et sesquiterpènes. Par contre, les HE de *T. algeriensis* et d'*A. verticillata*, qui sont riches en composés phénoliques carvacrol et thymol, étaient plus efficaces que leurs EE correspondants avec les méthodes CUPRAC, ABTS et β -carotène.

5. Etude de l'activité anti-hémolytique des extraits

Les érythrocytes sont intrinsèquement plus sujets à la peroxydation en raison de la forte accumulation d'acides gras polyinsaturés et d'hémoglobine. Au cours de la respiration, les érythrocytes sont exposés en permanence à une tension d'oxygène élevée, pouvant induire des lésions oxydatives (Babu *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2002). De plus, l'exposition des érythrocytes à des substances toxiques entraîne la formation de radicaux libres, pouvant entraîner des dommages aux membranes qui endurent rapidement une lésion et perdent leur intégrité, ce qui entraîne la libération d'hémoglobine ou une hémolyse (Banerjee *et al.*, 2008 ; Chakraborty *et Verma*, 2010).

L'utilisation d'érythrocytes en tant que systèmes modèles a été largement appliquée pour étudier les dommages oxydatifs dans les membranes biologiques (Mabile *et al.*, 2001 ; Djeridane *et al.*, 2007). L'inhibition de l'hémolyse pouvant être surveillée par spectrophotométrie à 540 nm (Ng *et al.*, 2000).

Dans cette étude, nous avons utilisé un test biologique basé sur la lyse des érythrocytes ou hémolyse induite par le radical AAPH (2,2-azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochlorure) dans le sang humain. Ce test est utile pour le dépistage des études sur divers molécules et leurs métabolites, en particulier d'une part les molécules ont une activité oxydante ou antioxydante et d'autre part la molécule ayant une action à long terme (Djeridane *et al.*, 2007).

Les résultats de l'inhibition de d'hémolyse par les extraits exprimés en termes de pourcentages d'inhibition et d'IC₅₀ (µg/ml) sont exposés sur les figures 44 et le tableau 18, respectivement.

Tableau 18. Effet inhibiteur des extraits éthanoliques vis-à-vis de l'hémolyse exprimé en IC₅₀ (µg / ml)

Espèce	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Teucrium polium</i> subsp <i>capitatum</i>	315,95 ± 6,09 ^c
<i>Thymus algeriensis</i>	171,32 ± 5,96 ^b
<i>Ammoides verticillata</i>	125,03 ± 4,55 ^a
Quercétine	183,72 ± 4,84 ^b
Acide ascorbique	379,23 ± 3,11 ^d

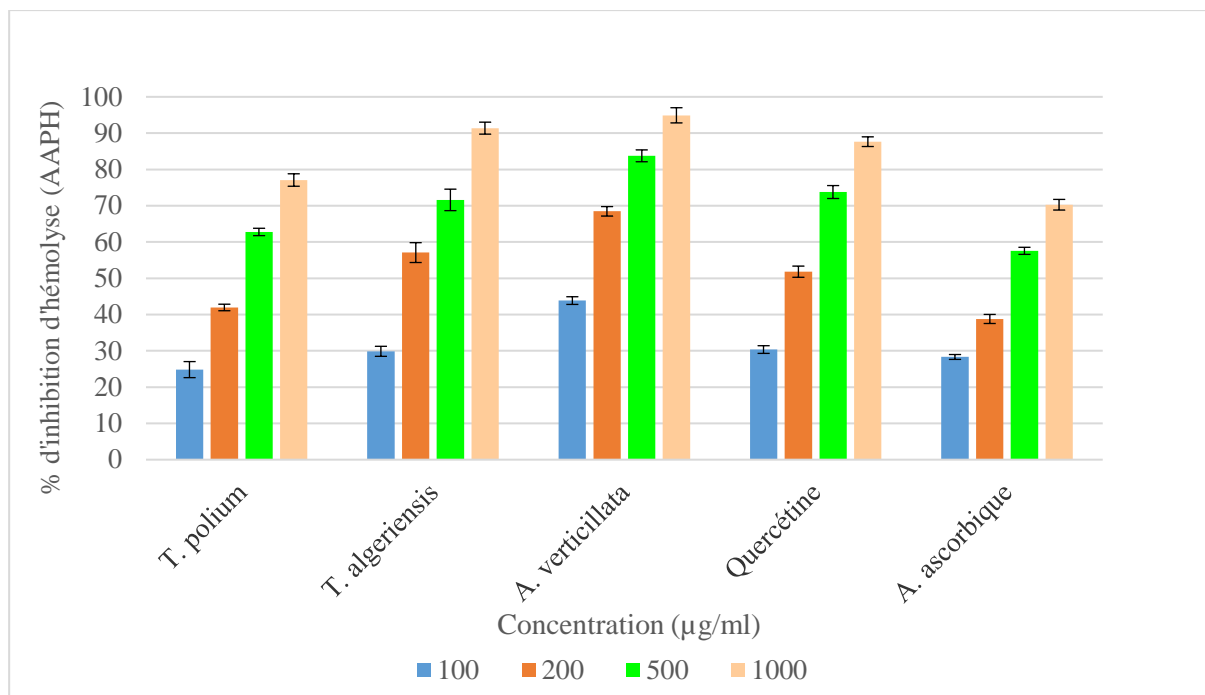


Figure 44. Activité antihémolytique exprimée en % d'inhibition d'hémolyse induite par AAPH

L'activité hémolytique des 3 extraits en l'absence de l'AAPH était inférieure à 5% à 1000 µg/mL (données non présentées) pour l'*A. verticillata* et *T. algeriensis* et 8 % pour le *T. polium* subsp *capitatum*, ce qui suggère qu'ils ne sont pas toxiques.

Tous les extraits de plantes ont montré un effet bénéfique contre les dommages des radicaux libres par rapport aux références antioxydantes. Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse induit par AAPH calculés à partir des valeurs de l'absorbance enregistré au cours de l'expérimentation augmentent de façon proportionnelle en fonction des concentrations des extraits ($P < 0,05$).

Il ressort clairement que les deux extraits d'*Ammoides verticillata* et de *Thymus algeriensis* étaient les meilleurs inhibiteurs de l'hémolyse, leurs effets exprimés en pourcentages étaient bien plus importants que celui de la quercétine et de l'acide ascorbique. Ces extraits ont induit une inhibition de l'hémolyse dépassant les 90% à 1000 µg/ml. Cependant, en termes de concentrations inhibitrices de 50% de l'hémolyse (IC_{50}), l'efficacité de *T. algeriensis* était inférieure à celle d'*A. verticillata* dont les IC_{50} respectives égales à 171,32 et 125,03 µg/ml. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée avec la quercétine dont l' IC_{50} est égale à 183,72 µg/ml, témoignant une efficacité similaire.

Quant à l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum*, il a montré une bonne activité qui est supérieure à celle de l'acide ascorbique avec une IC₅₀ de 315,95 contre 379,23 µg/ml respectivement. Cependant cette activité est largement inférieure à celles des 2 autres extraits avec les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse les plus faibles. Cet extrait n'a pas pu inhiber totalement l'hémolyse aux concentrations testées en ne dépassant pas le seuil de 77,07 % à 1000 µg/ml contrairement aux extraits de *T. algeriensis* et d'*A. verticillata* qui ont dépassé les 70 et 80 % à 500 µg/ml respectivement.

Il a été bien documenté que des flavonoïdes provenant de différentes sources, notamment l'extrait de pépin de raisin (Zou et al., 2001), le thé Oolong (Zhu et al., 2002), le thé vert (Zhang et al., 1997), le thym *Thymus saturioides* (Ramchoun et al., 2015), extraits de dates (Bouhlali et al., 2016), peuvent offrir une protection *in vitro* contre les dommages érythrocytaires induits par l'AAPH.

Zou et al. (2001) ont constaté que le début de l'hémolyse induite par l'AAPH était considérablement retardé en présence de l'antioxydant mixte (a-tocophérol, acide ascorbique, b-carotène et extraits d'herbes (contenant des catéchines de pépins de raisin et de la silybine dérivée du chardon-Marie)). L'effet inhibiteur de l'antioxydant s'est révélé être dépendant de la dose. La concentration en antioxydant 10⁻⁴ (p / v) étaient plus efficaces que 5 x 10⁻⁵ (p / v) et 10⁻⁵ (p / v).

Magalhães et al. (2009) ont étudié l'effet protecteur des extraits de pulpe et de pelure de fruit de cognassier (*Cydonia oblonga* Miller) contre l'hémolyse oxydante des érythrocytes humains et trouvé des valeurs d'IC₅₀ calculée pour l'extrait de pulpe après 3 h d'incubation de 652 et 695 µg / ml respectivement.

Banerjee et al. (2008) ont montré que le traitement des globules rouges par la curcumine provoquait une diminution de l'hémolyse dépendante de la concentration avec une valeur d'IC₅₀ pour de 43 ± 5 mM.

Nabavi et al. (2013) ont trouvé que les substances bioactives liposolubles de l'avocat pouvaient inhiber l'hémolyse avec une IC₅₀ = 313.0 ± 11.5 µg/ml en altérant la membrane cellulaire de érythrocytes, plutôt que par balayage direct de radicaux peroxyde.

Dans une étude sur extraits de plusieurs plantes d'Algérie, Djeridane et al. (2007) ont également observée une efficacité très significative dans l'inhibition de l'hémolyse érythrocytaire induite radicalement pour *Oudneyna africanan*, *Artemisia arboresens* et

Globularia alpyum dont les activités étaient presque similaires à celles de l'acide caféique ainsi que le *Teucrium polium* qui était 2 fois plus efficace que l'acide ascorbique (Djeridane et al., 2007).

En plus des travaux précédemment cités réalisés sur des extraits bruts, plusieurs auteurs ont étudiés des composés ou fractions isolés. Ainsi, Zhu et al. (2002) ont examiné l'influence de l'extrait de cacao sur l'hémolyse érythrocytaire *in vitro*. L'extrait de cacao procurait un puissant effet inhibiteur contre l'hémolyse des érythrocytes. Sur une base pondérale, les effets inhibiteurs de l'extrait de cacao étaient presque deux fois plus importants que ceux de l'acide ascorbique (60% vs 37% à 8000µg/ml). De plus, les fractions flavanols et oligomères procyanidiques (monomères à décimères) testés ont présenté une protection dose-dépendante contre l'hémolyse érythrocytaire induite par le 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) (AAPH) entre 2,5 et 40 µM. Les fractions dimère, trimère et tétramère ont démontré l'activité protectrice la plus forte contre l'hémolyse érythrocytaire. Le dimère, le trimère et le tétramère ont montré les effets inhibiteurs les plus forts à 10 µM, 59,4%, 66,2%, 70,9%; 20 µM, 84,1%, 87,6%, 81,0%; et 40 µM, 90,2%, 88,9%, 78,6%, respectivement. Les fractions monomères ((-) - épicatechine et de (+) – catéchine) et pentamère en décimère avaient des effets protecteurs similaires. Toutes les fractions ont eu un effet protecteur supérieur à celui de l'acide ascorbique.

Dans une autre étude, Zhu et al. (2005) ont trouvé que les flavanols de cacao (épicatechine, catéchine), le dimère B2 et le 30-O-méthylépicatechine ont fourni des effets protecteurs (p, 0,001) contre l'hémolyse induite par les radicaux libres par l'AAPH de manière dépendante (2,5 mM à 20 mM). Le niveau de protection était supérieur à celui de l'acide ascorbique.

Une étude de Dai et al. (2006) a révélé que les flavonols et leurs glycosides sont des antioxydants efficaces pouvant protéger les globules rouges humains de l'hémolyse oxydante induite par les radicaux libres comme l'AAPH. Les flavonols comme la myricétine, la quercétine, la rutine et leurs glycosides (la quercétine galactopyranoside et le quercétine rhamnopyranoside) portant une fonctionnalité ortho-dihydroxyle ont montré une activité anti-hémolytique beaucoup plus efficace que celle des autres flavonols comme la morine, le kaempférol et le kaempférol glucopyranoside, ne portant pas une telle fonctionnalité.

Les membranes biologiques peuvent être affectées par de nombreux produits naturels présents dans les plantes médicinales. Dans le présent test anti-hémolyse, le traitement avec les extraits induit une résistance accrue des érythrocytes à l'hémolyse provoquée par les radicaux libres. Cette activité protectrice peut être expliquée par l'effet de piégeage des extraits sur ces radicaux lié au contenu en polyphénols et flavonoïdes.

Nos résultats montrent que ces plantes ont un effet protecteur et stabilisant de la membrane cellulaire. [Youdim et al. \(2000\)](#) ont signalé que les polyphénols améliorent la résistance des globules rouges stress oxydatif *in vitro* et *in vivo*.

Diverses études ont récemment étudié le potentiel des phénols contre les dommages oxydatifs dans les globules rouges, suggérant une interaction possible entre les flavonoïdes et les lipides membranaires des globules rouges et des protéines généralement ciblées par la peroxydation lipidique entraînant un effet bénéfique sur la stabilité de la membrane érythrocytaire ([Ferrali et al., 1997](#) ; [Chaudhuri et al., 2007](#) ; [Magalhães et al., 2009](#) ; [Bouhlali et al., 2016](#)).

Plusieurs auteurs ont démontré que les flavonoïdes pourraient être incorporés dans les membranes érythrocytaires et améliorer leur stabilité ([Sesso et al., 2003](#) ; [de Freitas et al., 2008](#)). De plus, [de Freitas et al. \(2008\)](#) rapportent que l'exacerbation des contacts de van der Waals à l'intérieur de la bicouche lipidique par les flavonoïdes pourrait être une source de stabilisation membranaire.

Des rapports scientifiques antérieurs ont montré une forte relation entre les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse et le pouvoir réducteur et le pouvoir de piégeage du DPPH a été mise en évidence, suggérant que le mécanisme d'action des extraits dans leur activité antioxydante pourrait être identique étant lié à la teneur en phénols totaux et flavonoïdes ([Magalhães et al., 2009](#) ; [Ramchoun et al., 2015](#) ; [Bouhlali et al., 2016](#)).

En outre, d'autres rapports ont indiqué qu'une bonne activité antihémolytique peut résulter de concentrations élevées de composés polyphénoliques liposolubles ([Chaudhuri et al., 2007](#)) et de certains flavonoïdes, telle que la quercétine ([Nabavi et al., 2010](#)).

6. Etude de l'activité antimicrobienne

L'action antimicrobienne des huiles essentielles dans les systèmes d'aliments modèles ou dans les aliments réels est bien documentée dans la littérature. Bien que la majorité des huiles essentielles sont classées comme étant généralement reconnues sûres (GRAS : Generally Recognized As Safe) (Kabara, 1991), leur utilisation dans les aliments en tant que conservateur est souvent limitée en raison de considérations néfastes, étant donné que les doses antimicrobiennes peuvent dépasser les limites organoleptiques acceptables. Par conséquent, il existe une demande croissante de connaître les concentrations minimales inhibitrices (efficaces) (CMI) des huiles essentielles afin de permettre un équilibre entre l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antimicrobienne. Ceci peut être réalisé avec des études *in vitro* et *in vivo* (Lambert *et al.*, 2001).

Les huiles essentielles ainsi que les extraits éthanoliques ont été testés pour leur activité antibactérienne *in vitro* contre 5 souches de bactéries de références fréquemment impliquées dans les intoxications alimentaires, en évaluant les zones d'inhibition (mm) et en déterminant les valeurs de CMI (mg/ml). Les résultats sont rapportés dans le tableau 19.

Tableau 19. Diamètres des zones d'inhibition ZI (en mm) et Concentrations minimales inhibitrices CMI (en mg/ml) des huiles essentielles

HE	<i>T. algeriensis</i>		<i>T. polium</i>		<i>A. verticillata</i>	
	ZI	CMI	ZI	CMI		
<i>E. coli</i> 25922	28	5	NA	-	19	10
<i>P. aeruginosa</i> 9627	19	5	NA	-	22	5
<i>K. oxytoca</i> 13182	20	10	NA	-	23	5
<i>B. cereus</i> 10876	26	2,5	21	>20	31	1,25
<i>S. aureus</i> 6538	62	1,25	26	20	62	1,25

6.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont montré une activité inhibitrice à divers degrés vis-à-vis de toutes les souches testées ($p < 0,05$). L'activité antibactérienne variait d'une absence d'inhibition à une inhibition très importante contre les microorganismes testés. Les zones d'inhibition et les valeurs de CMI des souches microbiennes étaient comprises entre 19 et 62 mm et entre 1,25 et

20 mg/ml respectivement. Les bactéries à Gram positif se sont révélées plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif.

Les huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A. verticillata* ont montré une forte activité contre toutes les souches en particulier les Gram positif tandis que l'HE de *T. polium* subsp *capitatum* s'est avérée active contre les Gram positif mais inactive contre les Gram négatif. En fait, les différentes souches n'ont eu pas la même sensibilité vis-à-vis les huiles essentielles.

L'activité la plus élevée a été observée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 avec les zones d'inhibition les plus fortes de 62 mm pour les huiles de *T. algeriensis* et *A. verticillata*, témoignant une sensibilité très importante de cette bactérie gram positif. Cependant, cette sensibilité, pour autant importante, diminue fortement vis-à-vis l'huile essentielle de *T. polium* subsp *capitatum* avec un diamètre de 26 mm.

Les HE ont également exercé une activité antibactérienne importante vis-à-vis l'autre bactérie Gram positif *Bacillus cereus* ATCC 10876 mais moins prononcée que celle contre *Staphylococcus aureus* où l'*A. verticillata* a exhibé la plus forte activité avec un diamètre de 31 mm contre 26 mm pour le *T. algeriensis* et 21 mm pour le *T. polium* subsp *capitatum*.

Pour les bactéries Gram négatif, elles se sont révélées moins sensibles que les Gram positif. L'HE de *Thymus algeriensis* a montré un effet antibactérien élevé contre *E. coli* avec un diamètre de 28 mm et un effet modéré contre *Pseudomonas auroginosa* et *Klebsielle oxytaca* avec des diamètres de 19 et 20 mm respectivement. Par contre, l'HE d'*A. verticillata* a manifesté une activité modérée contre *E. coli* avec un diamètre de 19 mm mais une activité plus ou moins importante contre *P. auroginosa* et *K. oxytaca* avec des diamètres de 22 et 23 mm respectivement.

L'activité antimicrobienne estimée par la CMI indique une forte variation des CMI des huiles vis-à-vis les souches bactériennes (Tableau 16). La valeur de CMI la plus élevée a été observée contre *P. aeruginosa* (Gram négatif) (20 mg/ml), tandis que la plus faible a été notée contre *S. aureus* et *B. cereus* (Gram positif) (1,25 mg/ml). L'HE de *T. polium* subsp *capitatum* a montré les concentrations inhibitrices les plus élevées (≥ 20 mg/ml).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui ont noté que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif en particulier à celle de *T. algeriensis*.

En fait, [Ait-Ouazzou et al. \(2011\)](#) ont trouvé que la bactérie *S. aureus* (Gram positif) présentait une sensibilité très élevée contre l'HE de *T. algeriensis* (ZI=51 mm ; CMI<0,5 µl/ml) par rapport à *E. coli* (17,8 mm ; 1 µl/ml) et *P. aeruginosa* (15 mm ; 10µl/ml).

De même, [Zouari et al. \(2011\)](#) ont montré que la bactérie la plus susceptible pour l'huile essentielle de *T. algeriensis* était *Bacillus cereus* (30 mm ; 1µl/ml) avec *Enterococcus faecalis* (18,5mm ; 3µl/ml) (Gram positif) par rapport aux grams négatifs comme *Pseudomonas aeruginosa* (14.5 mm ; 6µl/ml) et *E. coli* (14 mm ; 6µl/ml).

De plus, [Ben El Hadj et al. \(2015\)](#) ont signalé que *B. cereus* ATCC 11778 (18,2 à 25,5 mm) et *S. aureus* ATCC 25923 (14.8 -19,4 mm) étaient les bactéries les plus sensibles à la fois à la gentamycine et aux huiles essentielles de *T. algeriensis* de différentes provenances avec les CMI les plus faibles (1-2,5 µl/ml) contrairement à *P. aeruginosa* dont la valeurs de CMI était la plus élevée (2,5-5 µl/ml).

Tandis que, [Chemat et al. \(2013\)](#) ont observé une sensibilité élevée des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (75 mm), *E. coli* (46 mm) et *Staphylococcus aureus* (60 mm).

Contrairement, dans une étude précédente, [Dob et al. \(2006\)](#) ont trouvé que la bactérie *S. aureus* (Gram positif) avec *P. aeruginosa* et *E. coli* (Gram négatif) étaient les plus résistantes à cette huile. De même, [Jayari et al. \(2017\)](#) ont trouvé que *S. aureus* (12 mm) et *P. aeruginosa* (13mm) étaient les plus résistantes cependant *E. coli* était la plus sensible (28 mm).

L'activité antimicrobienne remarquable de l'huile essentielle de *T. algeriensis* pourrait être liée à ses composants monoterpènes oxygénés et hydrocarbures monoterpènes, qui constituent respectivement environ 43,8% et 45,5% de cette huile (ensemble environ 89,3%), comme suggéré précédemment ([Cox et al., 2000](#)).

Les différences observées dans les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *T. algeriensis* seraient attribuées à la variation quantitative des composés des huiles essentielles attribuée aux effets de population comme montré par des travaux antérieurs de [Gachkar et al. \(2007\)](#) et [B. E. Ali et al. \(2015\)](#).

Concernant l'activité antibactérienne de l'HE d'*A. verticillata*, les diamètres des zones d'inhibition sont plus importants à ceux rapportés en littérature. De ce fait, [Laouer et al. \(2003\)](#) ont trouvé que l'HE d'*A. pusilla*, riche en thymol (44,5%), avait une activité antimicrobienne significative contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (15mm) et *Escherichia coli* (ATCC

25922) (16 mm) tandis que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (9 mm) s'est montré résistant à cette huile essentielle à une double dilution (1/2 :10 µl).

En revanche, [Tefiani et al. \(2015\)](#) ont trouvé une activité antibactérienne faible contre *E. coli* DSM 1077 (12,36 mm) et *Staphylococcus aureus* SARM (Résistant à la Méricilline 5) (11,67 mm). L' H.E. d'*A. pusilla* était riche en alcool de cumin (44%), avec du p-cymène et du limonène en quantités plus faibles. La faible teneur en ces 2 composés pourrait avoir contribué à l'absence d'activité antibactérienne efficace d'*A. pusilla*.

Récemment, [Attou et al. \(2017\)](#) ont trouvé une activité antibactérienne importante de cette huile surtout contre les bactéries Gram positif comme *Bacillus cereus* ATCC 25921 (35 mm ; 0,78 µl/ml) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (33 mm ; 0.78 µl/ml) mais aussi contre la bactérie gram positif *Escherichia coli* ATCC 8739 (23.5mm ; 1,65µl/ml). Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* a montré une très grande résistante à cette huile (6,5 mm).

Quant à l'HE de *T. polium* subsp *capitatum*, les résultats sont en accord avec ceux trouvés par [Kerbouche et al. \(2015\)](#) pour la même sous-espèce qui ont rapporté une activité importante contre *Staphylococcus aureus* (35,3 mm) et *Bacillus subtilis* (22 mm), mais aucune activité vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*.

De même, [Belmekki et al. \(2013\)](#) ont trouvé que *Bacillus cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922 étaient les micro-organismes les plus sensibles avec les zones d'inhibition les plus élevées (15, 16 et 16 mm ; CMI =5, 4 et 3 µl / ml respectivement). En revanche, la bactérie *P. aeruginosa* ATCC 27853 était résistante à cette huile essentielle.

Similairement, [Purnavab et al. \(2015\)](#) n'ont trouvé aucune activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique et de *T. polium* contre *P. aeruginosa*.

Cependant, [Vahdani et al. \(2011\)](#) ont montré que l'HE *Teucrium polium* à différentes concentrations (2,5 ; 5 et 10 µl) a présenté une légère activité antimicrobienne sur les microorganismes. *Escherichia coli* (6, 6 et 7 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (6, 7 et 7.5 mm)

6.2. Activité antimicrobienne des extraits éthanoliques

En général, les extraits éthanoliques présentaient des activités antimicrobiennes très faibles par rapport aux huiles essentielles. Les résultats du dépistage antimicrobien ont montré une faible activité contre *S. aureus*, alors que le reste des extraits était inactif contre d'autres micro-organismes (données non présentées). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par

plusieurs auteurs notamment pour les extraits de *Teucrium polium* (Essawi et Srour, 2000 ; Sarac et Ugur, 2007 ; Darabpour et al., 2010).

Les huiles essentielles testées ont montré d'excellentes activités antimicrobiennes cependant elles différaient d'une huile essentielle à une autre, et d'une bactérie à une autre. Les facteurs déterminant l'activité des huiles essentielles sont la composition, les groupes fonctionnels présents dans les composants actifs et leurs interactions synergiques (Dorman et Deans, 2000). Le mécanisme d'action antimicrobien varie en fonction du type d'HE ou de la souche du microorganisme utilisé. Il est bien connu qu'en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HE (Huang et al., 2014 ; Azhdarzadeh et Hojjati, 2016). Cela peut être attribué au fait que les bactéries à Gram négatif aient une membrane externe rigide, riche en lipopolysaccharide (LPS) et plus complexe, limitant ainsi la diffusion de composés hydrophobes à travers elle. Alors que cette membrane supplémentaire complexe est absente chez les bactéries Gram positif, entourée d'une épaisse paroi de peptidoglycane non suffisamment dense pour résister aux petites molécules antimicrobiennes, facilitant ainsi l'accès à la membrane cellulaire (Bezić et al., 2003 ; Zinoviadou et al., 2009 ; Hyldgaard et al., 2012). De plus, les bactéries à Gram positif peuvent faciliter l'infiltration de composés hydrophobes d'HE en raison des extrémités lipophiles de l'acide lipotéichoïque présent dans la membrane cellulaire (Cox et al., 2000 ; Cowan, 1999).

Certains HE, tels que celles trouvés dans le basilic, la sauge, l'hysope, le romarin, l'origan et la marjolaine, sont actives contre *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* et *Salmonella* spp. mais sont moins efficaces contre *Pseudomonas* spp. en raison de la formation d'exopolysaccharides qui augmentent la résistance aux HE (De Martino et al., 2009).

La présence du carvacrol et de thymol comme composants principaux peut expliquer la forte activité antimicrobienne des HE de *T. algeriensis* et *A. verticillata*. De ce fait, Cosentino et al. (1999) ont rapporté que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de thym sont principalement liées à leur teneur élevée en phénol. Les mêmes auteurs ont également noté que parmi les composés uniques testés, le carvacrol et le thymol se révélaient être les plus efficaces contre plusieurs souches et bactéries d'origine alimentaire.

Par contre, le rôle spécifique et / ou la contribution des composés individuels de *T. polium* ne sont pas clairs. Les propriétés antibactériennes de l'oxyde de caryophyllène et du β -caryophyllène ont été démontrées. Le β -pinène est également connu pour son activité antibactérienne et antifongique (Raei et al., 2014). Le α -pinène était auparavant connu pour son

activité antibactérienne (Kabouche et al. 2005). De plus, Ultee et al. (2002) ont démontré que le p-cymène avait une activité antibactérienne très faible, mais qu'il pouvait induire un gonflement de la membrane bactérienne. Par ce mécanisme, le p-cymène facilite probablement le transport de l' α -pinène et β -pinène dans la cellule. Le p-cymène n'affecte pas la perméabilité de la membrane mais peut diminuer l'enthalpie et la température de fusion de la membrane, ces propriétés renforcent la notion que ce composé peut agir comme une impureté de substitution dans la membrane (Cristani et al., 2007).

Dans une étude, Burt et al. (2007) ont montré que les cellules d'*E. coli* cultivées en présence d'une concentration sublétales de carvacrol produisaient beaucoup plus de GroEL, indiquant que le carvacrol affectait le repliement des protéines. Le carvacrol inhibait également la synthèse d'une autre protéine microbienne, la flagelline, et donnait naissance à des cellules sans flagelles, qui présentaient par la suite une diminution de la motilité. Ultee et al. (2000) ont observé une forte diminution de la production de toxines par *Bacillus cereus* en présence de carvacrol dans BHI (Brain Heart Infusion). Le carvacrol a également inhibé la production de toxines de *B. cereus* dans les soupes, mais des concentrations environ 50 fois supérieures étaient nécessaires pour obtenir le même effet que dans le bouillon.

La majeure partie de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'épices et d'herbes culinaires semble être associée aux composés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol (Davidson et Naidu, 2000 ; Trombetta et al., 2005).

En fait, plusieurs auteurs ont étudié l'activité antimicrobienne et leur mécanisme d'action. Dorman et Deans (2000) ont signalé que parmi les sept composants d'huile individuels testés contre 25 souches bactériennes, le composant ayant le spectre le plus large était le thymol suivi du carvacrol. Ces auteurs ont également indiqué que le thymol et le carvacrol ont des effets antimicrobiens similaires mais ont des mécanismes d'action différents contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

De même, Klein et al. (2013) ont déterminé l'activité antimicrobienne de six composants d'huiles essentielles contre les bactéries responsables de la détérioration des aliments, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta* et *Pseudomonas fragi*, à usage unique et combinées. Ils ont également montré que, à usage unique, les composants de l'huile les plus efficaces étaient le thymol (effet bactériostatique à partir de 40 ppm, l'effet bactéricide à 100 ppm) et le carvacrol (50 ppm/100 ppm), suivis du linalol (180 ppm/720 ppm),

α -pinène (400 ppm/pas d'effet bactéricide), 1,8-cinéol (1400 ppm/2800 ppm) et a-terpinéol (600 ppm / pas d'effet bactéricide).

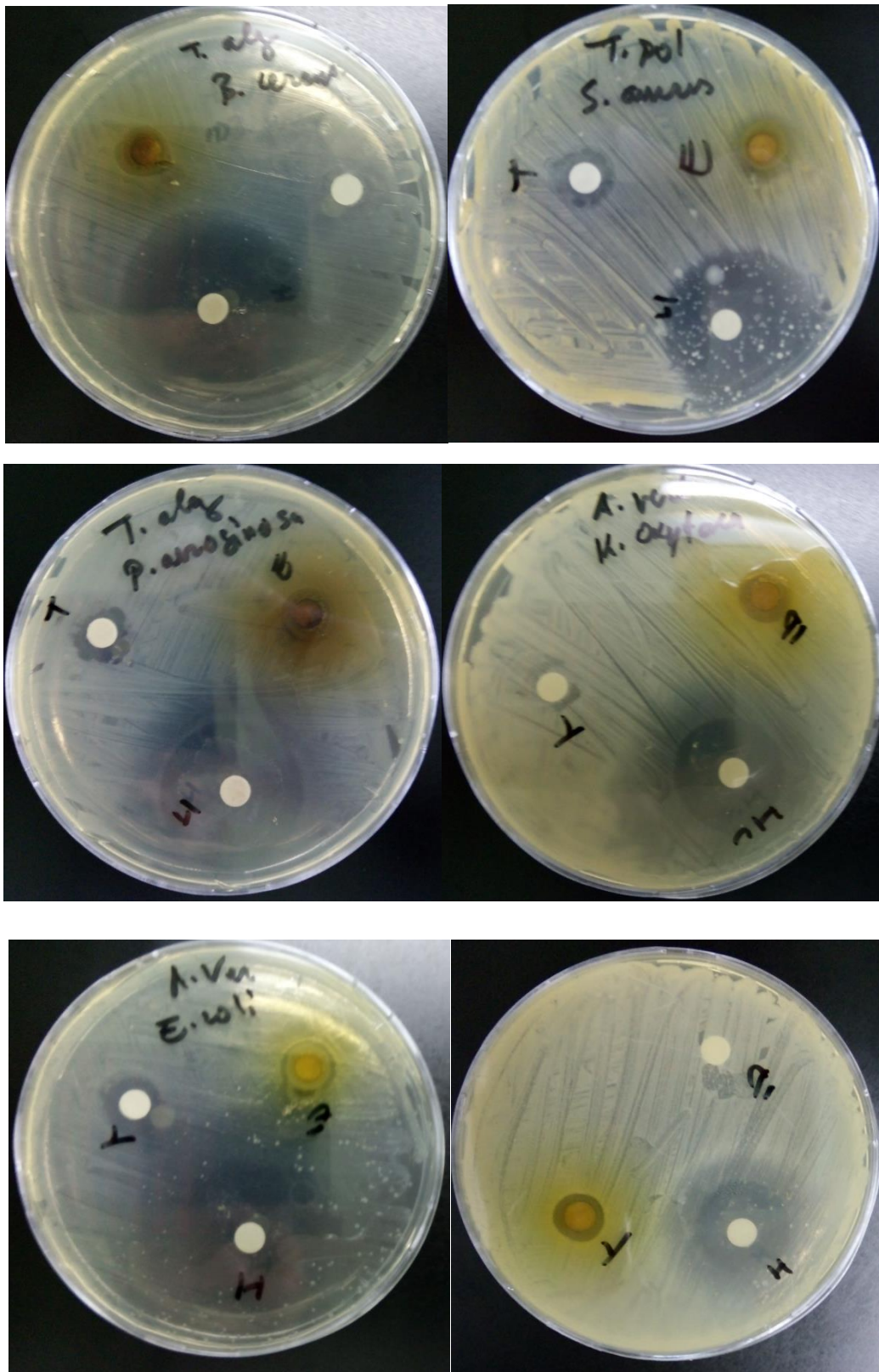


Figure 45. Photos montrant les zones d'inhibitions des souches testées (aromatogramme)

L'activité antimicrobienne de la plupart des terpénoïdes est liée à leurs groupes fonctionnels. Le groupe hydroxyle des terpénoïdes phénoliques et la présence d'électrons délocalisés sont des éléments importants de leur action antimicrobienne. Par exemple, le carvacrol est plus efficace que d'autres composants d'HE, tels que le p-cymène (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et al., 2002 ; Benarfa et al., 2006). L'échange entre le groupe hydroxyle et un éther méthylique dans le thymol et le carvacrol peut affecter leur hydrophobicité et leur activité antimicrobienne. Le groupe hydroxyle augmente leur capacité hydrophile, ce qui pourrait les aider à se dissoudre dans la membrane microbienne et à les altérer. Ces composants agissent sur les cellules microbiennes et provoquent des lésions structurelles et fonctionnelles de leurs membranes, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité (Sikkema et al., 1995). La position relative du groupe hydroxyle dans le noyau phénolique ne semble pas influencer le degré d'activité antibactérienne. Comparé au carvacrol, le thymol a une activité antimicrobienne similaire contre *B. cereus*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, même si son groupe hydroxyle est situé dans une position différente (Lambert et al., 2001 ; Ultee et al., 2002).

Helander et al. (1998) ont démontré que le carvacrol et le thymol pouvaient désintégrer la membrane externe et libérer le matériau associé à la membrane externe d'*E. coli* au milieu externe. En plus, ils ont diminué le pool d'ATP intracellulaire et également augmenté l'ATP extracellulaire, indiquant une action perturbatrice sur la membrane cytoplasmique. En outre, Xu et al. (2008) ont attribué leur effet antibactérien sur *E. coli* à leur capacité à perméabiliser et à dépolariser la membrane cytoplasmique.

Le thymol entraîne des altérations structurelles et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique pouvant endommager les membranes externe et interne, il peut également interagir avec les protéines membranaires et les cibles intracellulaires (Sikkema et al., 1995 ; Di Pasqua et al., 2010). L'interaction du thymol avec la membrane affecte la perméabilité de la membrane et entraîne la libération d'ions K^+ et d'ATP (Lambert et al., 2001, Walsh et al., 2003 ; Xu et al., 2008). Dans certains cas, le thymol peut induire la libération de lipopolysaccharides, mais n'affecte pas les cations chélateurs (Helander et al., 1998). Le thymol s'intègre dans les groupes de tête polaires de la bicouche lipidique, induisant des altérations de la membrane cellulaire. À faible teneur en thymol, la membrane peut adapter son profil lipidique pour maintenir sa fonction et sa structure (Turina et al., 2006). Les interactions du thymol avec les protéines se produisent sur différents sites de la cellule et peuvent affecter diverses fonctions cellulaires (Sikkema et al., 1995).

Comme le thymol, le carvacrol est l'un des rares composants d'une HE qui ait un effet désintégrant sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (La Storia *et al.*, 2011). Il provoque la libération des lipopolysaccharides (LPS) (Helander *et al.*, 1998) et agit également sur la membrane cytoplasmique pour modifier le transport des ions. L'activité du carvacrol semble être liée à la présence d'un groupe hydroxyle pouvant jouer le rôle de transporteur transmembranaire de cations monovalents en transportant H^+ dans le cytoplasme cellulaire et en transportant le K^+ vers l'extérieur. La dissipation des gradients ioniques conduit à une altération des processus essentiels dans la cellule et finalement à la mort cellulaire (Ultee *et al.*, 1999 ; Ultee *et al.*, 2002 ; Benarfa *et al.*, 2006).

Cependant, le mode d'action du carvacrol semble être d'augmenter la fluidité et la perméabilité des membranes. Lorsque les cellules microbiennes sont exposées au carvacrol, elles peuvent modifier leur composition en acides gras membranaires. C'est un mécanisme bien connu qui permet aux cellules de maintenir une structure et un fonctionnement optimaux de la membrane. La modification de la composition en acides gras en réponse du carvacrol pourrait non seulement affecter la fluidité de la membrane, mais également ultérieurement sa perméabilité (Ultee *et al.*, 2000 ; Di Pasqua *et al.*, 2006 ; Di Pasqua *et al.*, 2007).

Il existe également des preuves limitées que le carvacrol affecte les enzymes périplasmiques et les protéines membranaires (Juven *et al.*, 1994). Plusieurs auteurs ont rapporté que le carvacrol se joignait aux groupes amine et hydroxylamine des protéines de la membrane bactérienne, altérant leur perméabilité et entraînant la mort de la bactérie (Lambert *et al.*, 2001).

Ultee *et al.* (2002) ont trouvé que le carvacrol, composé antimicrobien naturel, a une préférence marquée pour les phases hydrophobes. Les coefficients de partage du carvacrol dans les phases octanol-eau et tampon liposomes ont été déterminés (3,64 et 3,26, respectivement). L'ajout de carvacrol à une suspension liposomale a entraîné une expansion de la membrane liposomale. Une expansion maximale a été observée après addition de 0,50 mol de carvacrol / mg de L phosphatidyléthanolamine. Le p-cymène, précurseur biologique du carvacrol dépourvu de groupe hydroxyle, a une préférence plus grande pour les membranes liposomales, ce qui entraîne une plus grande expansion. L'effet du p-cymène sur le potentiel de membrane était moins prononcé que celui du carvacrol. Le p-cymène n'a pas d'incidence sur les bassins de gradient de pH et d'ATP. La mesure des activités antimicrobiennes de composés similaires au carvacrol (par exemple thymol, cymène, menthol et ester méthylique de carvacrol) a montré

que le groupe hydroxyle de cette molécule composé et la présence d'un système d'électrons délocalisés jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne du carvacrol. Sur la base de cette étude, ces auteurs ont émis l'hypothèse que le carvacrol déstabilise la membrane cytoplasmique et, en outre, agit comme un échangeur de protons, réduisant ainsi le gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique. L'effondrement de la force motrice des protons et l'épuisement du pool d'ATP qui en résulte ont finalement conduit à la mort cellulaire.

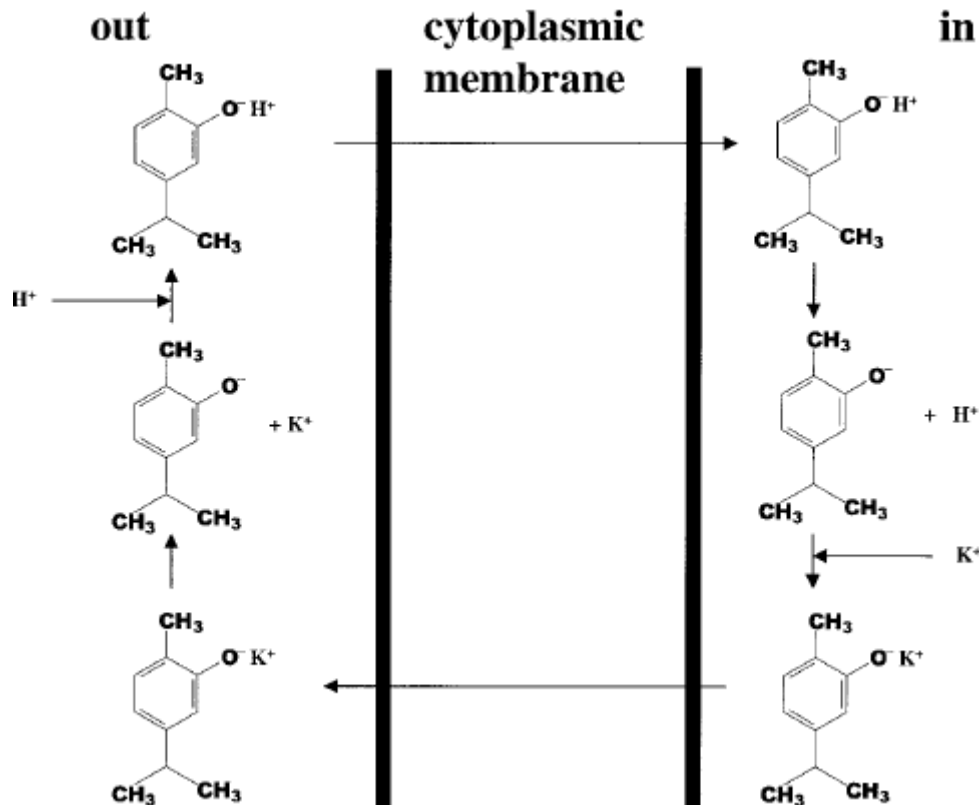


Figure 46. Représentation schématique de l'activité supposée du carvacrol (Ultee *et al.*, 2002)

Le carvacrol non dissocié diffuse à travers la membrane cytoplasmique vers le cytoplasme et se dissocie, libérant ainsi son proton dans le cytoplasme. Il revient ensuite non dissocié en portant un ion potassium (ou un autre cation) du cytoplasme, qui est transporté à travers la membrane cytoplasmique vers l'environnement externe. Un proton est absorbé et le carvacrol sous forme protonée diffuse à nouveau à travers la membrane cytoplasmique et se dissocie en libérant un proton dans le cytoplasme.

Bien que certains composés majeurs jouent à eux seuls un rôle important dans l'activité d'une HE, cependant, il est difficile d'attribuer l'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles caractérisée par un mélange complexe, à un constituant unique ou particulier. En fait, certaines études ont conclu que les huiles essentielles entières ont une activité antibactérienne supérieure à celle des composants principaux mélangés (Gill *et al.*, 2002).

Des effets synergiques et antagonistes entre plusieurs composants de l'huile sont possibles et doivent également être pris en compte. En outre, il a été démontré que les interactions synergiques et / ou antagonistes entre les composants mineurs et les principaux composants des huiles essentielles peuvent affecter les activités antimicrobiennes (Vladimir-Knezević *et al.*, 2012). En effet, Giweli *et al.* (2013) ont noté que l'huile essentielle de *T. algeriensis* possédait une meilleure activité antibactérienne que les composés thymol et carvacrol, ce qui pourrait s'expliquer par l'activité synergique des autres composés présents. Ultee *et al.* (2002) ; Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, (2010) ont signalé que le p-cymène peut augmenter l'activité antimicrobienne de carvacrol.

Globalement, les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Ammoides verticillata* ont montré une activité antibactérienne significative, en particulier contre *S. aureus* et *B. cereus*, espèces toxigènes reconnues. Ces huiles ont également inhibé efficacement la croissance *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. oxytaca*, ce qui est crucial car ces bactéries se sont révélées impliquées dans l'évolution des maladies gastro-intestinales et qui représentent, plus de 80% des cas cliniques (Le Loir *et al.*, 2003 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2004 ; Jørgensen *et al.*, 2005 ; Bennett *et al.*, 2013).

Les résultats actuels soutiennent l'utilisation traditionnelle de ces herbes contre diverses infections gastro-intestinales, par conséquent, leurs propriétés bioactives pourraient facilement être attribuées à leurs HE. En outre, les résultats obtenus impliquent également que les huiles de thym et de cerfeuil pourraient également être utiles contre les infections par des agents pathogènes d'origine alimentaire.

Il convient donc de souligner l'intérêt porté à l'étude des plantes présentant les activités biologiques les plus élevées. Notre travail a montré que les huiles essentielles de *T. algeriensis* et *A. verticillata* étaient les uns des principaux inhibiteurs des souches testées comme agents de causalité des maladies d'origine alimentaire, ce qui suggère la possibilité d'utiliser ces plantes en tant que conservateur antimicrobien naturel dans les systèmes alimentaire et pharmaceutique.

Il est évident que toute activité biologique d'une HE ou d'un extrait non volatile d'une plante est étroitement liée à la composition chimique de cette huile ou de cet extrait. D'autre part, les compositions chimiques des HE ou des extraits des différents organes d'une plante peuvent être qualitativement identiques mais quantitativement différentes (Hazzit *et al.*, 2009), car elles peuvent être différentes des deux points de vue précédents (Abdelmageed *et al.*, 2011 ; Krayni *et al.*, 2015 ; Ennajar *et al.*, 2010 ; Nasiri *et al.*, 2017).

De plus, pour un même organe et une même plante, les méthodes d'extraction (Djouahri *et al.*, 2013), l'origine géographique (Hazzit *et al.*, 2009) ainsi que les conditions de fonctionnement peuvent influencer sur la composition chimique de l'huile ou de l'extrait et, par conséquent, sur leurs activités biologiques (Benchabane *et al.*, 2015 ; Krayni, *et al.*, 2015).

Ainsi, les résultats présentent toujours une variabilité en fonction des matrices spécifiques liées à un nombre de facteurs tels que la diversité de la nature, l'origine géographique, la méthode d'extraction, etc.

Conclusion
générale

Et perspectives

Les plantes constituent un réservoir immense de composés chimiques qui présentent l'avantage d'une grande diversité structurale et d'activités biologiques. Leur utilisation thérapeutique et alimentaire par l'homme remonte à l'antiquité. De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir la médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agroalimentaire. Parmi ces molécules, les composés phénoliques et terpéniques occupent une place très importante par leurs propriétés pharmacologiques qui sont attribuables principalement à leurs activités antioxydantes.

Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer les activités biologiques de 3 plantes aromatiques en l'occurrence *Teucrium polium* subsp *capitatum*, *Thymus algeriensis* et *Ammoides verticillata* dans la perspective de mieux exploiter leur potentiel dans le domaine alimentaire et nutraceutique.

De cette étude nous pouvons ressortir les points suivants :

- Des rendements importants (v/m) en huile essentielle ont été obtenus pour les plantes *A. verticillata* et *T. algeriensis* (3,33 et 2.67%) alors que un rendement faible (0,27%) pour la plante *T. polium* subsp. *capitatum*.
- Les données chromatographiques ont montré que l'HE de *T. polium* subsp *capitatum* est caractérisée par le germacène D (25%) comme principal composant, suivi par le β -pinène (11,3%) et le bicyclogermacène (10,4%). L'HE de *T. algeriensis* était dominée par le carvacrol (43,2%), le p-cymène (18,7%) et le γ -terpinène (14,8%). L'HE d'*A. verticillata* était caractérisée par le thymol (43.3%), le carvacrol (12.0 %), le p-cymène (14.6%), le limonène (11.0 %), et le γ -terpinène (9.9 %) comme constituants principaux.
- Les valeurs des rendements et teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et flavonoïdes totaux (FT) des extraits éthanoliques ont montré une richesse en ces composés qui varient entre 108-170 et 25,33-67,79 mg EAG et EQ/g d'extrait respectivement, dans l'ordre *A. verticillata*, *T. algeriensis* et *T. polium* subsp. *capitatum*.
- Le profilage chromatographique par HPLC-DAD des extraits a révélé des profils riches en acide n-hydroxy cinnamique pour le *Teucrium polium* subsp *capitatum*, acide rosmarinique pour le *Thymus algeriensis* et lutéoline 7-O-glucoside pour l'*Ammoides verticillata*.

L'évaluation des activités biologiques a permis de mettre en évidence l'efficacité des propriétés anti-cholinestérasiques notamment pour les HE qui ont montré les meilleures activités inhibitrices vis-à-vis de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase par rapport aux extraits. Néanmoins, elles étaient moins actives que le standard galantamine. L'HE de *T. algeriensis* a exercé la meilleure activité inhibitrice de l'AChE ($IC_{50} = 98,84 \mu\text{g/ml}$), tandis que la meilleure activité inhibitrice de la BChE a été exercée par l'huile de *T. polium* subsp *capitatum* ($IC_{50} = 89,71 \mu\text{g/ml}$). Les EE ont manifesté un faible effet inhibiteur, voire aucun, notamment vis-à-vis l'AChE. En effet, seul l'extrait de *T. algeriensis* a montré une activité anti-BChE plus ou moins modérée ($IC_{50} = 214,76 \mu\text{g/ml}$).

Les propriétés antioxydantes a été évaluée par les tests blanchiment de β -carotène, pouvoir réducteur ferrique et cuivrique et inhibition des radicaux ABTS^{•+}, DPPH• et superoxydes. Les HE ont montré différentes tendances en matière d'activité antioxydante en fonction du test utilisé, tandis qu'une activité élevée a été constatée pour les extraits éthanoliques avec tous les tests. Les résultats de tous les tests, exprimés en terme de IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{ml}$) ont montré pour toutes les méthodes utilisées, à l'exception du test CUPRAC, une bonne corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits des trois plantes. En effet, l'extrait d'*A. verticillata* et *T. algeriensis* plus riche en ces composés, étaient généralement les plus actifs par rapport à l'extrait de *T. polium* subsp *capitatum*. D'autre part, ce dernier extrait était plus actif que son HE correspondant avec toutes les méthodes testées sauf le test ABTS.

L'étude de l'activité antihémodolytique a révélé une tendance similaire à celle de l'activité antioxydante où les extraits les plus riches en composés notamment l'*A. verticillata* ont assuré une meilleure protection des érythrocytes contre l'hémolyse induite par l'AAPH qui dépasse même celle de la quercétine un flavonoïde aux propriétés antihémodolytiques.

Les propriétés antimicrobiennes ont été également étudiées quantitativement et qualitativement par la mesure des zones d'inhibition (ZI) et des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les huiles essentielles de *T. algeriensis* et d'*A. verticillata* ont montré une forte activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif contrairement à l'HE de *T. polium* subsp *capitatum* qui s'est avérée inactive contre les Gram négatif. Cependant, les EE étaient tous inactifs contre toutes les bactéries testées. Les zones d'inhibition et les valeurs de CMI des souches microbiennes étaient comprises entre 19 et 62 mm et entre 1,25 et 20 mg / ml respectivement. Les bactéries à Gram positif se sont révélées plus sensibles aux huiles

essentielles que les bactéries à Gram négatif. L'activité la plus élevée a été observée contre les bactéries Gram positif *S. aureus* ATCC 6538 avec les zones d'inhibition les plus élevées (62 mm) et les CMI les plus faibles (1,25 mg/ml) pour les huiles de *T. algeriensis* et *A. verticillata* tandis que l'activité la plus faible a été remarquée pour les bactéries *P. auroginosa* ATCC 9627 et *K. oxytaca* ATCC 13182. L'HE de *T. polium* subsp *capitatum* a montré les concentrations inhibitrices les plus élevées.

Nos résultats ont montré que les extraits volatiles et non volatils (HE et EE) des trois plantes possèdent des propriétés anticholinestérasiques, antihémolytiques, antioxydantes agissant en tant que piègeurs de radicaux libres, agents réducteurs et inhibiteurs de la peroxydation des lipides ainsi que antimicrobiennes. Cependant, seule l'HE de *T. algeriensis* a montré une capacité prometteuse pour une utilisation éventuelle en tant qu'agent thérapeutique pour les troubles neurodégénératifs. Les EE des trois plantes ont montré une forte capacité antioxydante dans la mesure où la concentration inhibitrice médiane était atteinte pour tous les tests, ce qui n'était pas le cas avec les HE. Dans presque tous les tests utilisés, l'*A. verticillata* a montré la plus grande efficacité, que ce soit par son HE ou par son EE, ou par les deux à la fois, suivi de *T. algeriensis* ce qui suggère que ces plantes pourraient être exploitées à des fins alimentaires.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

En perspective, il serait fort intéressant de :

- Compléter cette étude *in vitro* par : ne expérience *in vivo*, à même capable de vérifier les activités biologiques de ces extraits et de s'en assurer l'innocuité totale et l'absence de risques toxicologiques de ces composés chez un modèle animal de choix.
- Incorporer ces composés dans un aliment modèle et d'explorer l'effet isolé et synergique des différents constituants.
- Utiliser des méthodes plus modernes pour l'extraction des principes actifs telles que l'extraction assistée par microondes, par ultrason ou par fluide supercritique.
- Elargir l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens à d'autres tests plus avancés
- Isoler les principes actifs de ces extraits et étudier leurs effets *in vitro* et *in vivo*.
- Appliquer les techniques biotechnologiques dans le domaine des métabolites secondaires afin de tirer le maximum de ces molécules, et les utiliser pour l'intérêt de la santé humaine.

Références bibliographiques

- Aazza S., Lyoussi B., Miguel M. G. (2011).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9):7672-90.
- Abdelmageed A. H. A., Faridah Q. Z., Nur Amalina A., Yacoob M. (2011).** The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical composition of the essential oils of *Etligeria elatior* (Zingiberaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3432–3439.
- Abdollahi M., Chan T., Subrahmanyam V., O'Brien P. (2003).** Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte CAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 252:205-211.
- Abdollahzadeh E., Rezaei M., Hosseini H. (2014).** Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183.
- Aboutabl E. A. and El-dahmy S. I. (1995).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. *Bulletin of Faculty Pharmacy Cairo University*, 33:87–90.
- Adams R. P. (2007).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th edn. (Allured Publ. Corp., Carol Stream, p. 804.
- Aeschbach R., Löliger J., Scott B. C., Murcia A., Butler J., Halliwell B., Aruoma O. I. (1994).** Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32(1):31-6.
- AFNOR, 2000.** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.
- Afsar T., Razak S., Khan M. R., Mawash S., Almajwal A., Shabir M. and Ul Haq (2016).** Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:258.
- Aharoni A., Jongsma M.A. & Bouwmeester H.J. (2005).** Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10, 594–602.
- The Angiosperm Phylogeny Group (APG) (2016).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20.
- Aharoni A., Jongsma M. A. and Bouwmeester H. J. (2005).** Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10 (12):1-10.
- Ahmed F., Ghalib R. M., Sasikala P. & Ahmed K. K. M. (2013).** Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14):121-130.
- Ait-Ouazzou A., Loràn S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagàna R. and Conchelloa P. (2011).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of

Thymus algeriensis, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:2643–2651.

Alam Md. N., Bristi N. J. and Rafiquzzaman Md. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.

Al Bahiti N.H. (2012). *Asian Journal of Agricultural Science*, 4, 379–382

Albano S. M., Lima A. S., Miguel M. G., Pedro L. G., Barroso J. G. & Figueiredo A. C. (2012). Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *Records in Natural Products*, 6:1, 35-48.

Alizadeh A., Alizadeh O., Amari G. & Zare M. (2013). Essential Oil Composition, Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Antifungal Properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *Daenensis* Celak. as in Influenced by Ontogenetical Variation, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16:1, 59-70.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El-Ajjouri M. and Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1):141-148.

Amiri H. (2012). Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:728065

Andary C., Rascol J. P., Puech S., Roussel J. L., and Privat G. (1988). Les esters de l'acide caféique dans la chimiotaxinomie des *Teucrium* de la section *poliurn* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 66, 1007-1012.

Antunes, T., Sevinete-Pinto, I., Barroso, J. G., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. R. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 336–340.

Apak, R., Guclü, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S. E. & Altun M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research*, 39(9):949-961.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Saliha Esin Çelik S. E., Bektaşoğlu B., Berker K. I. and Özyurt D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.

- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S. E. (2008).** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4):413-419.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007).** Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233–1240.
- Ardestani A. and Yazdanparast R. (2007).** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2402-2411.
- Aruoma O. I. (1994).** Nutrition and health aspects of free Radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32 (7), 671-683.
- Aruoma O. I. (1998).** Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*, 75(2), 199-212.
- Ashnagar A., Gharib Naseri N., Foroozanfar S. (2007).** Isolation and Identification of the Major Chemical Components Found in the Upper Parts of *Teucrium Polium* Plants Grown in Khuzestan Province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 1171-1173.
- Ashour M., Wink M. and Gershenzon J. (2010).** Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual Plant Reviews*, 40, 258–303.
- Attou A., Davenne D., Benmansour A., Lazouni H.A. (2017).** Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytothérapie*.
- Autore, G., F. Capasso, De Fusco, R. Fasulo, M. P. Lembo, M. Mascolo, N. Menghini, A. (1984).** Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. *Pharmacological Research Communications*, 16(1): 21-29.
- Azhdarzadeh F. and Hojjati M. (2016).** Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition And Food Sciences Research*, 3:43-50.
- Aziz M. H., Kumar R. and Ahmad N. (2003).** Cancer chemoprevention by resveratrol: In vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review). *International journal of oncology*, 23: 17-28.
- Baba Aïssa F. (1991).** Les plantes médicinales en Algérie. Aryana Libris, Alger, Algérie
- Babu B. H., Shylesh B. S., Padikkala J. (2001).** Antioxidant and hepatoprotective effect of *Alanthus icicifocus*. *Fitoterapia*, 72:272–277.
- Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G. (2011).** Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40, 43101–43147.
- Babior B. M. (1999).** NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1; 93(5), 1464-76.

- Bachir R. G. and Benali M. (2012).** Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 739-742.
- Baher Z. F. & Mirza M. (2003).** Volatile Constituents of *Teucrium flavum* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2) :106-107.
- Bahramikia S. & Yazdanparast R. (2012).** Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 26(11): 1581-1593.
- Bajgar J. (2004).** Organophosphates/nerve agent poisoning : mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advanced Clinical Chemistry*, 38: 151-216.
- Bajpai V. K., Rahma A., Choi U. K., Youn S. J., Kang S. C. (2007).** Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 105:1061-1066.
- Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C., Miguel M. G. (2013).** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46:85-96.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck, D. and Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Ballard C. G., Greig N. H., Guillozet-Bongaarts A. L., Enz A. and Darvesh S. (2005).** Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*, 2:307-318.
- Ballester-Costa C., Sendra E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A., Viuda-Martos M. (2013).** Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304– 311.
- Ballester-Costa C., Sendra E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A. and Viuda-Martos M. (2017).** Assessment of Antioxidant and Antibacterial Properties on Meat Homogenates of Essential Oils Obtained from Four *Thymus* Species Achieved from Organic Growth. *Foods*, 6, 59.
- Balouiri M., Sadiki M., Koraichi Ibsouda S. (2016).** Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71–79.
- Baluchnejadmojarad T., Roghani M. and Roghani-Dehkordi F. (2005).** Antinociceptive effect of *Teucrium polium* leaf extract in the diabetic rat formalin test. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 207–210.
- Banerjee A., Kunwar A., Mishra B., Priyadarsini K.I. (2008).** Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-biological Interactions*, 174:134–139.
- Barbosa Filho J. M., Medeiros K. C. P., Diniz M-F. F.M, Batista L. M., Athayde-Filho P. F., fernandes M. S., da-Cunha E.V.L., Silva Almeida J. R.G. and Quintans-Júnior L. J.**

- (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2): 258-285.
- Barceloux D. G. (2008).** Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, & Venomous Animals. New Jersey: John Wiley and Sons.
- Barnes S., Prasain J., D'Alessandro T., Arabshahi A., Botting N., Lila M. A., Jackson G., Janle E.M. & Weaver C. M. (2011).** The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food Function*, 2, 235.
- Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Ruberto G. (1998).** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4):235-244.
- Barros L, Ferreira M-J, Queiros B, Ferreira I, Baptista P. (2007).** Total phenols, ascorbic acid, β -Carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103(2):413-419.
- Bartosz G. (2003).** Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems, *Comments on Toxicology*, 9:1, 5-21
- Bartosz G. and Kolakowska A. (2011).** Lipid Oxidation in Food Systems. In: Chemical, Biological and Functional Aspects of Food Lipids, Taylor and Francis (ed), 2nd ed, p
- Baser K. H. C. and Demirci F. (2007).** Chemistry of essential oils. In: Berger R.G. (ed.) Flavours and fragrances – Chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer, Berlin, pp 43-86.
- Bauer K., Garbe D., Surburg H. (2008).** Common fragrance and flavor materials. Wiley.
- Baydara H. Sağdıç O., Özkanc G., Karadoğan T. (2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(3):169-172.
- Baytop T. and Sütlüpinar N. (1986).** Characteristics of «Nanahan» cultivated in Anatolia and its volatile oil. *Journal of Faculty of Pharmacy Istanbul University*, 22, 73-76.
- Bedir E., Tasdemir D., Calis I., Zerbe O., and Sticher O. (1999).** Neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 51:921-925.
- Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. and Younos C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *Journal of Ethnopharmacology* 35: 123-143.
- Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris.
- Belmekki N., Bendimerad N., Bekhechi C. and Fernandez X. (2013).** Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(14):897-902.

- Benabid A. (2000).** Flore et écosystèmes du Maroc. Évaluation et préservation de la biodiversité. Ibis press, Paris, 259 p.
- Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N. and P. Chalier (2006).** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43:149–154.
- Benchabane O., Hazzit M., Mouhouche F., Baaliouamer A. (2015).** Influence of Extraction Duration on the Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil of *Thymus pallescens* de Noé. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7):1855–1865.
- Ben El Hadj Ali I., Zaouali Y., Bejaoui A., Boussaid M. (2010).** Variation of the chemical composition of essential oils in Tunisian populations of *Thymus algeriensis* Boiss. ET Reut. (Lamiaceae) and implication for conservation. *Chemistry and Biodiversity*, 7:1276-1289.
- Ben El Hadj Ali I., Chaouachi M., Bahri R., Chaieb I., Boussaïd M., Harzallah-Skhiri F. (2015).** Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops and Products*, 77, 631–639.
- Benkiniouar R., Rhouati S., Touil A., Seguin E. and Chosson E. (2007).** Flavonoids from *Thymus algeriensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(3):321-322.
- Bennett S. D., Walsh K. A., Gould L. H. (2013).** Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57(3):425–433.
- Ben Othman M., Bel Hadj Salah-Fatnassi K., Ncibi S., Elaïssi A. Zourgui L. (2017).** Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (L.H.) from Tunisia. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3):723-729.
- Benzie I. F. F. (2000).** The evolution of antioxidant defense mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39, 53–61.
- Berset C. (2006).** Pigments phénoliques : structures, stabilité, marché des colorants naturels et effets sur la santé. In: P. Sarni-Manchado, V. Cheynier (coord.), *Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris : Lavoisier.
- Bezić N., Vuko E., Dunkić V., Ruščić M., Blažević I. and Burčul F. (2011).** Antiphytoviral Activity of Sesquiterpene-Rich Essential Oils from Four Croatian *Teucrium* Species. *Molecules*, 16, 8119-8129.
- Bloomfield S. F. (1991).** Methods for assessing antimicrobial activity. In: Mechanisms of Action of Chemical Biocides: Their Study and Exploitation S. P. Denyer and W. B. Hugo. Blackwell, Oxford, pp. 1-22.

- Bnouham M., Merhfouf F. Z., Legssyer A., Mekhfi H., Maâlem S., Ziyat A. (2007).** Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute*, *Pharmazie*, 62, 630-632.
- Bnouham M., Merhfouf F. Z., Ziyat A., Aziz M., Legssyer A., Mekhfi H. (2010).** Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats, *Human Experimental Toxicology*, 29, 865-871.
- Bohn T., McDougall G. J., Alegría A., Alminger M., Arrigoni E., Aura A., Brito C., Cilla A., El S., Karakaya S., Martínez-Cuesta M., & Santos C. (2015).** Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7), 1307-1323.
- Boros B., Jakabová S., Dörnyei A., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F., & Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972–7980.
- Bouhlali E. T., Bammou M., Sellam K., Benlyas M., Alem C., Filali-Zegzouti Y. (2016).** Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *Journal of King Saud University – Science*, 28, 136–142.
- Boulos L. (1983).** Medicinal Plants of North Africa. Reference Publications, Algonac, 110.
- Bousetla A., Akkal S., Medjroubi K., Louaar S., Azouzi S., Djarri L., Zaabat N., Laouer H., Chosson E., and Seguin E. (2005).** Flavonoid glycosides from *Ammoides pusilla*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 95.
- Boutaoui N., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Carradori S., Cesa S., Giusti A. M., Campestre C., Menghini L., Innosa D. and Locatelli M. (2018).** Qualitative and Quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules*, 23, 463, 1-11.
- Bowles E.J. (2003).** Chemistry of Aromatherapeutic Oils. Allen and Unwin, Australia.
- Bouwmeester H. J. (2006).** Engineering the essence of plants. *Nature Biotechnology*, 24, 1359-1361.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol* 28:25–30.
- Bravo L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11) : 317-333.
- Brufani M. and Filocamo L. (2000).** In: *Cholinesterases and Cholinesterase inhibitors*; Ezio Giacobini, Ed.; Martin Dunitz Ltd.: London, pp. 27-46.

-
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier, 623p.
- Buettner G. (1999).** Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochemistry and Photobiology*, 70:858-67.
- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M. E. J. and Crozier A. (2002).** Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3337-3340.
- Burt S. & Reinders R. D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 162-167.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-253.
- Burt S. A., van der Zee R., Koets A. P., de Graaff A. M., Van Knapen F., Gaastra W., Haagsman H. P., Veldhuizen E. J. A. (2007).** Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:4484–4490.
- Calo J. R., Crandall P. G., O’Bryan C. A. & Ricke S. C. (2015).** Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems— A Review, *Food Control*, 54, 111-119.
- Camps P. and Muñoz-Torrero D. (2002).** Cholinergic Drugs in Pharamcotherapy of Alzheimer’s disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2, 11-25.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmenc A., Akpulat H. A. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87:215–220.
- Cantino P. D., Harley R. M., Wagstaff S. J. (1992).** Genera of Labiatae: status and classification. In: Harley RM, Reynolds T. editors, *Advances in Labiate Science*. Royal Botanic Gardens. Kew. 511–522.
- Carocho M. and Ferreira I.C.F.R. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Carreiras M. C., Rodríguez B., Piozzi F., Savona G., Torres M. R. and Perales I. (1989).** A chlorine containing and two 17 β -neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *vincentinum*. *Phytochemistry*, 28(5):1453-1461.
- Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V. (2002).** Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1914-1920.

- Celiktas O. Y., Kocabas E.E. H., Bedir E., Sukan F. V., Ozek T., Baser K. H. C. (2007).** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559.
- Cevallos-Casals B. A. & Cisneros-Zevallos L. (2010).** Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119 (4):1485-1490.
- Chaieb M. et Boukhriss M. (1998).** Flore succincte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie. Association de la Protection de la Nature et de l'Environnement, l'Or du Temps (ed), Sfax, Tunisie, 42.
- Chakraborty D., Verma R. J. (2010).** Ameliorative effect of *Embllica officinalis* aqueous extract against ochratoxin – induced lipid peroxidation in the kidney and liver of mice. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 23:1–11.
- Chandrasekaran M. and Venkatesalu V. (2004).** Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 105-108.
- Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B., Sengupta P. K. (2007).** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41:42–48.
- Charles D.J. (2013).** Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. Thyme, pp 553-561. Springer Science and Business Media New York.
- Chemat S., Cherfouh R., Meklati B. Y. & Belanteur K. (2013).** Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 24:1, 5-11.
- Chen C., Pearson A. M. and Gray J. I. (1992).** Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43(3):177-183.
- Chen C. W. and Ho C. T. (1995).** Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black tea. *Journal of Food Lipids*, 2, 35-46.
- Chen X. & Ahn D. U. (1998).** Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75: 1717–1721.
- Cheyrier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V., Martens S. (2013).** Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72:1-20.
- Chorianopoulos N. G., Evergetis E. T., Aligiannis N., Mitakou S., Nychas G-J. E., Haroutounian S. A. (2007).** Correlation between chemical composition of Greek essential oils and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Natural Product Communications*, 2:419-426.

- Chun K., Kim D. O., Lee C. Y. (2003).** Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8067-8072.
- Chung Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F., Chou S. T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8):2454-8.
- Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J. (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213–220.
- Cillard J. et Cillard P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides*, 13:24–29.
- Clifford M. N. (1999).** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the science of food and agriculture*, 79(3), 362-372.
- Clifford M. N. (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the science of food and agriculture*, 80:1033-1043.
- CLSI (2012).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Colletier J-P. (2006).** Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acetylcholinesterase. Biochimie [q-bio.BM]. Thèse de Doctorat, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, Français.
- Ćolović M. B., Krstić D. Z., Lazarević-Pašti T. D., Bondžić A. M. and Vasić. V. M. (2013).** Acetylcholinesterase Inhibitors : Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11, 315-335.
- Cos P., Ying L., Calomme J. P., Chmanga K., Poel B. V., Pieters L., Vlietinck A. J., Berghe D. V. (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 71-76.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. (1999).** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Couplan F. (2012).** Les plantes et leurs noms. Histoires insolite, Éditions Quae, p. 224.
- Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564–582.

Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R., Wyllie S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88:170-175.

Cozzani S., Alain Muselli A., Desjobert J.-M., Antoine-François Bernardini A.-F., Tomi F. and Casanova J. (2005). Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 436–441.

Craig L. A., Hong N. S., McDonald R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35:1397–1409.

Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:6300–6308.

Croteau R., Kutchan T. M. and Lewis N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: *American Society of Plant Physiologists*, pp. 1250–1318.

Crozier A., Burns J., Aziz A. A., Stewart A. J., Rabiasz H. S., Jenkins G. I., Edwards C. A., Lean M. E. (2000). Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research*, 33(2):79-88.

Crozier A., Jaganath I. B. and Clifford M. N. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Crozier A., Clifford M. N, Ashihara H. (Ed.), Blackwell Publishing Ltd, 372p.

Crozier A., Jaganath I. B. and Clifford M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 2009, 26, 1001–1043.

Cuadrado M. J. S., Bruno M., De La Torre M.C., Piozzi F., Savona G. and Rodriguez B. (1992). Rearranged abietane diterpenoids from the root of two *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 31, 1697-1701.

Cushnie T. P. T. and Lamb A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5):343-356.

Cygler M., Schrag J. D., Sussman J. L., Harel M., Silman I., Gentry M. K., and Doctor B. P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*, 2(3):366-382.

Dahl M. K. and Richardson T. (1978). Photogeneration of superoxide anion in serum of bovine milk and in model systems containing riboflavin and amino Acids. *Journal of Dairy Science*, 61, 400–407.

- Dai F., Miao Q., Zhou B., Yang L. and Liu Z. L. (2006).** Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Science*, 18, 78(21), 2488-93.
- Daira N.E-L, Maazi M. C., Chefrou A. (2016).** Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85 :276 – 290.
- Djouahri A., Boudarene L., and Meklati B. Y. (2013).** Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master. *Industrial Crops and Products*, 44:32–36.
- Dambolena J. S., Zunino M. P., Lucini E. I., Olmedo R., Banchio E., Bima P. J., Zygodlo J. A. (2010).** Total Phenolic Content, Radical Scavenging Properties, and Essential Oil Composition of Origanum Species from Different Populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1115–1120.
- Dalle-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Tell G., Lungarella, G., et al. (2005).** Proteins as biomarkers of oxidative/ nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 55–99.
- Dangles O. (2006).** Propriétés chimiques des polyphénols. In *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, p. 29-54.
- Darabpour E., Motamedi H., Mansour S., Nejad S. (2010).** Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2:124-127.
- Darvesh S., Darvesh K.V., McDonald R.S., Mataija D., Walsh R., Mothana S., Lockridge O. and Martin, E. (2008).** Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Towards Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4200-4212.
- Dastmalchi K., Dorman H. J. D., Viorela H., Hiltunen R. (2007).** Plants as potential source for drug development against Alzheimer's disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 1, 83–104.
- Davidson P. M. and Naidu A. S. (2000).** Phyto-phenol. In: Naidu, AS. (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 265–294.
- Davies P. (1999).** Challenging the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer Disease. *Journal of the American Medical Association*, 281(15):1433-1434.
- de Freitas M. V., Rita de Cássia M.N., da Costa Huss J.C., de Souza T.M.T., Costa J.O., Firmino C.B., Penha-Silva N. (2008).** Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 22 (1), 219–224.

- De la torre M. C., Piozzi F., Rizk A-F., Rodriguez B. and Savona G. (1986).** 19-Acetylteupolin IV, a neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium polium* subsp. *pilosum*. *Phytochemistry*, 25(9), 2239-2240.
- De Martino L., de Feo V., Nazzaro F. (2009).** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. *Molecules*, 14:4213-4230.
- De Martino L., Formisano C., Mancini E., DeFeo V., Piozzi F., Rigano D. and Senatore F. (2010).** Chemical composition and phytotoxic effects of essential oils from four *Teucrium* species. *Natural Product Communications*, 5:1969-1976.
- De Marino S., Festa C., Zollo F., Incollingo F., Raimo G., Evangelista G., Iorizzi M. (2012).** Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133, 21-28.
- Devienne K. F., Raddi M. S. G. (2002).** Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2): 97-105.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N. and Mnif W. (2016).** Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3, 25.
- Dimberg L. H., Molteberg E. L., Solheim R., Frolich W. (1996).** Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment, phenolic compounds. *Journal of Food Science*, 24:263-272.
- Di Meo S., Reed T. T., Venditti P. and Victor V. M. (2016).** Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 44 pages.
- Dimitrijević S. I., Mihajlovski K. R., Antonović D. G., Milanović-Stevanović M. R., Mijin D. Ž. (2007).** A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*, 104:774-782.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G. (2006).** Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:2745-2749.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. (2007).** Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4863-4870.
- Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. (2010).** Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sub-lethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10:1040-1049.

- Diplock A. T., Charleux J. L., Crozier-Willi G., Kok F. J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W. and Vina-Ribes J. (1998).** Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, 77-112.
- Djabou N., Muselli A., Allali H., Dib M. A., Tabti B., Varesi L. and Costa J. (2012).** Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83, 51-62.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J. F., Stocker P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224:801–809.
- Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C. (2006).** Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 95-100.
- Donnelly J. K. & Robinson D. S. (1990).** Oxygen radicals in living systems and in food. *Nutrition Bulletin*, 15(2):114-129.
- Doran A. L., Morden W. E., Dunn K. and Edwards-Jones V. (2009).** Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in Applied Microbiology*, 48:387-392.
- Dorman H. J. D. and Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- Dudareva N., Pichersky E. and Gershenzon J. (2004).** Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893-1902.
- Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J. K., and Kaplan I. (2013).** Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198: 16–32.
- Durackova Z. (2010).** Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiology Research*, 59, 459-469.
- Duthie S. J., Jenkinson A. McE., Crozier A., Mullen W., Pirie L., Kyle J., Yap L. S., Christen P., Duthie G. G. (2006).** The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45:113–122.
- Edris A. E. and Farrag E. S. (2003).** Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Food/Nahrung*, 47(2), 117-121.
- Eguren L., Perales A., Fayos J., Savona G., Mariapia-PaternGstro, Piozzi F. and Rodriguez B. (1981).** New Clerodane Diterpenoid from *Teucrium polium* subsp. *aureum*. X-ray Structure Determination. *Journal of Organic Chemistry*, 46, 3364-3367.

- Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. (2004).** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness, 48(7):79-487.
- El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Abderrahman A., Ismaili R. & Farah A. (2010).** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois, *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 157(2):285-294.
- Ennajjar M., Bouajila J., Lehiri A., Mathieu F., Abderraba M., Rayes A., Romdhane M. (2010).** Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils and Various Extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 462–470.
- El Bouzidi L., Jamali C. A., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A. (2013).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan Thymus species *Industrial Crops and Products*, 43450–456.
- El-Domiatty M. M., El-hafae A. M., and Abdel-Aal M. M. (1997).** *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 13.
- Elizabeth K. and Rao M. N. A. (1990).** Oxygen radical scavenging activity of curcumin, *International Journal of Pharmaceutics*. 58, 237–240.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherston, R.M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Elmasri W. A., Hegazy M-E. F., Aziz M., Koksal E., Amor W., Mechref Y., Hamood A. N., Cordes D. B. and Paré P. W. (2014).** Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103:107-113.
- El Oualidi J., Rascol J. P., Martin A. et Puech S. (1996).** Le Poliumoside marqueur chimique de la section Polium du genre *Teucrium* (Labiataea) à l'exception du *Teucrium mideltense* espèce endémique du Maroc. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 261 -272.
- El Oualidi J., Verneau O., Puech S., Dubuisson J. Y. (1999).** Utility of rDNA ITS sequences in the systematics of *Teucrium* section *Polium* (Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 215:49-70.
- El-Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J-M., Costa J., Paolini J. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49:533–536.
- El-Ouariachi E., Bouyanzer A., Salghi R., Hammouti B., Desjobert J-M., Costa J., aolini J., Majidi L. (2013).** Inhibition of corrosion of mild steel in 1 M HCl by the essential oil or solvent extracts of *Ptychotis verticillata*. *Research on Chemical Intermediates*, 41(2):935-946.

- El-Ouariachi E., Hamdania I., Bouyanzera A., Hammoutia B., Majidib L., Costac J., Paolinic J., Chetouani A. (2014).** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4) :281-286.
- Esmaeili M. A. and Yazdanparast R. (2004).** Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(1):27-30.
- Essawi T. & Srouf M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70:343-349.
- European Pharmacopeia.** European, Directorate for Quality of Medicines, Council of Europe, 6th edn. (Council of Europe, Strasbourg, 2007).
- Faleiro M. L., Miguel M. G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J. C. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35–40.
- Faleiro L., Miguel G., Gomes S., Costa L., Venâncio F., Teixeira A., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G. (2005).** Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 8162-8168.
- Faleiro M. L. (2011).** The mode of antibacterial action of essential oils. Vol. 2, 1143- 1156. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas (Ed.) Formatex Research Center, Badajoz, Spain.
- Fawcett J. R., Bordayo E. Z., Jackson K., Liu H., Peterson J., Svitak A., Frey W. H. (2002).** Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain Research*, 950:10–20.
- Felidj M., Bouazza M., Ferouani T. (2010).** Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (verticillata) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Rev. Geo-Eco-Trop.*, 34:147-154.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997).** Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416:123-9.
- Ferrer J. L., Austin M. B., Stewart Jr C. and Noel J. P. (2008).** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3): 356-370.
- Fertout-Mouri N., Latrèche A., Mehdadi Z., Toumi-Bénali F., Khaled M. B. (2016).** Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, Lavoisier, 1-8.

- Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G. and Scheffer J. J. C. (2008).** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 213-226.
- Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Scognamiglio M., D'Angelo G. and Monaco P. (2010).** Abeo-abietanes from *Teucrium polium* roots as protective factors against oxidative stress. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 8530-8536.
- Foti M. C. and Amorati R. (2009).** Non-phenolic radical-trapping antioxidants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 1435-1448.
- Fukuto T. R. (1990).** Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87:245-254.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898–904.
- Galstyan A. M., Shashkov A. S., Oganesyanyan G. B., Mnatsakanyan V. A., and Serebryakov E. P. (1992).** Structures of two new diterpenoids from *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 28(5):439-443.
- Galati E. M., Mondello M. R., D'Aquino A., Miceli N., Sanogo R., Tzakou O. and Monforte M. T. (2000).** Effects of *Teucrium divaricatum* Heldr. ssp. *Divaricatum* decoction on experimental ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72:337-742.
- Ghara A. R., Ghadi F.E. (2016).** *Advanced Bioresources*, 7, 76–83
- Gharaibeh M. N., Elayan H. H., Salhab A. S. (1988).** Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 24:93-99.
- Gharaibeh M. N., Elayan H. H., Salhab A. S. (1989).** Anorexic effect of *Teucrium polium* in rats. *International journal of crude drug research*, 27:201-207.
- Gianobini E. (2001).** Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease?. *Drugs Aging*, 18(12):891-8.
- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., & Holley R. A. (2002).** Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.
- Gioti E., Fiamegos Y., Skalkos D., Stalikas C. (2009).** Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 117(3): 398-404.
- Giordiani R., Hadeif Y., Kaloustina J. (2008).** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79, 199-203.

- Giweli A. A., D'zamic A. M., Sokovic M. D., Ristić M. S., Marin P. D. (2013).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Central European Journal of Botany*, 504-511.
- Gökbulut A. (2015).** Validated RP-HPLC Method for Quantification of Phenolic Compounds in Methanol Extracts of Aerial Parts and Roots of *Thymus sipyleus* and Evaluation of Antioxidant Potential. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (10): 1871-1877.
- Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerín C. (2009).** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116:982-989.
- Gorden M. H. (1990).** The mechanism of antioxidant action *in vitro*, In Food antioxidants, Hudson, B. J. F., Ed., Elsevier, Amsterdam. pp. 1-8.
- Gordon K.W., Lilienfeld S., and Gaens E. (2000).** Efficacy and safety of galanthamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomized controlled trial. *British Medical Journal*, 321:1445-1478.
- Gorham J. (1989).** Stilbenes and Phenanthrenes In Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1: Plant Phenolics; Harborne, J.B., Ed.; Academic Press: London, UK, 1989, pp. 159-196.
- Goulas V., Gomez-Caravaca A. M., Exarchou V., Gerothanassis I. P., Segura-Carretero A., Gutiérrez A. F. (2012).** Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 04-109.
- Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K. (2002).** Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14:77-91.
- Guesmi F., Ben Farhat M., Mejri M. and Landoulsi A. (2014).** In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp. *algeriensis*. *Lipids in Health and Disease*, 13:114.
- Gülçin İ., Oktay M., Küfrevioğlu Ö., Aslan A. (2002).** Determination of antioxidant activity of Lichen *Cetraria Islandica* (L) ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3): 325-329.
- Gülçin I. (2012).** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3):345-91.
- Güllüce M., Sökmen M., Daferera D., Açar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sökmen A., Sahin F. (2003).** In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3958-3965.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C. and Bourke P. (2009).** Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interaction with food components. *Food Microbiology*, 26(2):142-150.

- Gutiérrez-Grijalva E. P., Ambriz-Pérez D. L., Leyva-López N., Castillo-López R. I., Heredia J. B. (2016).** Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(2):1-14.
- Hachicha S. F., Skanji T., Barrek S., Ghrabi Z. G., Zarrouk H. (2007).** Composition of the essential oil of *Teucrium ramosissimum* Desf. (Lamiaceae) from Tunisia. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(2):101-104.
- Halliwell B., Murcia M. A., Chirico S. and Aruoma O. (1995).** Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1&2):7-20.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1998).** Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (1999).** Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford University Press.
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Hanifi N. (1991).** Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49.
- Hanson J. R. (2003).** Natural Products: The Secondary Metabolites (Tutorial Chemistry Texts), Royal Society of Chemistry, 149p.
- Harborne J. B. (1989).** Plant Phenolics. In: Methods in plant biochemistry, Dey P. M. & Harborne B. (Eds.), Academic press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers
- Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. (Eds.). (1999).** Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). London: Taylor & Francis.
- Harborne J. B. (1999).** Classes and functions of secondary products, in: N.J. Walton, D.E. Brown (Eds.), Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products, Imperial College Press, pp. 1–25.
- Harley R.M., Atkins S., Budantsev A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R., Harley M.M., De Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton A.J., Ryding O. & Upson T. (2004).** Labiatae. Pp. 196–203 in: Kubitzki, K., Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 8. Berlin: Springer.
- Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammadirad A., Dehghan G., Abdollahi M. (2007).** *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to a-tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, 57, 123–129.
- Hassan M. M., Muhtadi F. J. and Al Badr A. A., (1979).** GLC-mass spectrometry of *Teucrium polium* oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 800-801.

- Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A. R., ML Faleiro, Miguel M. G. (2009).** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*, 116 (3), 714-721.
- Hebert L. E., Scherr P. A. & Beckeff L. A. (1995).** Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population, *JAMA*, 273: 1354-1359.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10):572-584.
- Helander I. M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M., and von Wright A. (1998).** Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Herman A., Herman A. P., Domagalska B. W., Młynarczyk A. (2013).** Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2):232-237.
- Heywood V. H., Brummitt R. K., Culham A., Seberg O. (2007).** Lamiaceae: 179–181. In: Flowering Plant Families of the World. New York, NY, Firefly Books.
- Hili P., Evans C. S., Veness R. G. (1997).** Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 269-275.
- Hinneburg I., Dorman H. J. D. and Hiltunen R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chemistry*, 97, 122-129.
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1999).** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 937-942.
- Holley R. A. and Patel D. (2005).** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials *Food Microbiology*, 22:273–292.
- Hood J. R., Wilkinson J. M., Cavanagh H. M. A. (2003).** Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15:428-433.
- Houghton P. J., Ren Y. & Howes M. J. (2006).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports*, 23:181-199.
- Houmani Z., Azzoudj S., Naxakis G. & Skoula M. (2002).** The Essential Oil Composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9:275-280.
- Horwath A. B., Grayer R. J., Keith-Lucas D. M., & Simmonds M. S. J. (2008).** Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(2), 117-133.

- Horváth G., Jám bor N., Végh A., Böszörményi A., Lemberkovics E., Héthelyi E., Kovács K. and Kocsis B. (2010).** Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:178-182.
- Horváth G., Kocsis B., Lemberkovics É., Böszörményi A., Ott P. G. and Móricz Á. M. (2013).** Detection of antibacterial activity of essential oil components by TLC-bioautography using luminescent bacteria. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 26:114-118.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-56.
- Huang Y-J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A. S., Bellemare A., Cote M., Herskovits P., Touati M., Turcotte C., Valeanu, L., Lemee N., Wilgus H., Begin I., Bhatia, B., Rao K., Neveu N., Brochu E., Pierson J., Hockley D. K., Cerasoli D. M., Lenz D. E., Karatzas C. N. and Langermann S. (2007).** Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.*, 104(34):13603-13608.
- Huang D. F., Xu J. G., Liu J. X., Zhang H., Hu Q. P. (2014).** Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food related bacteria. *Microbiology*, 83:357-365.
- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. (2012).** Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3:12.
- Hyun T. K., Kim H. C. & Kim J. S. (2014).** Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Industrial Crop and Products*, 52:611-616.
- Imbimbo B. P. (2001).** Pharmacodynamic-tolerability relationships of cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 5(5):375-90.
- Ito N. and Hirose M. (1987).** The role of antioxidants in chemical carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research Gann*, 78, 1011-1026.
- Jaafari A., Mouse H.A., Rakib E., Mbarek L.A., Tilaoui M., Benbakhta C., Boulli A., Abbad A., Ziad A. (2007).** Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme, *Brazilian Journal of Pharmacology*, 17, 477-491.
- Jalas J. (1971).** Notes on *Thymus L.* (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 64, 199-215.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C. & Pezzuto J. M. (1997).** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Jayaprakasha G., Selvi T., & Sakariah K. (2003).** Antibacterial and antioxidant activities of grape *Vitis vinifera* seed extracts. *Food Research International*, 36, 117–122.

- Jayari A., El Abed N., Jouini A., Saed Abdul-Wahab O. M., Maaroufi A., Ben Hadj Ahmed S. (2017).** Antibacterial activity of *Thymus capitatus* and *Thymus algeriensis* essential oils against four food-borne pathogens inoculated in minced beef meat. *Journal of Food Safety*, 38:12409.
- Jiang L., Wang F., Han F., Prinyawiwatkul W., No H.K. and Ge B. (2012).** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *Journal of Applied Microbiology*.
- Johnson F. & Giulivi C. (2005).** Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (4-5): 340-52.
- Joje R. S., Walter-Ryan W. G., Alarcon R. D. & Lally K. M. (1985).** Cholinergic processes in blood samples from patients with major psychiatric disorders. *Biological Psychiatry*, 20:1258-1266.
- Jokanović M. (2009).** Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters*, 190, 107-115.
- Jørgensen H. J., Mathisen T., Løvseth A., Omoe K., Qvale K. S., Loncarevic S. (2005).** An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2):267–272.
- Jukic M. & Milos M. (2005).** Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta*, 78, 105–110.
- Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M., Milos M. (2007).** In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3):259-61.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994).** Factors that Interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76:626–631.
- Kabara, J. J. (1991).** Phenols and chelators. In *Food Preservatives*, eds Russell, N.J. and Gould, G.W. pp. 200-214. London: Blackie.
- Kabouche Z., Boutaghanea N., Laggounea S., Kabouchea A., Ait-Kakib Z., Benlabed K. (2005).** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3):129-133.
- Kabouche A., Touafek O., Nacer A., Kabouche Z. & Bruneau C. (2006).** Volatile Oil Constituents of *Teucrium atratum* Pomel from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18(2): 175-177.
- Kabouche A., Kabouche Z., Ghannadi A. & Sajjadi S. E. (2007).** Analysis of the Essential Oil of *Teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from Algeria, *Journal of Essential Oil Research*, 19:1, 44-46.

-
- Kalemba D. & Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10:813-29.
- Kandouz M., Alachkar A., Zhang L., Dekhil H., Chehna F., Yasmeen A. and Al Moustafa A. E. (2010).** Teucrium polium plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex. *Journal of Ethnopharmacology*, 129:410-415.
- Kaouache B., Brada M., Saadi A., Fauconnier M.-L., Lognay G., Heuskin S. (2017).** *Natural Product Communications*, 12, 1-4
- Kaplay S. S. (1976).** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain. *Biology of the Neonate*, 28:65–73.
- Karakaya S. (2004).** Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 2004; 44, 6; ProQuest Médical Library pg. 453.
- Kerbouche L., Hazzit M., Ferhat M-A, Baaliouamer A. & Miguel M. G. (2015).** Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of Teucrium polium subsp. capitatum (L.) Briq. and Origanum floribundum Munby, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18:5, 1197-1208.
- Khadraoui A., Khelifa A., Hachama K., Mehdaoui R. (2015).** Thymus algeriensis extract as a new eco-friendly corrosion inhibitor for 2024 aluminium alloy in 1 M HCl medium. *Journal of Molecular Liquids*.
- Khani A. & Heydarian M. (2014).** Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 956-961.
- Kim J., Marshal M. R., Wie C-I. (1995).** Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2839-2845.
- King A. & Young G., 1999.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99, 213–218.
- Kiokias S., Varzakas T., & Oreopoulou V. (2008).** In vitro activity of vitamins, flavanoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 78–93.
- Kivrak I., Duru M. E., Ozturk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu G. (2009).** Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, 116:470–479.
- Klein G., Rübén C., Upmann M. (2013).** Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*, 67:200-208.
- Knight J. A. (2000).** Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(2):145-158.
-

- Knowles J. R., Roller S., Murray D. B., Naidu A. S. (2005).** Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 797-803.
- Ko F. N., Hsiao G., Kuo Y. H. (1997).** Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 22:215–222.
- Köksal E., Ercan Bursal E., Gülçin I., Korkmaz M., Çağlayan C., Gören A. C., & Alwaseel S. H. (2017).** Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3): 514-525.
- Kolakowska A. (2003).** Lipid Oxidation in Food Systems. In : Chemical and functional properties of food lipids, Sikorski Z. E. and Kolakowska A. (eds.) CRC Press Boca Raton FL, pp133-160.
- Kolakowska A. & Bartosz G. (2014).** Oxidation of Food Components, 1-20. In: Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological, and Functional Properties, Bartosz G. (ed.), Taylor & Francis Group, 550p.
- Krayni H., Fakhfakh N., Aloui L., Zouari N., Kossentini M., Zouari S. (2015).** Chemical composition and chelating activity of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) essential oil as influenced by phenological stages and plant organs. *Journal of Essential Oil Research*, 27, 514–520.
- Krinsky N. I. (1998).** The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854:443-447.
- Kuete V., Azebaze A. G., Mbaveng A., Nguemfo E. L., Tshikalange E. T., Chalard P., Nkengfack A. E. (2011).** Antioxidant, antitumor and antimicrobial activities of the crude extract and compounds of the root bark of *Allanblackia floribunda*. *Pharmaceutical Biology*, 49(1):57-65.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. (2004).** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85:633-640.
- Kulišić T., Dragović-Uzelac V., & Miloš M. (2006).** Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*, 44(4), 485–492.
- Kunicka-Styczynska A., Sikora M. and Kalemba D. (2009).** Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*, 107:1903–1911.
- Kwasnieski O. (2010).** Etude théorique de la réactivation de l’AChE inhibée par le tabun. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français.

- Labiad M.H., Harhar H., Ghanimi A., Tabyaoui M. (2017).** Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Moroccan *Thymus satureioides* Extracts. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(6):2132-2139
- Laguerre M., Lecomte J., & Villeneuve P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–282.
- Laguerre M., López-giraldo L. J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL*, 14 (5):278-292.
- Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., & Boskou D. (1993).** Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown in Greece. *Z. Lebensmitt. Unters. Forsch*, 197, 20–23.
- Lagouri V. & Boskou D. (1995).** Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. *Developments in Food Science*, 37:869-879.
- Lamaison J. L. C. et Carnet A. (1990).** Teneurs en Principaux Flavonoides des Fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, 65, 315-320.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. A. (2001).** Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.
- Lane R. M., Potkin S. G. & Enz A. (2006).** Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9 (1):101-24.
- Langcake P. & Pryce R. J. (1977).** The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16, 1193-1196.
- Laouer H., Zerroug M. M., Sahli F., Chaker A. N., Valentini G., Ferretti G., Grande M. & Anaya J. (2003).** Composition and Antimicrobial Activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2):135-138.
- Laouer H., Zerroug M. M., Chaker A. N., Bouzerzour H. (2004).** Study of the effect of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breist, essential oil against *Pseudomonas* sp. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 69(4):619-24.
- Louaar S., Akkal S., Bayet C., Laouer H. and Guilet D. (2008).** Flavonoids of aerial parts of an endemic species of the apiaceae of Algeria, *Ammoides atlantica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(4):516-517.
- La Storia A., Ercolini D., Marinello F., Di Pasqua R., Villani F., Mauriello G. (2011).** Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol- treated bacterial cells. *Research in Microbiology*, 162:164–172.

- Le Loir Y., Baron F., Gautier M. (2003).** Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1):7-28.
- Lekehal M., Pessayre D., Lereau J. M., Moulis C., Fouraste I. & Fau D. (1996).** Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton - associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. *Hepatology*, 24:212-218.
- Lichtenthaler H. K., Rohmer M. & Schwender J. (1997).** Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia plantarum*, 101(3), 643-652.
- Ljubuncic P., Dakwar S., Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H. and Bomzon A. (2006).** Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 3:329-338.
- Le Floch E. (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (ed), Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, 402.
- Le Floch E. & Boulos L. (2008).** Flore de la Tunisie. Catalogue Synonymique Commenté, Montpellier, p 461.
- Leger C. (2006).** Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *Ol Corps Gras Lipides*, 13:59-69.
- Leong L. P. & Shui G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- Li B., Stribley J. A., Ticu Xie W., Schopfer L. M., Hammond P., Brimijoin S., Hinrichs S. H. and Lockridge O. (2000).** Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, 75:1320-1331.
- Li Y., Fabiano-Tixier A-S., Chemat F. (2014).** Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Springer briefs in molecular science, Green chemistry for sustainability, p71.
- Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z., Xing B., Li X., Kong M., Li L., Zhang Q., Liu Y., Chen H., Qin W., Wu H. and Chen S. (2016).** An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*, 21, 1374.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., & Chandra N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8):118-126.
- Loizzo M. R., Tundis R., Menichini F. & Menichini F. (2008).** Occurring natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 15:1209-1228.

- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005).** Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939–6946.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2007a).** Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8814–8824.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2007b).** Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348–4356.
- Mabberley D. J. (1997).** The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mabile L., Piolot A., Boulet L., Fortin L. J., Doyle N., Rodriguez C., Davignon J., Blache D., Lussier-Cacan S. (2001).** Moderate intake of n-3 fatty acids is associated with stable erythrocyte resistance to oxidative stress in hypertriglyceridemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74:449–456.
- Mabona U., Viljoen A., Shikanga E., Marston A., Van Vuuren S. (2013).** Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1):45-55.
- Maccioni A. M., Anchisi C., Sannay A., Sarduy C. and Dessi S. (2002).** Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 24, 53-59.
- Mahmoudi R. and Nosratpour S. (2013).** *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *International Food Research Journal*, 20(4): 1697-1701.
- Malakov P. Y. & Papanov G. Y. (1983).** Furanoid diterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 22, 2791-2793.
- Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M. J. and Barel A. O. (1998).** Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 368-376.
- Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. and Fritsch P. (2004).** Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. *Médecine/sciences*, 20:458-463.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187–195.

Marković, T., 2011. In: Pančić, J. (Ed.), Essential oils and their safe use. Institute of Medicinal Plant Research, Belgrade, ISBN 978-86-83141-14-2, pp. 1–289.

Marston A. and Hostettmann K (1999). Biological and chemical evaluation of plant extracts and subsequent isolation strategy, 67-80. In: L. Bohlin et al. (eds.), Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development, Kluwer Academic Publishers.

Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. & Vallette, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31-91.

Mattei A., Rucay P., Samuel D., Feray C., Reynes M. & Bismuth H (1995). Liver transplantation for severe acute liver failure after herbal medicine (*Teucrium polium*) administration. *Journal of Hepatology*, 22: 597.

Magalhães A. S., Silva B. M., Pereira JA, Andrade PB, Valentao P, Carvalho M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chemical Toxicology*, 47:1372-7.

Mata A. T., Proenca C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F. and Araujo M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103: 778-786.

Mattei A., Rucay P., Samuel D., Feray C., Reynes M. & Bismuth H (1995). Liver transplantation for severe acute liver failure after herbal medicine (*Teucrium polium*) administration. *Journal of Hepatology*, 22: 597.

Megdiche-Ksouri W., Saada M., Soumaya B., Snoussi M., Zaouali Y., Ksouri R. (2015). Potential use of wild *Thymus algeriensis* and *Thymus capitatus* as source of antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 23(4):1046-1056.

Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F. (2009a). Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium essential* oils from Greece. *Food Chemistry*, 115:679–686.

Menichini F., Tundis R., Loizzo M. R., Bonesi M., Marrelli M., Statti G. A., Menichini F., Conforti F. (2009b). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia*, 80:297-300.

Meyer A. S. & Isaksen A. (1995). Application of enzymes as food antioxidants. *Trends Food Science and Technology*, 6: 300-304.

Michel F., Bonnefont-Rousselot D., Mas E., Drai J. & Thérond P. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique*, 66(6):605-20.

Mikio, Y. and Taeko, U. (1962). Biosynthesis of thymol. *Chem Pharmaceu. Bull*, 10: 71-72.

- Milos M. & Makota D. (2012).** Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*, 131:296–299.
- Miron T. L., Plaza M., Bahrim G., Ibáñez E., & Herrero M. (2011).** Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4918–4927.
- Mitić V., Jovanović O., Stankov-Jovanović V., Zlatkovic B. & Stojanovic G. (2012).** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *capitatum* from the Balkan Peninsula. *Natural Product Communications*, 7(1):83-6.
- Moghaddam M. and Mehdizadeh L. (2017).** Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. 379-419. In: *Soft Chemistry and Food Fermentation. Handbook of Food Bioengineering, Volume 3*, Grumezescu A. M. & Holban A. M. (eds.), Academic Press is an imprint of Elsevier, 521p.
- Mondello F., Girolamo A., Scaturro M., Ricci M. L. (2009).** Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 77:243-248.
- Morales R. (1996).** Studies on the genus *Thymus* L. Lamiales. Newsletter 4, 6–8.
- Morales R. (1997).** Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19, 249-262.
- Morales R. (2002).** The history, botany and taxonomy of genus *Thymus*. In: *Thyme—the genus Thyme*, Stahl-Biskup E. & Sàez F., 2002, Taylor and Francis, London, 331p.
- Morello M. J., Shahidi F., and Ho C-T. (2002).** Free Radicals in Foods: Chemistry, Nutrition, and Health Effects. In *Free Radicals in Food*, Morello, M., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- Mourey A. & Canillac N. (2002).** Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13:289–292.
- Canillac N. & Mourey A. (2004).** Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. *International Journal of Food Microbiology*, 92:95–103.
- Miyazawa M. & Yamafuji C. (2005).** Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1765-8.
- Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhkala A. R. & Benhura M. A. N. (2007).** Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, 2, 414-420.

- Mukherjee P. K., Kumarb V., Mal M., Houghton P. J. (2007).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4):289-300.
- Nabavi S. F., Nabavi S. M., Setzer W. N., Nabavi S. A., Nabavi S. A., Ebrahimzadeh M. A. (2013).** Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, vol. 68 (3) :185-193.
- Naghdi-Badi H., Yazdani D., Mohammad Ali S., Nazari F. (2004).** Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19, 231–236.
- Nasiri N., Shamkhani H., Ghelichpour Z., Mohammadi M. A., Sonboli A. (2017).** Essential oil constituents of the aerial parts and root of *Cymbocarpum anethoides* (Apiaceae) from Iran. *Natural Product Research*, 31(8):980-983.
- Navarro T. & El Oualidi J. (2000).** Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae) A taxonomic review. *Anales Jardin Botanico De Madrid*, 57(2):277–297.
- NCCLS (2006).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, NCCLS document M7-A7, Wayne, USA.
- Ng T. B., Liu F., Wang Z. (2000).** Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science*, 66, 709–723.
- Nickavar B & Esbati N. (2012).** Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5(3):119-125.
- Nikolić M. J., Glamoclija I. C. F. R., Ferreira R. C., Calhelha Â., Fernandes T., Marković D., Marković A., Giweli M. & Soković, M. (2014).** Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379-384.
- Nurtjahja-Tjendraputra E., Ammit A. J., Roufogalis B. D., Tran V. H., Duke C. C. (2003).** Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thrombosis Research*, 111(4-5):259-265.
- Oganesyan G. B., Galstyan A. M., Mnatsakanyan V. A., Shashkov A. S., Agababyan P. V. (1991).** Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(5):556–559.
- Olthof M. R., Hollman P. C. H., Katan M. B. (2001).** Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 66-71.

- Orchard A. and van Vuuren S. (2017).** Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-93.
- Orhan I., Sener B., Choudhary M.I., Khalid A. (2004).** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 57-60.
- Orellana M. R., Rovira A. M., Blanché C., Bosch M. (2005).** Pollination and reproductive success in the gynodioecious endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 83:183-193.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozenda P. (2004).** Flore et végétation du Sahara. Paris, France, CNRS éditions, 662 pages.
- Özgen M., Reese R.N., Tulio A.Z., Scheerens J.C., Miller A.R (2006).** Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4):1151-1157.
- Özgen U., Mavi A., Terzi Z., Kazaz C., Asci A., Kaya Y., Secen H. (2011).** Relationship between chemical structure and antioxidant activity of luteolin and its glycosides isolated from *Thymus sipyleus* subsp *sipyleus* var. *sipyleus*. *Records of Natural Products*, 5:12-21.
- Özguven, M. and Tansi, S. (1998).** Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as in influenced by ecological and ontogenetical variation, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22:537-542.
- Ozturk M. (2012).** Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chem.*, 134, 48-54.
- Özyürek M., Güçlü K., Tutem E., Sozgen Basxkan K., Ercag E., Celik E. S., Baki S., Yıldız L., Karaman S. and Apak R. (2011).** A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3, 2439-2453.
- Pacifico S., D'Abrosca B., Scognamiglio M., D'Angelo G., Gallicchio M., Galasso S., Monaco P., Fiorentino A. (2012).** NMR-based metabolic profiling and *in vitro* antioxidant and hepatotoxic assessment of partially purified fractions from Golden germander (*Teucrium polium* L.) methanolic extract. *Food Chemistry*, 135, 1957–1967.
- Panovska T. K. and Kulevanova S. (2005).** Effect of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*) on lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Fresenius Environmental Bulletin*, 14, 957–959.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J. and Codina C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six

distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6882-6890.

Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S. Bianchi M. and Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133:2812-2819.

Pereira O. R., Peres A. M., Silva Artur M.S., Domingues M. R.M., Cardoso S. M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International*, 54 :1773–1780.

Perry N. S. L., Houghton P. J., Theobald A., Jenner P., Perry EK. (2000). *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52:895-902.

Pin-Der Duh X. (1998). Antioxidant activity of Burdock (*Arctium lappa* Linn.): Its scavenging effect on free radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 455-461.

Pisoschi A. M., Cheregi M. C. and Danet A. F. (2009). Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*, 14: 480-493.

Pichersky E., Noel J. P. and Dudareva N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, 808–811.

Pohanka M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical papers*, 155 :219–229.

Pohanka M. (2014). Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 9809-9825.

Pokorný J. (2003). In: Zuthen P., Bogh-Sørensen L. (eds): Food Preservation Techniques. Woodhead Publ., Cambridge, UK.

Porter L. J. (1989). Tannins. In : J. B. Harborne (Ed.), Methods in plant biochemistry: Vol. 1. Plant phenolics (pp. 389–419). London: Academic Press.

Polymeros D., Kamberoglou D., Tzias V. (2002). Acute cholestatic hepatitis caused by *Teucrium polium* (golden germander) with transient appearance of antimitochondrial antibody. *J. Clin. Gastroenterol.*, 34: 100-101.

Pope C., Karanth S., Liu J. (2005). Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3):433-346.

Pottier-Alapetite G. (1981). Flore de la Tunisie (Angiospermes-Dicotylédones). Publications

Scientifiques Tunisiennes, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Ministère de l'Agriculture, Tunis.

Prabuseenivasan S., Jayakumar M. and Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39.

Prasad K. N., Yang B., Dong X., Jiang G., Zhang H., Xie H., Jiang Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4):627-632.

Purnavab S., Ketabchi S. & Rowshan V. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian *Teucrium polium* against some of phyto-bacteria. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 29(14):1376-9.

Quezel P. and Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et II, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1170.

Racchi M., Mazzucchelli M., Porrello E., Lanni C., Govoni S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, 50: 441-451.

Raei F., Ashoori N., Eftekhar F., Yousefzadi M. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Teucrium polium* essential oil against urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Essential Oil Research*, 26:1, 65-69.

Rahali N., Mehdi S., Younsi F., Boussaid M. & Messaoud C. (2017). Antioxidant, α -amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation, *International Journal of Food Properties*, 20:sup2, 1637-1651.

Ramassamy C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1):51-64.

Ramchoun M., Sellam K., Harnafi H., Alem C., Benlyas M., Khallouki F., Amrani S. (2015). Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2): 93-100.

Rankou H., Ouhammou A., Taleb M. & Martin G. (2015). *Ammoides pusilla*. The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

Rasekh H. R., Khoshnood M. J., Kamalinejad M. (2001). Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, 72, pp. 937-939.

- Rasooli I., Rezaei M. B., Allameli A. (2006).** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10: 236-241.
- Rattanachaikunsopon P. & Phumkhachorn P. (2010).** Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholera* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110:614-619.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rehman R., Hanif M. A., Mushtaq Z. & Al-Sadi A. M. (2015).** Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A Review. *Food Reviews International*, 32(2):117-160.
- Rehman R, Hanif M. A., Mushtaq Z., Mochona B., Qi. X. (2016).** Biosynthetic Factories of Essential Oils: The Aromatic Plants. *Natural Products Chemistry and Research*, 4: 227.
- Rhee K., Van de Meent M., Ingkaninan K, Verpoorte R. (2001).** Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915, 217-223.
- Rice-Evans C., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B. (1995).** The relative antioxidant of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Ríos J. L. and Recio M. C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80–84.
- Rizk A. M., Hammouda F. M., Rimpler H. and Kamel A. (1986).** Tridoids and flavonoids of *Teucrium polium* herb. *Planta Medica*, 2, 87-88.
- Robbins R. J. (2003).** Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 2866-2887.
- Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. H., Khalel K. I. (2013).** Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43:827–831.
- Rodriguez A., Batlle R., & Nerin C. (2007).** The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, 60, 33–38.
- Rodriguez A., Nerin C., & Batlle R. (2008).** New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6364–6369.
- Ruiz J. M. and Romero L. (2001).** Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 25:651-681.

- Saad N. Y., Muller C. D. and Lobstein A. (2013).** Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 269–279.
- Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadib M. H. (2014).** Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54:130-134.
- Salaris S. C., Babbs, C. F., Voorhees W. D. I. (1991).** Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. *Biochemical Pharmacology*, 42, 499-506.
- Safaei-Ghomi J., Ebrahimabadi A. H., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H. (2009).** GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115, 1524–1528.
- Sahreen S., Khan M., Khan R. (2010).** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa Opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122(4):1205–11.
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A. & Saura-Calixto F. (1999).** Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1301-1304.
- Sangwan N. S., Farooqi A. H. A., Shabih F. et al (2001).** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34:3-21.
- Salie F., Eagles P. F. K., Lens H. M. J. (1996).** Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(1): 27-33.
- Sarac N. and Ugur A. (2007).** Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4:28–37.
- Sarer E. and Konuklugil B. (1987).** Investigation of the volatile oil of *Teucrium polium* L. *Doga Turk Tip ve Ecz. D.*, 11, 317-325.
- Sarikurkcü C., Zengin G., Oskayc M., Uysal S., Ramazan Ceylan R. and Aktumsek A. (2015).** Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178–184.
- Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M. C. T., Rehder V. L. G. (2004).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:275-280.
- Savelev S. U., Okello E. J. and Perry E. K. (2004).** Butyryl- and Acetyl-cholinesterase Inhibitory Activities in Essential Oils of *Salvia* Species and Their Constituents. *Phytotherapy research*, 18, 315–324.
- Savvidou S., Goulis J., Giavazis I., Patsiaoura K., Hytiroglou P. & Arvanitakis C. (2007).** Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(6):507-511.

-
- Scalbert A. & Williamson G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl):2073S-85S.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. & Jimenez L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.
- Sharma S. & Ebadi M. (2014).** Antioxidants as Potential Therapeutics in Neurodegeneration. In: Laher (ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, p. 2191-2273.
- Schmeller T., Latz-Bruning B. & Wink M. (1997).** Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44: 257-266.
- Schmourlo G., Mendonca-Filho R. R., Alviano C. S., Costa S. S. (2004).** Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3):563- 568.
- Schneider L. J. (2001).** Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Clinics in Geriatric Medicine*, 17: 337- 339.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R. and Lewinsohn E. (2008).** Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732.
- Sell C. (2010).** The chemistry of essential oils. Chap.5, 121-150. In: Baser C. K. H. & Buchbauer G. (eds) *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 291p.
- Senatore F, Napolitano F, Ozcan M. (2000).** Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15:186-189.
- Sesso H. D., Gaziano J. M., Liu S, Buring J. E.. (2003).** Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 1400-1408.
- Shahidi F., Janitha P. K., and Wanasundara P. D. (1992).** Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahidi F. & Naczki M. (2004).** Phenolics in food and nutraceuticals (pp. 1-558). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shahidi F. & Ho C-T. (2005).** Phenolics in Food and Natural Health Products: An Overview. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1-8.
- Shahidi F. and Zhong Y. (2010a).** Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 930-940.
- Shahidi F. and Zhong Y. (2010b).** Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39, 4067-4079.
-

- Shahidi F. (2015).** Antioxidants: Principles and applications. In F. Shahidi (Ed.), Handbook of antioxidants for food preservation (pp. 1–14). Fereidoon Shahidi (Ed.), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 276, Cambridge, UK.
- Shahidi F. and Ambigaipalan P. (2015).** Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of functional foods*. 1-78.
- Shankar S., Singh G. & Srivastava R. K. (2007).** Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in Bioscience*, 12, 4839-4854.
- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. (2009).** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112:885-8.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T. (1992).** Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945–948.
- Schubert S. Y., Lansky E. P., Neeman I. (1999).** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1):11-17.
- Siems WG, Grune T, Esterbauer H. (1995).** 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Science*, 57(8):785–9.
- Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269 (11):8022–8.
- Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59(2):201-22.
- Silva N. C. C. and Fernandes Júnior A. (2010).** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16 (3), 402-413.
- Silver A. (1974).** The biology of cholinesterases. Elsevier/Agricultural Research Council Institute; New York: p. 426-47.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Sonmezdag A. S., Kelebek H. & Selli S. (2016).** Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4):1957–1965.
- Souhail N., Sifaoui I., Ben Hassine D., Bleton J., Bonose M., Moussa F., Pinero José.E., Lorenzo-Morales J., Abderrabba M. (2017).** *Ammoides pusilla* (Apiaceae) essential oil: Activity against *Acanthamoeba castellanii* Neff, *Experimental Parasitology*.

-
- Sramek J. J. & Cutler N. R. (2000).** Ongoing trials in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9:899-915.
- Sramek J. J., Zarotsky V., and Cutler N. R. (2002).** Review of drug development and therapeutic role of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Drug Development Research*, 56:347–353.
- Stadtman E. R. (2004).** Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1105–1112.
- Stankovic M. S., Niciforovic N., Mihailovic V., Topuzovic M., Solujic S. (2012).** Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *Polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*.
- Stahl-Biskup E. & Saez F. (2002).** Thyme. London (UK), Taylor & Francis.
- Stefkov G., Kulevanova S., Miova B., Dinevska-Kjovkarovska S. Mølgaard P., Jäger A. K., and Josefsen K. (2011).** Effects of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharmaceutical Biology*, 49(9): 885-892.
- Štěpánková S. and Komers K. (2008).** Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*, 4(4):160 –171.
- Su L., Yin J-J., Charles D., Zhou K., Moore J., Yu L. L. (2007).** Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg-rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*, 100:990–997.
- Suelmassi A. (1991).** Les plantes médicinales du Maroc. Deuxième édition. Casablanca, Maroc.
- Suleiman M. S., Abdul-Ghani A. S., Al-Khali S., Amin R. (1998).** Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. *Journal of Ethnopharmacology*, 22:111-116.
- Svoboda K. P. and Svoboda T. G. (2000).** Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Polly M. Syred (ed.). Microscopix publications Middle Travelly, Beguildy, Knighton. Powys LD7 IUW. U.K.
- Szwajgier D. (2013).** Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. *Z Naturforsch C.*, 68(3-4):125-132.
- Tai K., Shen T., Henchman R. H., Bourne Y., Marchot P., McCammon J. A. (2002).** Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *Journal of the American Chemical Society*, 124:6153-6161.
- Tarayre M. and Thompson J. D. (2002).** Populations genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. (Labiatae) in southern France. *Journal of Evolutionary Biology*, 10: 157-174.
-

- Tariq M., Ageel A. M., al-Yahya M. A., Mossa J. S., al-Said M. S. (1989).** Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. *International journal of tissue reactions*, 11:185-185.
- Tedone L., D'andrea L., & Marzi V. (2001).** Caratterizzazione biomorfologica e valutazione agronomica di specie e popolazioni di timo (*Thymus* spp.) nell'area mediterranea. In: Atti del VI Convegno delle Biodiversità, Valenzano, 6 settembre. pp. 1134-1142.
- Tefiani C., Riazi A., Youcefi F., Aazza S., Gago C., Faleiro M.L., Pedro L.G., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Megías C., Cortés-Giraldo I., Vioque J. & Miguel M.G. (2015).** *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research*, 27(2):131-139.
- Tefiani C., Riazi A., Belbachir B., Lahmar H., Aazza S., Figueiredo A. C., Miguel M. G. (2016).** *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. from Algeria: Effect of harvesting place and plant part (leaves and flowers) on the essential oils chemical composition and antioxidant activity. *Open Chemistry*, 14: 343–350.
- Tel G., Oztürk M., Duru M. E., Harmandar M., Topçu G. (2010).** Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11):3189-93.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333–340.
- Tepe B., Degerli S, Arslan S, Malatyali E., Sarikurkcu C. (2011).** Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82, 237–246.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L and Byrne DH (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669–675.
- Tholl D. (2015).** Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148:63-106.
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. (2010).** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17, 142–145.
- Toubal O., Djahoudi A., Henchiri C. (2011).** Phytochemical study and antimicrobial activity of *Ammoides verticillata*, an Algerian endemic species. *Current Opinion in Biotechnology* v.22:143.

- Tōugu V. (2001).** Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Curr. Med. Chem. Central Nervous System Agents*, 1:155-170.
- Trabut L. (1935).** Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. Collection du Centenaire de l'Algérie, Algérie.
- Trombetta D., Casteli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. and Bisignano G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (6):2474–2478.
- Tsao R. (2010).** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Tung Y., Wu J., Hsieh C., Chen P., and Chang S. (2009).** Free radical-scavenging phytochemicals of hot water extracts of *Acacia confusa* leaves detected by an on-line screening method. *Food Chemistry*, 115, 1019-1024.
- Tundis R., Loizzo M. R., Bonesi M., Menichini F., Mastellone V., Colica C., Menichini F., (2012).** Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. Peel Essential Oils. *Journal of Food Science*, 71(1), 40-46.
- Tuppo E.E. & Forman L. J. (2001).** Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 101, 11–15
- Turina A. V., Nolan M. V., Zygadlo J. A., Perillo M. A. (2006).** Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122(2): 101-113.
- Turgis M., Han J., Caillet S., Lacroix M. (2009).** Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20:1073–1079.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., & Webb D. A. (1976).** *Flora Europaea* (Vol. 3). Cambridge: Cambridge University Press. pp. 129–135.
- Twaij H. A. A., Albadr A. A. and Abul-Khail A. (1987).** Anti-Ulcer Activity of *Teucrium polium*. *International journal of crude drug research*, 25(2):125-128.
- Tzima K., Brunton N. P., and Rai D. K. (2018).** Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in Lamiaceae Plants—A Review. *Plants*, 7, 25.
- Umeh E. U., Oluma H. O. A., Igoli O. (2005).** Antibacterial screening of four local plants using an indicator-based microdilution technique. *Afr. J. Tradit. Complement. Alternat. Med.* 2(3): 238-243.
- Ultee A., Kets E. P. W. and Smid E. J. (1999).** Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606-4610.

- Ultee A., Slump R.A., Steging G., Smid J. (2000).** Antibacterial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63 (5), 620-624.
- Ultee A., Bennink M. H. J., Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1561–1568.
- Uttara B., Singh A. V., Zamboni P., and Mahajan R. T. (2009).** Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current neuropharmacology*, 7(1): 65–74.
- Vahdani M., Faridi P., Zarshenas M., Javadpour S., Abolhassanzadeh Z., Moradid N., Bakzadehb Z., Karmostaj A., Mohagheghzadeh A. & Ghasemi Y. (2011).** Major Compounds and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Five Iranian Endemic Medicinal Plants. *Pharmacognosy Journal*, 3(22):1-6.
- Vale A. & Lotti M. (2015).** Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. Handbook of Clinical Neurology, 131:149-168. Occupational Neurology M. Lotti and M.L. Bleecker, Editors.
- Verma N. & Shukla S. (2015).** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2, 105–113.
- Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S. L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarlu K., Deepak M. (2007).** Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2):359-63.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1):1-40.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T.D., Mazura M., Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Vagi E., Simandi B., Suhajda A., Héthelyi E. (2005).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38:51-57.
- Velasco-Negueruela A. & Pérez-Alonso M.J. (1990).** The volatiles of six *Teucrium* species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Phytochemistry*, 29(4):1165-1169.
- Velderrain-Rodriguez G. R., Palafox-Carlos H., Wall-Medrano A., Ayala- Zavala J. F., Chen C-Y. O., Robles-Sanchez M., Astiazaran-Garcia H., Alvarez-Parrilla E. and Gonzalez-Aguilar G. A. (2014).** Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Function*, 5, 189.

- Verykokidov-Vistsaropoulou, E. and C. Vijias. 1986.** Methylated flavones from *Teucrium polium*. *Planta Medica*, 5:401-402.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011).** Spices as functional foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 51(1), 13-28.
- Vladimir-Knezević S., Kosalec I., Babac M., Petrović M., Ralić J., Matica B., & Blazeković B. (2012).** Antimicrobial activity of *Thymus longicaulis* C. Presl essential oil against respiratory pathogens. *Central European Journal of Biology*, 7, 1109-1115.
- Vokou D. & Bessiere J-M. (1984).** Volatile constituents of *Teuclrum polium*. *Journal of Natural Products*, 48(3):498-499.
- Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartolo R.G. (2003).** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94:240–247.
- Wanasundara P. K. J. P. D. and Shahidi F. (2005).** Antioxidants: Science, Technology, and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.
- Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P. X., Dixon R. A. (2008)** Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol.*, 148: 1254-1266.
- Wassel M. and Ahmed S.S. (1974).** On the Essential Oil of *Teucrium polium*. *Pharmazie*, 29, 351-352.
- Watkins P. B., Zimmerman H. J., Knapp M. J., Gracon S. I. and Lewis K. W. (1994).** Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association*, 271:992-998.
- Weiss E. A. (1997).** Essential oil crops. Cab International, Eastbourne, 600p.
- Weisshaar B. and Jenkins G. (1998).** Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:251-257.
- Wichtl M. et Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique Lavoisier Tech & Doc, Paris, p XXIX (636p).
- Williams G. M., Iatropoulos M. J., Whysner J. (1999).** Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37:1027–1038.
- Wilkinson J.M. (2006).** Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts, 157-171. In : Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Edited by Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil, and Mohammad Owais, 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 384p.
- Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. (2008).** Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of animal science*, 86:140-148.

- Wojcik M., Burzynska-Pedziwiatr I. and Wozniak L. A. (2010).** A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 3262-3288.
- Wood L.G., Gibson, P.G., Garg M.L. (2006).** A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 86, 2057–2066.
- Xu J., Zhou F., Ji B.P., Pei R.S., Xu N. (2008).** The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47:174-179.
- Yamaura, T., Tanaka, S. and Tabata, M. (1992).** Localization of the biosynthesis and accumulation of monoterpenoids in glandular trichomes of thyme. *Planta Medica*, 58: 153-158.
- Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., & Terao J. (1998).** HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 1201–1204.
- Yang C. S., Landau J. M., Huang M. T. and Newmark H. L. (2001).** Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 381–406.
- Yanishlieva N. V., Marinova E. M., Gordon M. H., Raneva V. G. (1999).** Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59-66.
- Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R., and Chen S. S. (2004).** Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122.
- Yatagai M., Ohira M., Ohira T., Naga S. (1995).** Seasonal variations of terpene emission from trees and influence of temperature, light and contact stimulation on terpene emission. *Chemosphere*, 30 (6):1137-1 149.
- Youdim K.A., Shukitt-Hale B., MacKinnon S., Kalt W., Joseph J. A. (2000).** Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 117–122.
- You K.M., Jong H., Kim H.P. (1999).** Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated methoxylated flavonoids isolated from the several medicinal plants. *Archives of Pharmacal Research*, 22, 18–24.
- Yildirim A., Mavi A., and Kara A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
- Yuan Y., Huang M., Pang Y-X., Yu F-L., Chen C., Liu L-W., Chen Z-X., Zhang Y-B., Chen X.-L. and Hu X. (2016).** Variations in Essential Oil Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at Different Growth Times. *Molecules*, 21, 1024.

- Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub H. and Gharsallah N. (2011).** The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of Marrubium vulgare L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 10:161.
- Zarotsky V., Sramek J. J., Cutler N. R. (2003).** Galanthamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am J Health-System Pharmacist* 60: 446-452.
- Zarzuelo A. & Crespo, E. (2002).** The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In : Stahl-Biskup, E., Saez, F. (Eds.), Thyme. The Genus Thymus. Taylor and Francis, London, pp. 263-292.
- Zerroug M. M., Laouer H., Strange R. N., Nicklin J. (2010).** The effect of essential oil of *Ammoides pusilla* (brot.) breistr on the growth and the production of solanapyrone a by *Ascochyta rabiei*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 75(4):721-4.
- Zhang A., Zhu Q. Y., Luk Y. S., Ho K. Y., Fung K. P., Chen Z-Y. (1997).** Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Science*, 61(4):383-394.
- Zheng W. and Wang S. Y. (2001).** Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.
- Zhu L., Gunn C. and Beckman J. S. (1992).** Bactericidal activity of peroxy nitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298, 452-457.
- Zhu Q. Y., Holt R. R., Lazarus S. A., Orozco T.J., Keen C.L. (2002).** Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 321–329.
- Zhu Q. Y., Schramm D. D., Gross H. G., Holt R. A., Kim S. H., Yamaguchi T., Kwik-Urbe C. L., & Keen C. L. (2005).** Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1):27-34.
- Ziani B. E.C., Heleno S. A., Bachari K., Dias M. I., Alves M. J., Barros L., Ferreira C.F.R I. (2018).** Phenolic compounds characterization by LC-DAD- ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*.
- Zinoviadou K. G., Koutsoumanis K. P., Biliaderis C. G. (2009).** Physico-Chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82:338-345.
- Zou C-G., Agar N. S., Jones G. L (2001).** Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences*, 69, 75–86.

Zou Y., Lu Y., Wei D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16):5032-5039.

Zouari N., Fakhfakh N., Zouarid S., Bougatef A., Karraya A., Neffati M., Ayadi M. A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 257-265.

Zouari N., Ayadi I., Fakhfakh N., Rebai A. and Zouari S. (2012). Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic Species. *Lipids in Health and Disease*, 11:28.

Zuzarte M. and Salgueiro L. (2015). Essential Oils Chemistry. In: de Sousa D.P. (ed.), *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer, Switzerland, pp 19-61.

Annexes

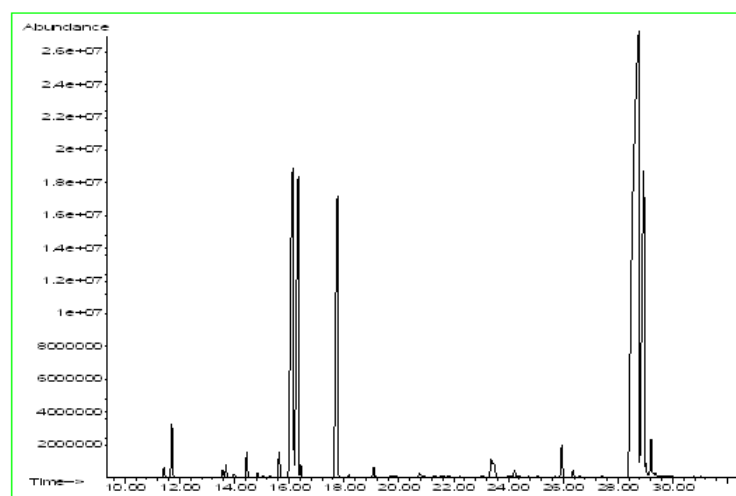
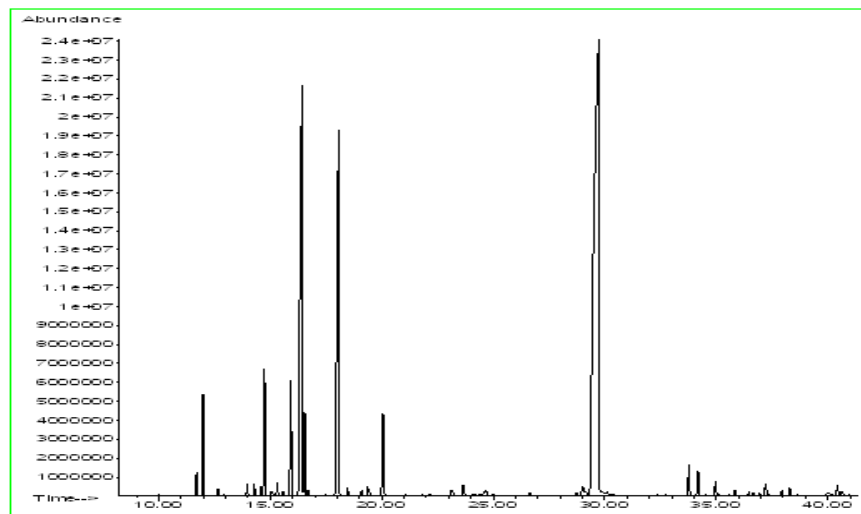
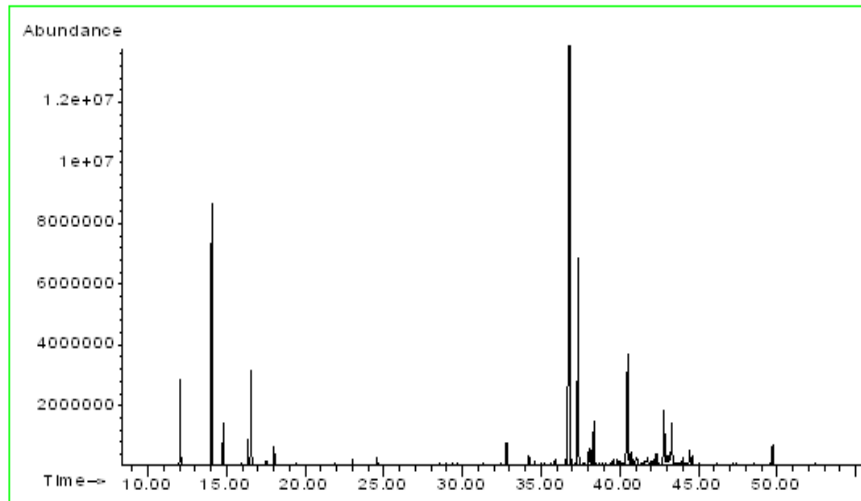


Figure 1. Chromatogramme (GC-MS) des huiles essentielles de *Teucrium polium* subsp *capitatum*, de *Thymus algeriensis* et d'*Ammoides verticillata* (de haut en bas)

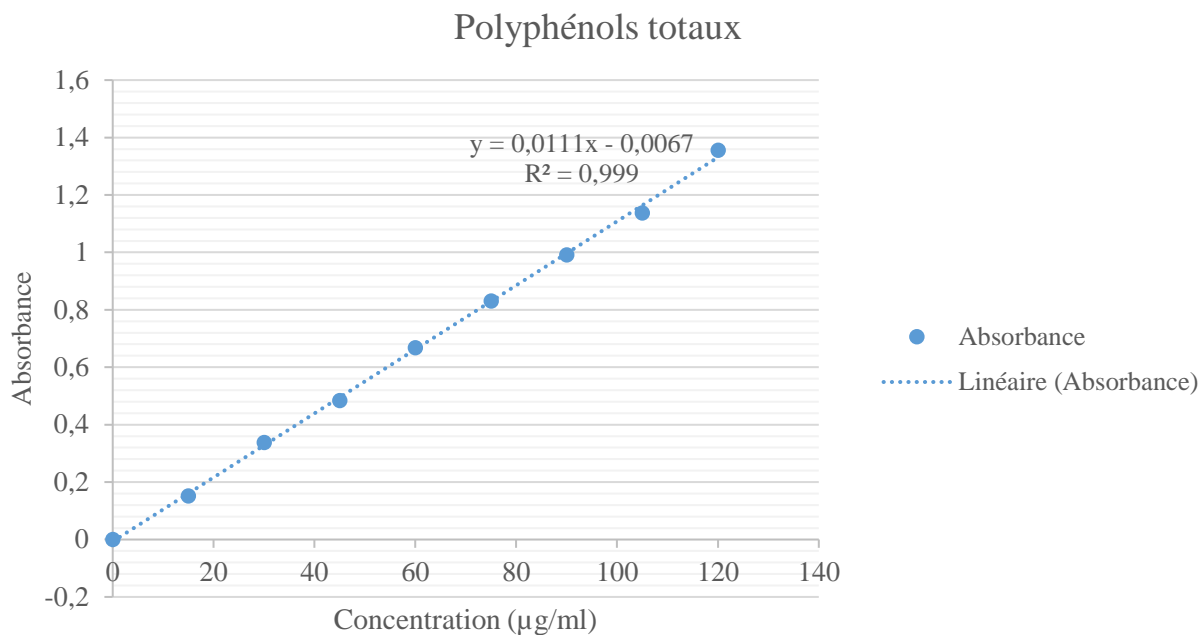


Figure 2. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

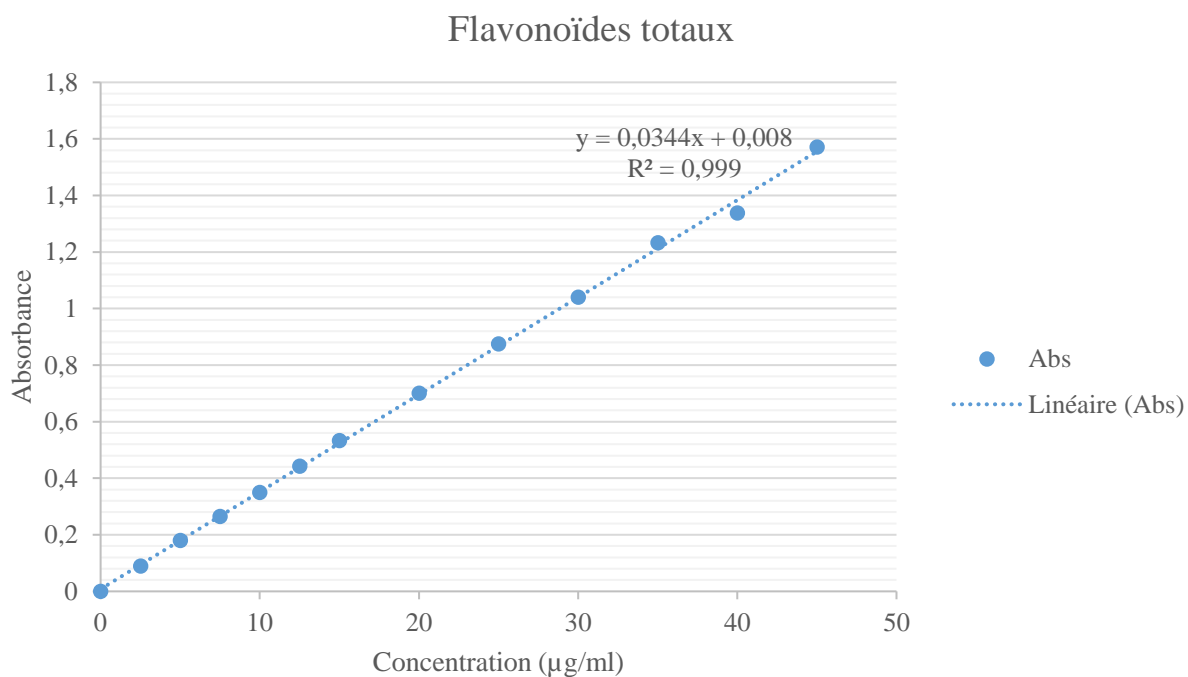


Figure 3. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

Tableaux : Analyse de la différence significative par le test de Tukey pour toutes les méthodes**Teneur en composés phénoliques**Différence significative de Tukey^a

Plante	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		1	2
T. polium	3	108,5947	
A. verticillata	3		170,2763
T. algeriensis	3		170,4563
Sig.		1,000	,988

Teneur en flavonoïdesDifférence significative de Tukey^a

Plante	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
T. polium	3	25,3297		
T. algeriensis	3		45,1163	
A. verticillata	3			67,7907
Sig.		1,000	1,000	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Activité d'inhibition de la BChE (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Galanthamine	3	34,590				
T. pol HE	3		89,708			
T. alg HE	3			128,570		
A. verticillata HE	3				188,290	
T. alg EE	3					214,764
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

Test de piégeage du radical ABTS (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
A. verticillata HE	3	1,8242						
Trolox	3		3,6903					
T. alg HE	3		3,8407					
A. verticillata EE	3			6,0116				
T. alg EE	3				7,4360			
T. pol HE	3					12,0512		
BHT	3						12,9900	
T. pol EE	3							16,1840
Sig.		1,000	,994	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Pouvoir d'inhibition du radical Superoxyde (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	3
Acide ascorbique	3	7,590		
T. pol EE	3		22,233	
T. alg EE	3		22,963	
A. verticillata EE	3		23,304	
a-tocophérol	3			31,507
Sig.		1,000	,766	1,000

Pouvoir réducteur (IC50)

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Acide ascorbique	3	9,010					
A. verticillata EE	3		40,971				
T. alg EE	3			58,815			
BHT	3			61,623			
A. verticillata HE	3			62,298			
T. pol EE	3				76,351		
T. alg HE	3					174,266	
T. pol HE	3						280,242
Sig.		1,000	1,000	,978	1,000	1,000	1,000

Test CUPRAC (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
A. verticillata HE	3	5,1071					
BHT	3		9,6200				
T. alg HE	3		9,8228				
T. alg EE	3			13,5911			
A. verticillata EE	3				15,6821		
T. pol EE	3					19,3967	
T. pol HE	3						88,2832
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Capacité d'inhibition du blanchiment du β -Carotène (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Trolox	3	1,000					
BHT	3	1,030					
A. verticillata EE	3		11,617				
A. verticillata HE	3			15,829			
T. alg EE	3				33,473		
T. alg HE	3					43,336	
T. pol EE	3					44,043	
T. pol HE	3						78,148
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,965	1,000

Activité antihémolytique (IC50)Différence significative de Tukey^a

Echantillon	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
		1	2	3	4
A. verticillata EE	3	125,031			
T. alg EE	3		171,322		
Quercétine	3		183,719		
T. pol EE	3			315,949	
Acide ascorbique	3				379,230
Sig.		1,000	,076	1,000	1,000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3,000.

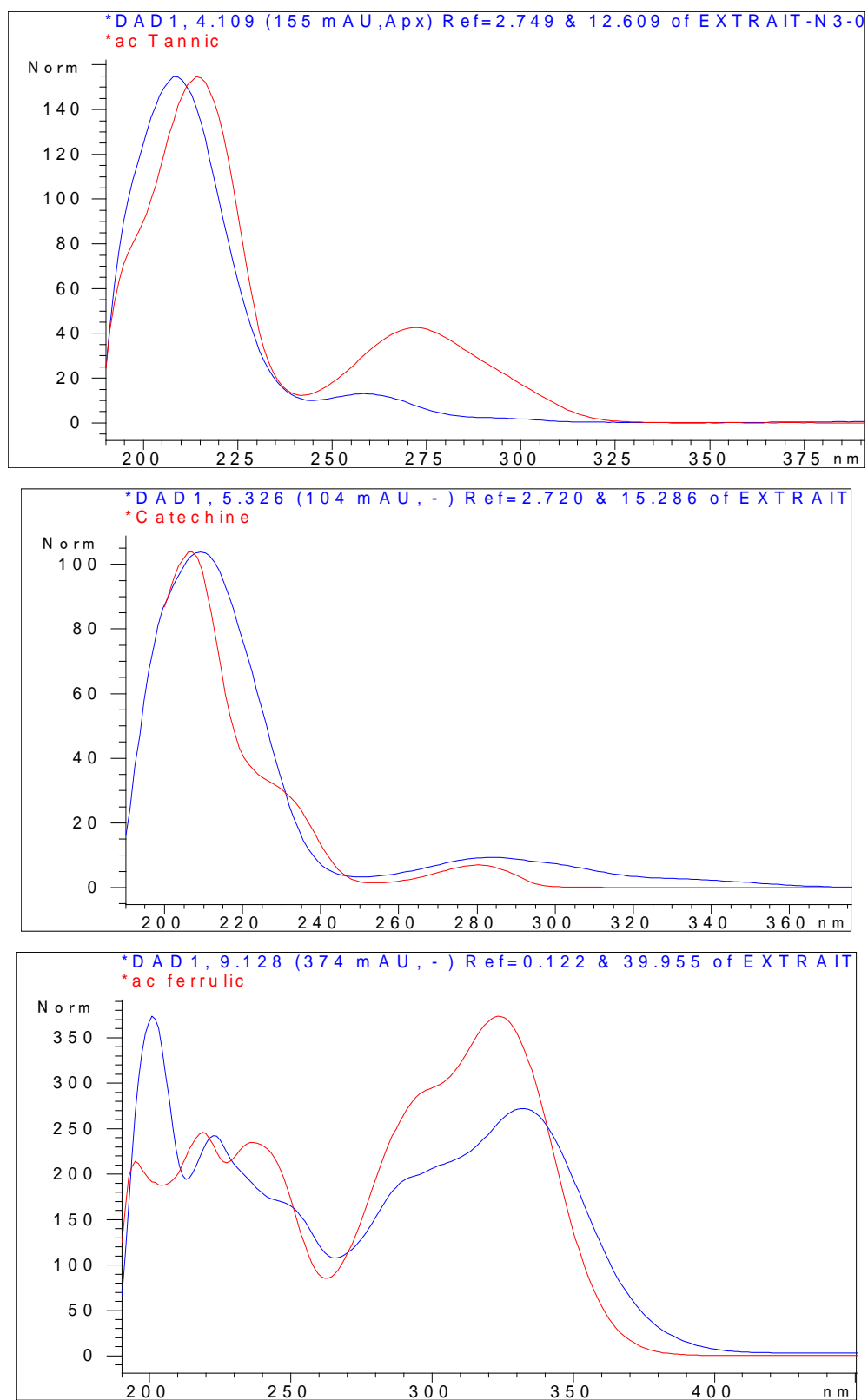


Figure 4. Spectres UV de quelques composés identifiés

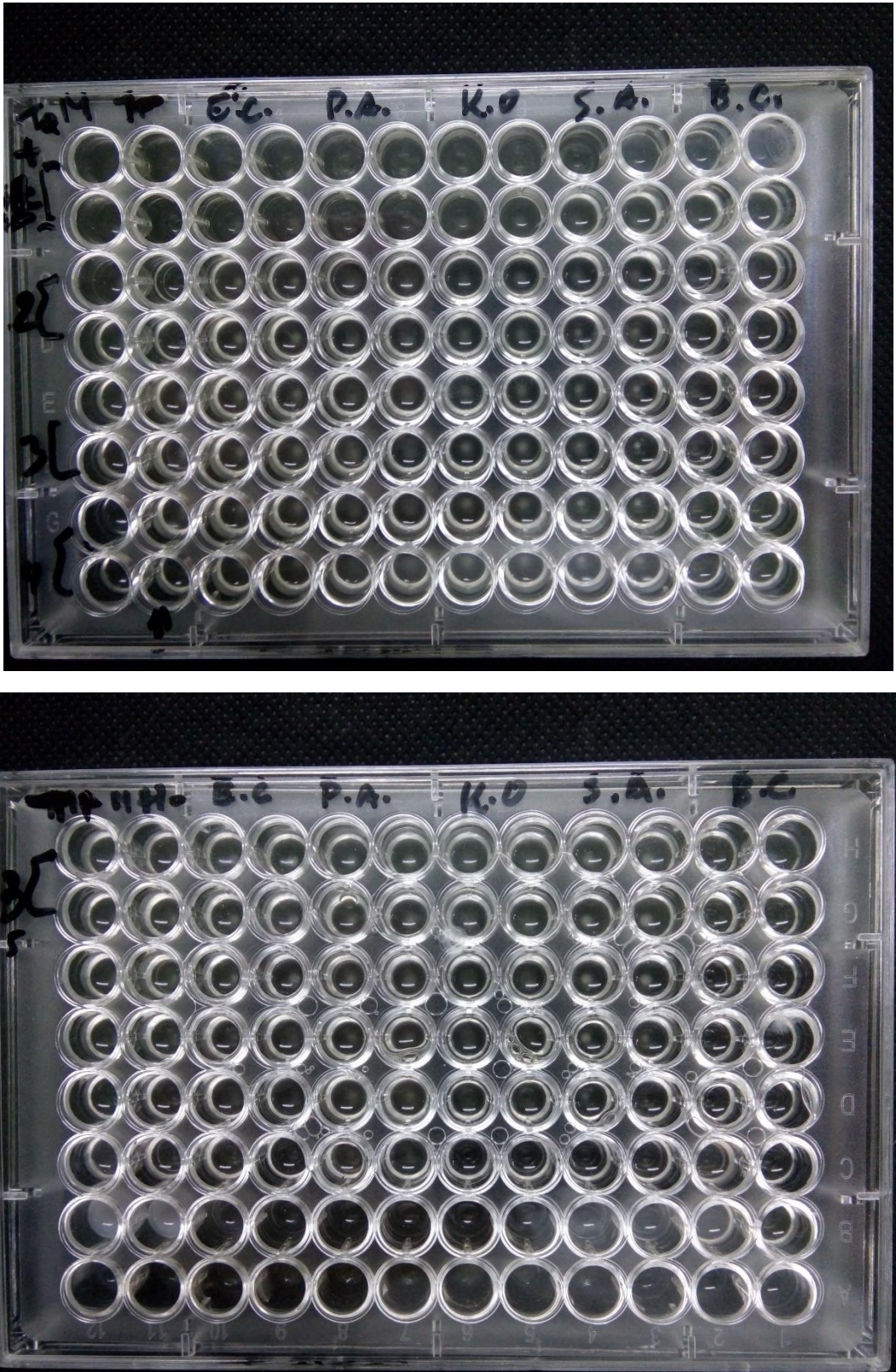


Figure 5. Méthode de microdilution pour la détermination des CMI

Résumé

Résumé :

Cette étude visait à étudier les activités anti-cholinestérase (ChE), antioxydante, antihémolytique et antibactérienne des huiles essentielles (HE) et des extraits éthanoliques (EE) de trois plantes médicinales d'Algérie : *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Teucrium polium* subsp *capitatum* et *Ammoides verticillata*. La composition chimique des HE analysée par CG et GC-MS a révélé la présence de carvacrol (43,2%), de p-cymène (18,7%) et de γ -terpinène (14,8%) comme composés majeurs de *T. algeriensis*. Le germacène D (25,0%) le bicyclgermacène (10,4%), le β -pinène (11,3%) et le spathuléol (5,8%) pour le *Teucrium polium* subsp *capitatum*, tandis que le thymol (43.3%), le carvacrol (12.0 %), le p-cymène (14.6%), le limonène (11.0 %) et le γ -terpinène (9.9 %) étaient les principaux composants de l'huile d'*Ammoides verticillata*. L'analyse HPLC-DAD-UV des extraits a révélé des profils chromatographiques riches en acide n-hydroxy cinnamique pour le *Teucrium polium* subsp *capitatum*, acide rosmarinique pour *Thymus algeriensis* et lutéoline 7-O-glucoside pour l'*Ammoides verticillata*. Les meilleures activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) ont été montrées par les HE de *T. algeriensis* et de *T. polium* subsp *capitatum* respectivement. Néanmoins, les EE n'ont eu qu'un faible effet inhibiteur, voire aucun, notamment contre l'AChE. L'activité antioxydante évaluée par le blanchiment de β -carotène, les pouvoirs réducteurs ferriques et cuivriques et l'inhibition des radicaux ABTS \bullet +, DPPH \bullet et superoxydes a révélé différentes tendances en matière d'antioxydants en fonction du test utilisé pour les HE mais une activité élevée avec tous les tests pour les EE. De plus, les EE ont montré une excellente activité antihémolytique contre l'hémolyse induite par l'AAPH comparativement à la quercétine et l'acide ascorbique. En outre, une excellente activité antimicrobienne a été observée contre les souches bactériennes testées pour les HE avec des valeurs de diamètres des zones d'inhibition et de CMI variant entre 19 à 62 mm et 1,25 et 20 mg/ml respectivement. Par contre, aucune activité n'a été remarquée pour les EE.

Mots clés : Activité anticholinestérase, antioxydante, antihémolytique, antimicrobienne.

ملخص :

هدفت هذه الدراسة إلى دراسة النشاط المضاد الكولين إستيراز (ChE) ومضادات الأكسدة ومضادات التخثر ومضادات الجراثيم في الزيوت العطرية (HE) والمستخلصات الإيثانولية (EE) لثلاثة نباتات طبية من الجزائر *Thymus* للتركيب الكيميائي - GC و GC-MS عن وجود (18.7%) p-cymene و (43.2%) carvacrol و γ -terpinene (10.4%) (14.8%) كمركبات رئيسية لـ *Thymus algeriensis*، Germacene D (25.0%)، *Teucrium polium subsp capitatum algeriensis* Boiss. & Reut β -pinene (11.3%) و spathulenol (5.8%) لـ *Teucrium polium subsp capitatum*، بينما (12.0%) carvacrol و (43.3%) thymol و (14.6%) p-cymene و (11.0%) limonene و كانت هي المكونات الرئيسية لزيوت *Thymus algeriensis* و *Teucrium polium subsp capitatum* (9.9%) γ -terpinene كشف تحليل HPLC-DAD للمستخلصات عن ملامح كروماتوغرافية غنية بـ acide n-hydroxy cinnamique لـ *Teucrium polium subsp capitatum*، و acide rosmarinique لـ *Thymus algeriensis* و luteolin 7-O-glucoside لـ *Ammoides verticillata*. أفضل الأنشطة المثبطة للـ acetylcholinestérase (AChE) و butyrylcholinesterase (BChE) تم إظهارها بواسطة الزيوت العطرية *T. algeriensis* و *T. polium subsp capitatum* ومع ذلك، فإن المستخلصات كان لها فقط تأثير مثبت ضعيف، إن وجد، وخاصة ضد AChE. كشف نشاط مضادات الأكسدة التي تم تقييمها عن طريق تبييض- β carotène وقوى تقليل الحديد والكبريت وتشبيط جذور $ABTS^{*+}$ و DPPH و superoxyde عن ميولات مختلفة مضادة للأكسدة وفقاً للاختبار المستخدم الزيوت العطرية ولكن النشاط عالية مع جميع الاختبارات للمستخلصات الإيثانولية بالإضافة إلى ذلك، أظهرت المستخلصات نشاطاً جيداً مضاداً للدم ضد انحلال الدم الناجم عن AAPH مقارنةً بكيرستين وحمض الأسكوربيك. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ نشاط مضادات الميكروبات ممتاز للزيوت العطرية ضد السلالات البكتيرية بأقطار منطقة تثبيط وقيم MIC تتراوح بين 19-62 ملم و 1.25 و 20 ملغ / مل، على التوالي. ومع ذلك، لم يلاحظ أي نشاط للمستخلصات.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضادات الأكسدة، مضادات الكولين إستيراز، مضادات للتحلل الدم، مضادات الميكروبات.

Abstract :

This study aimed to study the anti-cholinesterase (ChE), antioxidant, antihemolytic and antibacterial activities of the essential oils (EO) and the ethanolic extracts (EE) of three medicinal plants from Algeria: *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut., *Teucrium polium* subsp *capitatum* and *Ammoides verticillata*. The chemical composition analysis by GC and GC-MS revealed the presence of carvacrol (43.2%), p-cymene (18.7%) and γ -terpinene (14.8%) as major compounds of *T. algeriensis*. Germacene D (25.0%), bicyclogermacene (10.4%), β -pinene (11.3%) and spathulenol (5.8%) for *Teucrium polium* subsp *capitatum*, while thymol (43.3 %), carvacrol (12.0%), p-cymene (14.6%), limonene (11.0%) and γ -terpinene (9.9%) were the main components of *Ammoides verticillata* oil. HPLC-DAD analysis of the extracts revealed chromatographic profiles rich in n-hydroxy cinnamic acid for *Teucrium polium* subsp *capitatum*, rosmarinic acid for *Thymus algeriensis* and luteolin 7-O-glucoside for *Ammoides verticillata*. The best inhibitory activities of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) were shown by *T. algeriensis* and *T. polium* subsp *capitatum* Eos respectively. Nevertheless, the EE had only a weak inhibitory effect, if any, especially against AChE. Antioxidant activity evaluated by β -carotene bleaching, ferric and cupric reducing powers and the inhibition of ABTS^{•+}, DPPH[•] and superoxide radicals revealed different antioxidant trends according to the test used for HE. but high activity with all tests for EE. Moreover, EE showed good antihemolytic activity against AAPH-induced hemolysis compared to quercetin and ascorbic acid. In addition, excellent antimicrobial activity was observed against bacterial strains tested for EOs with inhibition zone diameters and MIC values varying between 19-62 mm and 1.25 and 20 mg/ml, respectively. However, no activity was noticed for EE.

Key words : Antioxidant activity, anticholinesterase, antihemolytic, antimicrobial.