



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Ba
MOSTAGANEM

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abdel Hamid Ibn Badis, Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Domaine : S.N.V

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Ba
MOSTAGANEM

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT 3ème cycle LMD

Par

AMRAOUI Amira

THEME

**Composition chimiques et activités antimicrobienne, antioxydante,
insecticide et anticancéreuse des huiles essentielles et/ou des extraits de
Marrubium vulgare et d'*Ammi visnaga***

Membres de jury :

CHERIGUENE Abderrahim	Professeur	Université de Mostaganem	Président
DJIBAOUI Rachid	Professeur	Université de Mostaganem	Examinateur
BEKADA Ahmed Mohamed Ali	Professeur	Université de Tissemsilt	Examinateur
BAHRI Fouad	Professeur	Université de Mostaganem	Directeur de thèse

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale

Année universitaire 2021/2022

Remerciement

Avant tout, merci Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements à mon directeur de thèse, Mr. Bahri F, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir accepté dans son équipe et de m'avoir fait l'honneur de diriger avec soin ce travail. Pour son intérêt et son soutien, sa disponibilité et ses conseils durant la rédaction de ma thèse. J'ai beaucoup appris à ses côtés.

Je remercie grandement Mr. CHERIGUENE A, professeur à l'université de Mostaganem, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse. Mr. Djibaoui R, professeur à l'université de Mostaganem et Mr. BEKADA A, professeur à l'université de Tissemsilt pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail, je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du laboratoire pour leur aide et leur soutien pendant les moments difficiles. Merci Ougirti nawal, Bouchibane malika, Tahlaiti Amina et Hamed djahira.

Je ne saurai oublier de remercier ma famille qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire ; mes parents, J'espère vous rendre tous deux fières de moi. Merci à mes proches et plus particulièrement, à mes sœurs pour leur présence à mes côtés.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents

Mes sœurs

*La mémoire de mes grands-parents, paix à leurs
âmes*

Toutes mes amies

Amira

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouvelles molécules bioactives à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des métabolites secondaires, et à l'évaluation des propriétés biologiques de deux plantes aromatiques et médicinales, poussant à l'état spontané au nord-ouest de l'Algérie. *Ammi visnaga* L. et *Marrubium vulgare* L. Le screening phytochimique a révélé la présence de différents groupes de métabolites secondaires dans les parties aériennes des plantes tels que, les alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, stérols et triterpènes, coumarines et les composés réducteurs.

L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a donné un rendement de 1.78%, l'analyse de cette huile nous a permis d'identifier 26 composés volatiles représentant un total de 95.1% de cette dernière, avec la prédominance du limonène (27.8%). Tandis que la macération des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a donné des rendements de 16.60 et 13.99% respectivement en extraits bruts méthanoliques. Le dosage de ces extraits nous a permis de constater leur richesse en tanins, en polyphénols et en flavonoïdes.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. visnaga* a montré un grand effet inhibiteur sur les souches de référence testées. Avec les valeurs des paramètres antimicrobiens allant de 1.56 à 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour la CMI et de 1.56 à 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour la CMB et la CMF. Concernant les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare*, ils ont montré un pouvoir antimicrobien modéré, La susceptibilité a été importante le plus chez *E. coli* à l'extrait des feuilles, et chez *S. aureus* à l'extrait des fleurs.

Les valeurs de CE_{50} obtenues par le test de DPPH, sont de 269.74 mg/mL pour l'huile essentielle d'*A visnaga*, et de 625.53 et 591.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement pour les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare*. Tandis que les valeurs obtenues par le test de FRAP sont de 158 mg/mL pour l'huile essentielle d'*A visnaga*, et de 225.66 et 376.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement pour les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare*. L'étude de la toxicité aigüe a indiqué que l'huile essentielle d'*A. visnaga* était légèrement toxique et les extraits de *M. vulgare* étaient sans danger. Le test de l'œdème plantaire induit par la carragénine a montré qu'à la plus grande dose testée de l'huile essentielle (100 mg/kg), le pourcentage d'inhibition était de 56.35%. Tandis que pour les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare*, les pourcentages d'inhibition étaient respectivement 76.18 et 62.96% à la plus grande dose testés (400 mg/kg).

Les résultats de l'activité insecticide de nos échantillons, l'huile essentielle a montré un très fort pouvoir sur les pucerons, avec un taux de mortalité de 85.18% à la dose de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Et concernant les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare*, les taux de mortalité étaient de 43.66 et 26.66 % à la dose de 30 mg/mL. Quant-aux résultats de l'activité anticancéreuse, L'huile a montré une activité cytotoxique plus élevée pour les lignées cellulaires cancéreuses par rapport à celles des lignées cellulaires normales.

Mots clés : *Ammi visnaga* L., *Marrubium vulgare* L., huile essentielle, extraits méthanoliques, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité insecticide.

Abstract

Within the framework of the discovery of new bioactive molecules from natural sources, we were interested in this work on the study of the secondary metabolites, and in the evaluation of the biological properties of two aromatic and medicinal plants, growing in the spontaneous state in the northwest of Algeria. *Ammi visnaga* L. and *Marrubium vulgare* L. The phytochemical screening revealed the presence of different groups of secondary metabolites in the aerial parts of the plants such as, alkaloids, flavonoids, tannins, sterols and triterpenes, coumarins and reducing compounds.

The essential oil of *Ammi visnaga* gave a yield of 1.78%, the analysis of this oil allowed us to identify 26 volatile compounds representing a total of 95.1% of the oil, with the predominance of limonene (27.8%). While the maceration of *Marrubium vulgare* leaves and flowers gave yields of 16.60 and 13.99% respectively in methanolic crude extracts. The dosage of these extracts allowed us to note their richness in tannins, polyphenols and flavonoids.

The study of the antimicrobial activity of *A. visnaga* essential oil showed a great inhibitory effect on the reference strains tested. The values of the antimicrobial parameters were ranging from 1.56 to 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for MIC and from 1.56 to 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for MBC and MFC. Concerning the extracts of *M. vulgare* leaves and flowers, they showed a moderate antimicrobial power, the susceptibility was most important in *E. coli* to the leaves extract, and in *S. aureus* to the flowers extract.

The EC_{50} values obtained by DPPH test are 269.74 mg/mL for *A. visnaga* essential oil, and 625.53 and 591.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for *M. vulgare* leaf and flower extracts. While the values obtained by FRAP test are 158 mg/mL for the *A. visnaga* essential oil, and 225.66 and 376.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for the *M. vulgare* leaves and flowers extracts. The acute toxicity study indicated that the *A. visnaga* essential oil was slightly toxic and *M. vulgare* extracts were safe. The carrageenan-induced plantar edema test showed that at the highest dose tested of the essential oil (100 mg/kg), the percentage inhibition was 56.35%. While inhibition percentages of the leaves and flowers extracts were respectively 76.18 and 62.96% at the highest dose tested (400 mg/kg).

The results of the insecticidal activity of our samples, the essential oil showed a very strong power on aphids, with a mortality rate of 85.18% at the dose of 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. And concerning the leaves and flowers extracts of *M. vulgare*, the mortality rates were 43.66 and 26.66 % at the dose of 30 mg/mL.

As for the results of the anticancer activity, the oil showed a higher cytotoxic activity for cancerous cell lines compared to normal cell lines.

Keywords: *Ammi visnaga* L., *Marrubium vulgare* L., essential oil, methanolic extracts, antimicrobial activity, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, insecticidal activity.

ملخص

من اجل اكتشاف جزيئات جديدة نشطة بيولوجيًا من مصادر طبيعية ، اهتمنا بدراسة الايضات الثانوية ، و تقييم الخصائص البيولوجية لنبتتين عطريتين وطببتين تنمو بطريقة عفوية في شمال غرب الجزائر. *Ammi visnaga* و *Marrubium vulgare*.

كشف التحليل الكيميائي النباتي عن وجود مجموعات مختلفة من الايضات الثانوية في الأجزاء الهوائية للنبتتين مثل الالكالويد الفلافونويد، التانان، الستيروول و التريتربان، الكومارين والكربوهيدرات.

أعطى الزيت العطري من *Ammi visnaga* عائدًا قدره 1.78 % ، وقد سمح تحليل هذا الزيت بتحديد 26 مركبًا متطايرًا يمثل إجمالي 95.1 % من الزيت ، و المكون الرئيسي كان الليمونين (27.8 %). بينما أعطى تعطين أوراق وأزهار نبات *Marrubium vulgare* إنتاجية 16.60 و 13.99 % على التوالي من المستخلصات الميثانولية الخامة. سمحت لنا معايرة هذه المستخلصات بملاحظة ثرائها بالتانان والبوليفينول و مركبات الفلافونويد.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري ل *A. visnaga* تأثيرًا مثبتًا كبيرًا على السلالات المرجعية المختبرة. تتراوح قيم CMI من 1.56 إلى 12.5 ميكروولتر / مل و CMB و CMF من 1.56 إلى 50 ميكروولتر / مل. اما فيما يتعلق بمستخلصات أوراق وأزهار *M. vulgare* ، فقد أظهرت قوة معتدلة في مضادات الميكروبات ، وكانت الحساسية أكثر أهمية عند *E. coli* لمستخلص الأوراق ، و عند *S. aureus* بالنسبة لمستخلص الأزهار.

قيم EC_{50} التي تم الحصول عليها عن طريق اختبار DPPH هي 269.74 مجم / مل للزيت العطري من *A visnaga* و 625.53 و 591.73 ميكروجرام / مل على التوالي لمستخلصات أوراق وأزهار *M. vulgare*. بينما القيم التي تم الحصول عليها عن طريق اختبار FRAP هي 158 مجم / مل للزيت العطري من *A visnaga* و 225.66 و 376.7 ميكروجرام / مل على التوالي لمستخلصات أوراق وأزهار *M. vulgare*.

أشارت دراسة السمية الحادة إلى أن الزيت العطري ل *A. visnaga* كان سام بدرجة معتدلة اما مستخلصات *M. vulgare* فكانت آمنة. أظهر اختبار وذمة المخلب الناجمة عن الكراجينان أنه عند أعلى جرعة مختبرة من الزيت العطري (100 مجم / كجم) ، كانت النسبة المئوية للتنشيط 56.35%. بينما بالنسبة لمستخلصات أوراق وأزهار *M. vulgare* كانت نسب التنشيط على التوالي 76.18 و 62.96% بأعلى جرعة تم اختبارها (400 مجم / كجم).

نتائج نشاط المبيد للحشرات لعيناتنا ، فقد كان الزيت العطري قوي جدًا على حشرات المن ، حيث بلغ معدل الوفيات 85.18% بجرعة 100 ميكروولتر / مل. أما بالنسبة لمستخلصات أوراق وأزهار *M. vulgare* فقد كانت معدلات الوفيات 43.66% و 26.66% بجرعة 30 مجم / مل. بالنسبة لنتائج النشاط المضاد للسرطان ، أظهر الزيت نشاطًا سامًا للخلايا السرطانية مقارنة بخطوط الخلايا الطبيعية.

الكلمات المفتاحية : *Marrubium vulgare* ، *Ammi visnaga* زيت عطري ، مستخلصات ميثانولية ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد للالتهابات ، نشاط مبيد للحشرات.

Table des matières

Tables des matières

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Les plantes médicinales	
1. Généralités sur les plantes médicinales	4
2. Les éléments actifs des plantes médicinales	4
2.1. Définition des métabolites secondaires	4
2.2. Les huiles essentielles	4
2.2.1. Biosynthèse des huiles essentielles	5
2.2.2. Composition chimique des huiles essentielles	5
2.2.3. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles	6
2.2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	7
2.2.5. Toxicité des huiles essentielles	10
2.3. Les composés phénoliques	10
2.3.1. Les acides phénoliques	11
2.3.2. Les tanins	11
2.3.3. Les flavonoïdes	11
2.3.4. Les anthocyanes	11
2.3.5. Les coumarines	11
2.3.6. Les quinones	12
2.4. Les alcaloïdes	12
Chapitre 2 : Les espèces végétales étudiées	
1. <i>Ammi visnaga</i>	13
1.1. Taxonomie	13
1.2. Morphologie	13
1.3. Répartition géographique	14
1.4. Usage	14
1.5. Composition chimique	15
2. <i>Marrubium vulgare</i>	16
2.1. Taxonomie	16
2.2. Morphologie	16
2.3. Répartition géographique	17
2.4. Usage	17
2.5. Composition chimique	18
Chapitre 3 : Les activités biologiques des plantes médicinales	
1. Activité antimicrobienne	19
1.1. Les infections nosocomiales	19
1.1.1. Les agents pathogènes responsables	19
1.1.2. Les antibiotiques	21
1.1.3. La consommation des antibiotiques en Algérie	22
1.2. La résistance microbienne aux antibiotiques	22
1.2.1. Mécanismes de la résistance	22
1.2.2. Les bactéries multi-résistantes	23
1.3. Propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales	23
2. Activité antioxydante	24
2.1. Le stress oxydatif	25
2.1.1. Les maladies liées au stress oxydatif	25
2.2. Les radicaux libres	26

2.3.Les antioxydants	27
2.3.1. Mécanismes d'action des antioxydants	27
3. Activité anti-inflammatoire	28
3.1.L'inflammation	28
3.2.Les types d'inflammation	29
3.2.1. Inflammation aigue	29
3.2.2. Inflammation chronique	30
3.3.Les anti-inflammatoires	30
3.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens	30
3.3.2. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens	31
3.4.Les propriétés anti-inflammatoires des plantes médicinales	31
4. Activité insecticide	32
4.1.Les pucerons	32
4.2. <i>Aphis spiraecola</i>	32
4.2.1. Classification	33
4.2.2. Description	33
4.2.3. Cycle biologique	34
4.3.Moyens de lutte contre les pucerons	34
4.4.Propriétés insecticides des plantes médicinales	34
Partie 2 : Partie expérimentale	
Chapitre 4 : Matériel et méthodes	
1. Matériel végétal	36
1.1.Récolte	36
1.2.Screening phytochimique	37
2. Les huiles essentielles	39
2.1.Hydrodistillation	39
2.2.Calcul du rendement	39
2.3.Analyse chimique des huiles essentielles	40
3. Les extraits de plantes	40
3.1.Préparation des extraits bruts méthanolique par macération	40
3.2.Calcul du rendement	41
3.3.Dosage des composés phénoliques	41
4. Procédés microbiologies	43
4.1.Les souches microbiennes testées	43
4.2.Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards	43
4.3.Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits	44
4.3.1. Technique de l'aromatogramme (Méthode de Vincent)	44
4.3.2. Détermination e la CMI	44
4.3.3. Détermination de la CMB	45
5. Etude de l'activité antioxydante	45
5.1.Test DPPH	45
5.2.Test de FRAP	46
6. Etude pharmacologique	47
6.1.Matériel animal	47
6.2.Toxicité aigue	47
6.3.Etude de l'activité anti-inflammatoire	47
7. Etude de l'activité insecticide	47
7.1.L'insecte étudié (<i>Aphis spiraecola</i>)	49

7.2.Evaluation de la toxicité des huiles essentielles et des extraits par contact	49
7.2.1. Mise en œuvre pratique	49
7.2.2. Expression des résultats	50
8. Etude de l'activité anticancéreuse	50
8.1.Culture cellulaire	50
8.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i>	51
Chapitre 5 : Résultats et discussion	
1. Matériel végétal	51
1.1.Screening phytochimique	51
2. Les huiles essentielles	53
2.1.Rendement en huile essentielle	53
2.2.Analyse chimique de l'huile essentielle	54
3. Les extraits de plantes	56
3.1.Rendement en extraits bruts	56
3.2.Dosage des composés phénoliques	57
3.2.1. Dosage des polyphénols totaux	57
3.2.2. Dosage des flavonoïdes	58
3.2.3. Dosage des tanins	59
4. Etude de l'activité antimicrobienne	61
4.1.Etudes de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards	61
4.2.Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits bruts	62
4.2.1. <i>Ammi visnaga</i>	62
4.2.2. <i>Marrubium vulgare</i>	65
5. Etude de l'activité antioxydante	68
5.1. <i>Ammi visnaga</i>	68
5.1.1. Test DPPH	68
5.1.2. Test de FRAP	70
5.2. <i>Marrubium vulgare</i>	72
5.2.1. Test DPPH	72
5.2.2. Test de FRAP	73
6. Etude pharmacologique	75
6.1.Toxicité aigue	75
6.1.1. <i>Ammi visnaga</i>	75
6.1.2. <i>Marrubium vulgare</i>	76
6.2.Activité anti-inflammatoire	76
6.2.1. <i>Ammi visnaga</i>	76
6.2.2. <i>Marrubium vulgare</i>	78
7. Activité insecticide	80
8. Activité anticancéreuse	84
Conclusion	86
Référence bibliographiques	89
Annexes	112

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
N°01	Exemples de pathologies liées au stress oxydatif.	25
N°02	Les principaux corticoïdes.	31
N°03	Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.	31
N°04	Données géographiques de la récolte des espèces végétales étudiées.	36
N°05	Liste des souches microbiennes testées.	43
N°06	Résultats du screening phytochimique d' <i>Ammi visnaga</i> et des feuilles et fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	51
N°07	Rendement en huile essentielle de la partie aérienne d' <i>Ammi visnaga</i> .	53
N°08	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> .	55
N°09	Les rendements en extraits méthanoliques obtenus des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	56
N°10	Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.	62
N°11	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.	63
N°12	Valeurs des paramètres antimicrobiens de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> exprimées en µl/mL.	64
N°13	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.	66
N°14	Valeurs des paramètres antimicrobiens des extraits des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> exprimées en mg/mL.	68
N°15	Valeurs de la concentration efficace 50 de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH.	71
N°16	Valeurs de la concentration efficace 50 de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP.	72
N°17	Valeurs de la concentration efficace 50 des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> et de l'acide ascorbique obtenues par le test DPPH.	74
N°18	Valeurs de la concentration efficace 50 des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP.	75
N°19	Effet de l'huile essentielle d' <i>A. visnaga</i> sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats.	77
N°20	Effet des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats.	79
N°21	Evaluation de la toxicité de différentes doses de l'huile essentielle et des extraits par contact.	81
N°22	Activité cytotoxique de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> (CE ₅₀ = µg/mL).	84

Liste des figures

Figure	Titre	Page
N°01	Les différentes structures rencontrées chez les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes.	06
N°02	Exemples de composés aromatiques caractéristiques des huiles essentielles.	06
N°03	Les étapes de l'hydrodistillation.	07
N°04	Principe schématisé de l'extraction par entraînement à vapeur.	08
N°05	Principe de l'hydro-diffusion.	08
N°06	La technique de l'extraction assistée par micro-ondes.	09
N°07	Principe de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique.	10
N°08	Aspect de l' <i>Ammi visnaga</i> .	14
N°09	Les principaux composés chimiques présents dans l'espèce <i>Ammi visnaga</i> .	15
N°10	Les principaux flavonoïdes présents dans l'espèce <i>Ammi visnaga</i> .	15
N°11	Aspect du <i>Marrubium vulgare</i> .	17
N°12	Structure chimique de la marrubiine.	18
N°13	Les structures chimiques des principaux flavonoïdes présents dans l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> .	18
N°14	Les sites d'action des composés naturels sur la cellule bactérienne.	24
N°15	Réactions de formation des radicaux libres.	26
N°16	Les principales étapes de la réaction inflammatoire.	28
N°17	<i>Aphis spiraecola</i> adulte aptère (A) et ailé (B).	34
N°18	Situation géographique des régions de collecte des plantes étudiées.	36
N°19	Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> .	39
N°20	Protocole d'extraction des extraits bruts.	41
N°21	Réduction du DPPH par un antioxydant.	45
N°22	Administration orale d'huile essentielle et des extraits.	48
N°23	Injection de la carragénine.	48
N°24	Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse.	48
N°25	Feuilles d'oranger infectées par le puceron <i>Aphis spiraecola</i> .	50
N°26	Protocole de détermination du pouvoir insecticide.	50
N°27	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	57
N°28	Teneur en polyphénols totaux pour les extraits des feuilles et les fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	58
N°29	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	59

N°30	Teneur en flavonoïdes pour les extraits des feuilles et les fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	59
N°31	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.	60
N°32	Teneur en tanins pour les extraits des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	60
N°33	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> .	70
N°34	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.	70
N°35	Pouvoir réducteur de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> .	71
N°36	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.	72
N°37	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	73
N°38	Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des fleurs de <i>Marrubium vulgare</i> .	74
N°39	Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par l'huile essentielle d' <i>A. visnaga</i> et le diclofénac.	78
N°40	Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par les extraits de <i>Marrubium vulgare</i> après 6 heures.	80
N°41	Taux de mortalité d' <i>Aphis spiraecola</i> sous l'effet de différentes doses de l'huile essentielle et des extraits des plantes étudiées.	82

Liste des abréviations et symboles

AFNOR : Association Française de Normalisation

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

ATCC : American Type Culture Collection

BLSE : Béta-lactamases à spectre élargi

BMR : Bactérie multirésistante

CE50 : Concentration Efficace à 50%

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DL50 : Dose Létale 50 DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle

ERO : Espèce réactive oxygénée

ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine

FID : Détecteur par Ionisation de Flamme

FE : Feuilles

FL : Fleurs

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

HE: Huile essentielle

IR : Indice de Rétention

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

PI: Pourcentage d'inhibition

SM : Spectrométrie de Masse

UFC : Unité Formant des Colonies

UV : Ultra Violet

Introduction

Ces dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement qui y ont accès, mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé. « *La médecine traditionnelle réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales* » (OMS, 2009).

On estime que 250 000 à 500 000 espèces végétales existent sur la planète, et seulement entre 1 et 10 % sont utilisées comme nourriture par les humains et les animaux (Cowan, 1999), et jusqu'à présent, seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leur activités biologiques (Verpoorte, 2002). De plus, 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (Adossides, 2003).

Le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe et le Sahara. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région (Snoussi *et al.*, 2003). La valorisation de cette flore devient donc indispensable. A cet égard, nous nous sommes intéressés à deux espèces poussant à l'état spontané à l'ouest du pays, *Ammi visnaga* L. et *Marrubium vulgare* L. et plus particulièrement, à leurs métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires constituent un complexe de molécules bioactives qui possèdent diverses propriétés biologiques intéressantes. Ils sont appliqués dans divers domaines : médecine, pharmacie, cosmétologie, alimentation et agriculture. Une partie importante de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de la résistance microbienne aux antibiotiques, un phénomène principalement responsable de l'apparition des infections nosocomiales d'une part, et de la multi-résistance d'autre part. Cette dernière est un phénotype complexe dont la caractéristique prédominante est la résistance à un large éventail d'antibiotiques (Gerlach *et al.*, 1986).

D'un autre côté, Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études, car ils constituent un intérêt dans le traitement de certaines pathologies. Ces composés sont produits quotidiennement par l'organisme, mais leur surproduction endommage de nombreux composants cellulaires aussi divers tels que les protéines, les lipides ou l'ADN en entraînant un stress oxydatif (Pan *et al.*, 2008). Ce dernier est impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes telles que l'athérosclérose, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, le diabète, les rhumatismes et le vieillissement prématuré de la peau (Roberts et Sindhu, 2009).

Le stress oxydatif peut également être impliqué dans l'apparition des maladies inflammatoires chroniques, ces dernières sont devenues l'un des principaux problèmes de santé de la population mondiale (Olajide *et al.*, 1999). L'inflammation est un mécanisme de défense non spécifique développée pour protéger les tissus contre les dommages causés par des stimuli nuisibles, elle est souvent accompagnée par des symptômes indésirables (œdème, érythème et douleur) (Jain *et al.*, 2014). L'utilisation des différents anti-inflammatoires pour traiter

l'inflammation expose aux risques de toxicité gastro-intestinale, rénale et cardiovasculaire. Ces risques sont de plus en plus important lorsque le traitement est prolongé (**Wallace et Vong, 2008**).

Un autre problème occupe l'intérêt des recherches actuelles, l'émergence des pucerons, le souci majeur des agriculteurs. Ce groupe d'insectes est connu pour être de redoutables ravageurs agricoles (**Bonnemain, 2010**). *Aphis spiraeicola*, est une espèce de puceron dont le genre *Citrus* soit l'hôte le plus important en agriculture (**Andreev et al., 2009**). Il présente des phénomènes de résistances aux insecticides et il est très dommageable aux agrumes en Algérie (**Saharaoui et Hemptienne, 2009**). De plus, l'utilisation massive des insecticides engendre des problèmes de résidus et représente un risque pour la santé humaine et pour l'environnement (**Aktar et al., 2009**). Pour cela, les plantes médicinales et leurs métabolites secondaires peuvent efficacement être utilisées comme bio-insecticide pour lutter contre ces ravageurs.

Notre étude consiste à la recherche des activités biologiques de deux plantes, *Ammi visnaga* appartenant à la famille des *Apiaceae* et *Marrubium vulgare* appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante. Ces deux plantes représentent un sujet de recherche scientifique intéressant, elles sont employées fréquemment par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, leur efficacité est reconnue traditionnellement dans le traitement symptomatique de troubles gastro-intestinaux et respiratoires.

Le présent travail est une contribution dans la valorisation des principes actifs contenus dans la flore algérienne peu connue jusqu'à présent et est présenté comme suit :

- La première partie est divisée en trois chapitres qui abordent une étude bibliographique préalable réalisée sur les métabolites secondaires, les espèces végétales étudiées et leurs activités biologiques.
- La deuxième partie, la partie expérimentale, se compose du quatrième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail. Et du cinquième chapitre qui est consacré aux résultats expérimentaux trouvés et qui portent sur :
 - Un screening phytochimique réalisé sur les métabolites secondaires de ces deux sous espèces.
 - Des extractions des substances naturelles et un dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.
 - Une étude de l'activité antimicrobienne sur des souches microbienne référenciées et détermination de la CMI et CMB des substances naturelles extraites.
 - Une étude de l'activité antioxydante par deux techniques à savoir la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH.
 - Une étude Etude pharmacologique *in vivo* des substances naturelles extraites, et évaluation de leurs toxicités aiguës et leurs activités anti-inflammatoires par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine.

- Une étude de l'activité insecticide en évaluant la toxicité des substances extraites par contact.

Le manuscrit est achevé par une conclusion qui résume l'ensemble de ces résultats.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les plantes médicinales

1. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes font toujours partie de notre vie quotidienne, on s'en sert pour se nourrir et se soigner. Jadis, les anciens secouraient leurs malades en utilisant les plantes de la nature. Étant donné qu'à l'époque il n'y avait pas suffisamment d'informations ni sur les causes des maladies ni sur quelle plante et comment elle pouvait être utilisée comme remède, tout était basé sur l'expérience (Petrovska, 2012).

Depuis des milliers d'années, les plantes sont utilisées pour aromatiser et conserver les aliments, pour traiter les troubles de santé et pour prévenir les maladies, y compris les épidémies (Silva et Fernandes junior, 2010), la pratique de la médecine traditionnelle est répandue en Chine, en Inde, au Japon, au Pakistan, en Thaïlande et au Sri Lanka.

Les plantes médicinales sont toutes les plantes ayant une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. On estime qu'au milieu des années 90, plus de 2,5 milliards de dollars ont résulté des ventes de médicaments à base de plantes. Les préparations médicinales à base de plantes sont plus demandées que les produits pharmaceutiques traditionnels au Japon (Dar et al., 2017).

Actuellement, la recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques. Les plantes constituent un réservoir de molécules bioactives, elles synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires, qui sont indispensables à leur existence, et une grande variété de composés secondaires conduisant à une grande biodiversité moléculaire dont la fonction est loin de faire l'unanimité (Small et Catling, 2000). Ces métabolites secondaires sont généralement responsables des caractéristiques biologiques des espèces végétales utilisées dans le monde (Dar et al., 2017).

2. Les éléments actifs des plantes médicinales

2.1. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007). Ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent, ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003).

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires (Vermerris, 2006) divisés en trois classes principales :

2.2. Les huiles essentielles

La Pharmacopée européenne définit une huile essentielle comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie (Parle, 1991). Ce sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils peu soluble dans l'eau (Kalemba et Kunicka, 2003), isolés des plantes

par hydrodistillation (entraînement à la vapeur d'eau), par distillation à la vapeur, par pression mécanique (ex : agrumes) ou encore par dissolution dans des lipides (fleur de jasmin) (Couderc, 2001).

Parmi les 1 500 000 espèces végétales recensées, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence (Degryse *et al.*, 2008). Une huile essentielle peut parfois avoir un toucher gras ou huileux mais ce n'est pas un corps gras, elle peut retourner à l'état de vapeur, par évaporation, sans laisser de traces (Bernadet, 2000). Les huiles essentielles sont peu solubles dans l'eau mais sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont très altérables et s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (Bruneton, 1999).

2.2.1. Biosynthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être extraites de divers organes de la plante. Il peut s'agir d'écorces, de graines, de feuilles, de racines, de rhizomes, de fleurs, de bois, de sèves, de bourgeons et des fruits (Bruneton, 1999 ; Oussala *et al.*, 2006). Ainsi, elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, leur synthèse est associée à la présence de structures histologiques spécialisées souvent situées à la surface de tissus des plantes (Malecky, 2008). Les huiles essentielles se forment dans le cytoplasme de cellules sécrétrices variables selon l'organe végétal considéré. Ensuite, elles s'accumulent dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. (Boz *et al.*, 2009). Les principales structures cellulaires sont des cellules à essence, des poils sécréteurs stipités ou sessiles, des poches sécrétrices schizogènes ou schizolysigènes et des canaux sécréteurs (Malecky, 2008).

2.2.2. Composition chimique des huiles essentielles

Une huile essentielle est un mélange complexe de composés organiques, plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans sa composition chimique. Les composés majoritaires peuvent représenter plus de 85% de l'huile, et les autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (Senatore, 1996). L'ensemble de ces composés est divisé en deux grands groupes : le groupe des terpènes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

➤ **Les terpènes :** Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte (Hernandez-Ochoa, 2005), le terme terpène, anciennement employé pour caractériser l'ensemble de la classe des terpenoïdes, a une définition aujourd'hui plus restreinte et ne s'adresse qu'aux (mono)-terpenoïdes hydrocarbonés (Baser et Buchbauer, 2010). Les terpènes sont subdivisés selon le nombre d'unités isopréniques en : hémiterpènes (1 unité : C5), monoterpènes (2 unités : C10), sesquiterpènes (3 unités : C15), diterpènes (4 unités : C20), sesterpènes (5 unités : C25), triterpènes (6 unités : C30), carotènes (8 unités : C40) et les poly-isoprènes (n unités : C5n) (Fillatre, 2011). Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée y sont rencontrés dans les huiles essentielles ; soit les monoterpènes et les sesquiterpènes de formule générale (C₅H₈)_n (Svoboda et Hampson, 1999). Les monoterpénoïdes représentent à eux seuls environ 90% des huiles essentielles (Bakkali *et al.*, 2008).

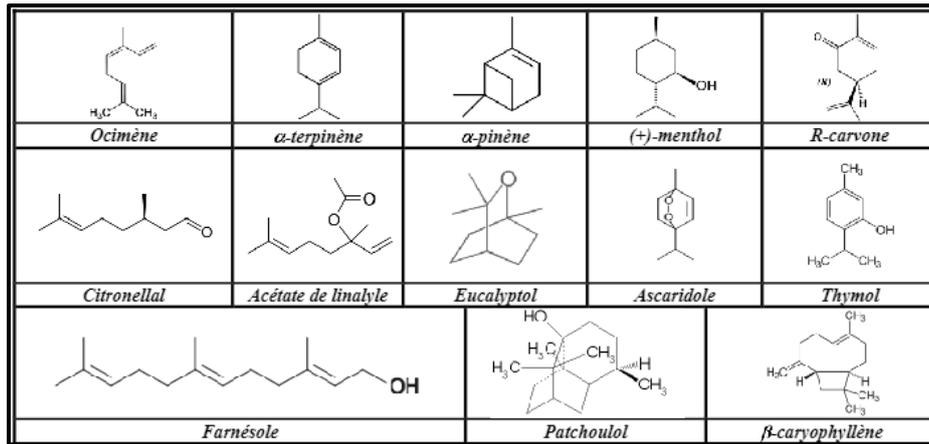


Figure n° 1 : Les différentes structures rencontrées chez les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes (Fillatre, 2011).

➤ **Les composés aromatiques :** En général, les composés aromatiques sont moins courants que les terpènes, ce sont des dérivés du phénylpropane. Ils ont les mêmes applications que ceux des monoterpénoïdes et des sesquiterpénoïdes. Ils contiennent des alcools (alcool cinnamique); les aldéhydes (cynnamaldehyde); les phénols (chavicol, eugénol) ; composés méthoxy (méthyleugénol, élémicine, estragole, anéthole) et dérivés méthylène dioxy (safrole, myristine, apiole) (Eslahi *et al.*, 2017).

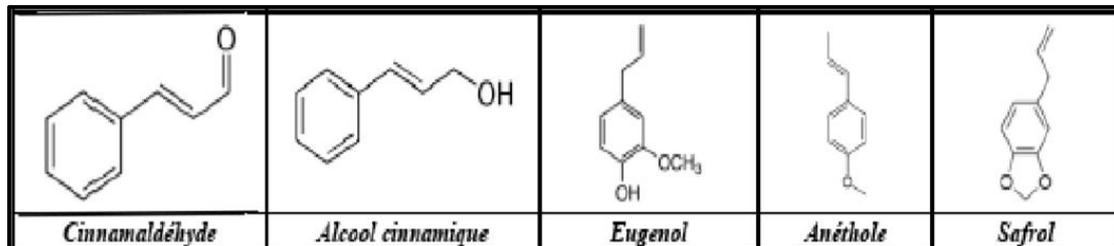


Figure n° 2 : Exemples de composés aromatiques caractéristiques des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

➤ **Composés d'origines divers :** il existe d'autres composés spécifiques, contenant le soufre ou l'azote, issus de la dégradation de terpènes non volatils et d'acides gras. Ces composés peuvent avoir une influence considérable, à l'exemple de la β-damascenone, issue de la dégradation des terpènes, ne représente que 0.14% de l'huile essentielle de rose (*Rosa damascena*), et elle est pourtant un contributeur majoritaire de l'odeur de cette huile (Leffingwell, 2011).

2.2.3. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité au niveau de leur composition chimique ainsi qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette différence est à mettre en rapport avec des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude, la nature du sol et le choix de la période de récolte (Simonet *et al.*, 2006 ; Brada *et al.*, 2007).

La méthode d'extraction est aussi un facteur qui influe considérablement la composition chimique des huiles essentielles (**Kholkhal, 2014**), ou encore le stockage des matières premières avant distillation, des pertes considérables d'huile essentielle peuvent être constatées lors d'un stockage prolongé au congélateur (**Fantino, 1990**). Le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier leur composition, ils peuvent se conserver de 12 à 18 mois après leur obtention (**Carette, 2000**).

Le rendement et la composition chimique d'une huile essentielle varient aussi en fonction du cycle végétatif, la teneur des différents composants peut varier de façon remarquable tout au long du cycle végétatif en rapport avec l'âge de la plante et la période de récolte ou la saison (**Dethier, 1996**).

2.2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe différentes méthodes pour l'extraction des huiles essentielles, le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature du matériel végétal, de la nature des composés et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

➤ La distillation

C'est la technique la plus ancienne et la plus utilisée, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation ; l'hydrodistillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau (**Piochon, 2008**).

- **L'hydrodistillation** : il s'agit de la méthode la plus simple, le matériel végétal est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle étant plus légère que l'eau surnage au dessus de l'hydrolat (**Lucchesi, 2005**).

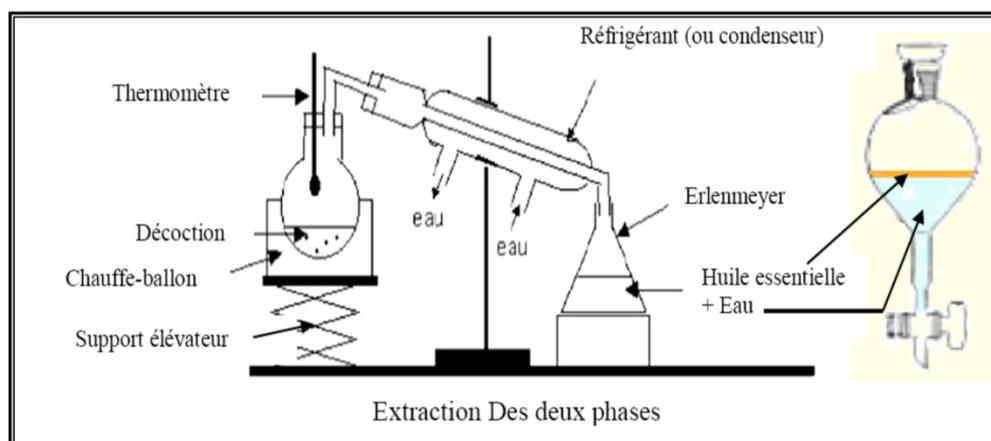


Figure n° 3 : Les étapes de l'hydrodistillation (**Lagunez Rivera, 2006**).

- **Distillation par entraînement à la vapeur d'eau** : Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne baigne pas directement dans l'eau bouillante, il est placé sur une grille perforée qui laisse passer la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette

méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Lucchesi, 2005).

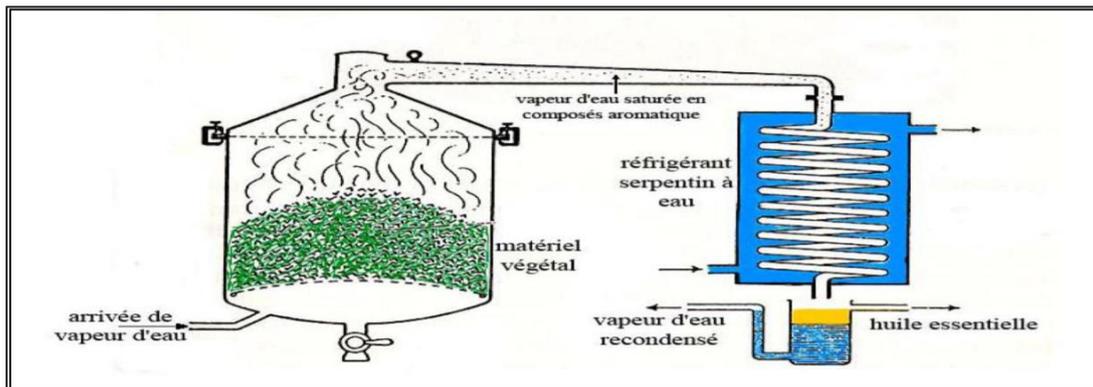


Figure n°4 : Principe schématisé de l'extraction par entraînement à vapeur (Lucchesi, 2005).

- **L'hydro-diffusion** : Dans cette technique, le flux de vapeur à basse pression va, selon la loi de la gravité, du haut à travers la charge végétale jusqu'au condenseur en bas. En raison de la construction de l'appareil, l'hydro-diffusion prend moins de temps que l'hydrodistillation. Avec l'hydro-diffuseur, 25 à 50 % du temps et de l'énergie (vapeur) peuvent être économisés. Un inconvénient est que l'eau distillée ne peut pas être recyclée (Boelens *et al.*, 1990).

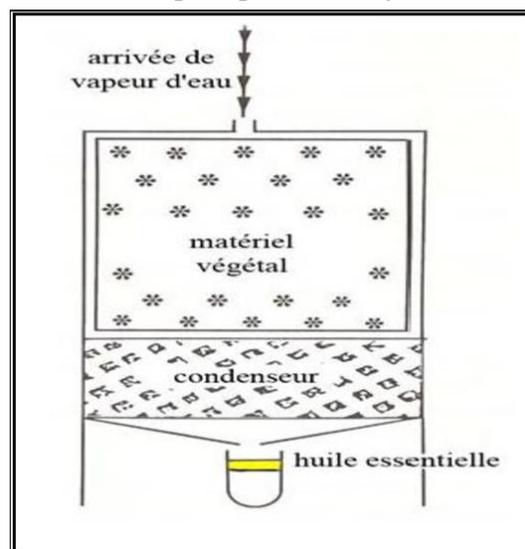


Figure n°5 : Principe de l'hydro-diffusion (Lucchesi, 2005).

➤ **Extraction à froid**

Elle constitue le plus simple des procédés, ça consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence (Roux, 2008). Les huiles pressées à froid conservent de meilleures propriétés natives, en effet, l'extraction à froid est exempte de produits chimiques impliqués dans les étapes de raffinage. Il y a une demande croissante d'huile pressée à froid sur le marché en raison de sa haute qualité nutritionnelle préservée (Chew, 2020).

➤ **Extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Le matériel végétal est chauffé par micro-ondes dans une enceinte close. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante, ensuite, ils sont récupérés à l'aide des procédés classiques (condensation, refroidissement, et décantation) (**Hemwimon *et al.*, 2007**).

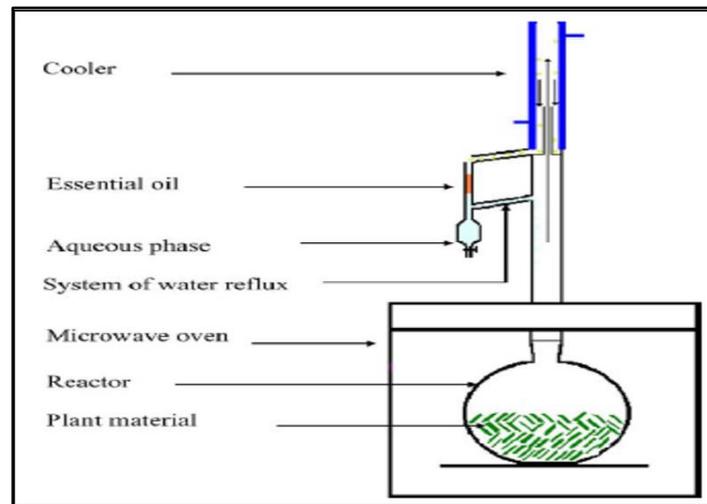


Figure n°6 : La technique de l'extraction assistée par micro-ondes (Lucchesi *et al.*, 2004).

➤ Extraction par les graisses et les solvants

Dans cette technique, l'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole ...) mais aussi de graisses et d'huiles. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination des composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu » et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

➤ Extraction au CO₂ supercritique

Le CO₂ possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction. Dans cette technique, le principal avantage est de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. Tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit (**Piochon, 2008**).

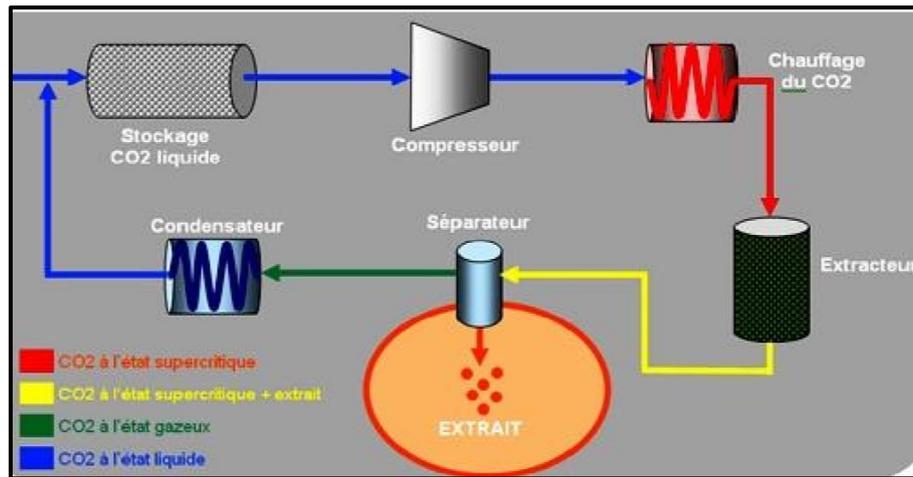


Figure n°7: Principe de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007).

2.2.5. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des concentrés des molécules actives issues des plantes dont elles sont extraites. Elles sont présentées généralement comme « sans danger » mais sont aussi des composés puissants (Degryse *et al.*, 2008). Certaines des molécules contenues dans les huiles essentielles sont connues pour entraîner des allergies cutanées chez les personnes à terrain atopique (limonène, géraniol, eugénol, isoeugénol, citral, citronellol...) (Jouault, 2012).

D'autres molécules présentes dans quelques huiles essentielles, possèdent une similarité de conformation spatiale avec certaines hormones humaines, notamment les pinènes, elles ont des propriétés « Cortison-like ». Leurs précautions risquent de mettre au repos l'axe hypophyso-surrénalien et de subir une insuffisance surrénalienne aiguë à l'arrêt de la prise de l'huile essentielle. Le trans-anéthol, le sclaréol, et l' α -humulène sont dites « œstrogène-like », ils se lient aux récepteurs hormonaux féminins (Jouault, 2012).

Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers. Le safrole est responsable à faible dose d'hépatocarcinomes, et à dose plus importante, de perte de poids, d'atrophie testiculaire et de toxicité sur la moelle osseuse (Homburger et Boger, 1968).

Il existe également des molécules ayant un effet neurotoxique, c'est le cas des cétones et plus particulièrement les thujones, ou thuyones (Franchomme et Pénoel, 1990). Elles sont contre-indiquées chez l'enfant, la femme enceinte et l'épileptique, et pour les autres, leur emploi doit se limiter aux cas extrêmes (Jouault, 2012).

2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (Lebham, 2005), ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques

comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Pandey et Rizvi, 2009**).

2.3.2. Les tanins

Les tanins sont solubles dans l'eau, de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. (**Vermerris et al., 2006**). Parmi les caractéristiques des tanins le goût astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche. Ils sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (**Peronny, 2005**).

2.3.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (**Ghedira, 2005**), aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Kholkhal, 2014**). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Martinez et al., 2005**).

2.3.4. Les anthocyanes

Ces molécules font partie de la famille des flavonoïdes, elles sont capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, on les trouve également dans les racines, tiges, feuilles et graines (**Bessas et al., 2007**).

2.3.5. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, ce sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien (**Kholkhal, 2014**). Dans la cellule végétale, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée, cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont synthétisées en grande quantité par la plante pour lutter contre les infections causées par les champignons et les bactéries (**Hofmann, 2003**).

2.3.6. Les Quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges. Elles sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés, et elles sont connues pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines (**Arif et al., 2009**).

2.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés issus principalement des végétaux, après extraction, la caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation en raison de leur capacité de se combiner avec des métaux (**Kholkhal, 2014**). En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus ont été exploités en tant que médicaments, stimulants, narcotiques et comme poisons (**Ziegler et Facchini, 2008**). Au niveau du système nerveux central ils agissent comme antidépresseurs (morphine) ou stimulants (strychnine, caféine), ils peuvent avoir aussi des effets curarisants, anesthésiques locaux, anti-fibrillants, anti-tumoraux, et antipaludiques (**Bruneton, 1999**).

Chapitre 2

Les espèces végétales étudiées

1. *Ammi visnaga*

Ammi visnaga L. ou *Visnaga daucooides*, est une plante aromatique avec un goût aromatique, amer et légèrement piquant (WHO, 2007), qui était connue dans les temps anciens comme le pain de Pharaon, c'est une courte herbe annuelle ou bisannuelle indigène de la région méditerranéenne de l'Afrique du Nord, de l'Asie et de l'Europe (Meepagala et al., 2016 ; Khalilet al., 2020).

Dans les pays arabes, *A. visnaga* a de nombreux noms communs tels que Khella ou « Noukha » et « Mataina » en Algérie (Brahmi et al., 2014 ; Belkacem et al., 2016), « Khella Baladi » (Al- Sanfi, 2013), « Gazar sheitani, Kammon habashi, Bizer Al-Khilla et Swak Al-Nabi ». En Turquie, elle est connue sous le nom de « disotu, kilir et hiltan », et en Allemagne « Zahnstocherkraut » (Khalil et al., 2020). Elle est également appelée « Tabellaout » en Berbère, « Tooth pick » en anglais et « Herbe aux cure-dents » en français (Bishr et al., 2014).

1.1. Taxonomie

Selon Bock, (2011), *A. visnaga* appartient à la famille des *Apiaceae* sa classification est comme suit :

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Equisetopsida*

Ordre : *Apiales*

Famille : *Apiaceae*

Genre : *Visnaga*

Espèce : *Visnaga daucooides*

1.2. Morphologie

L'*A. visnaga* est une plante vivace pouvant atteindre une hauteur de 90 cm à 1,3 mètre, selon la fraîcheur du terrain (Gattefossé, 1952) (Figure n°8).

- **La racine :** est pivotante cylindrique et de couleur brune claire, elle peut mesurer jusqu'à 50 cm de longueur (Khalil et al., 2020).
- **La tige :** est cylindrique, dressée, très ramifiée, densément feuillue, glabre et mesure jusqu'à 130 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre. Inflorescence en ombelle, sillonnée surtout au sommet, les rayons, très renflés à la base, deviennent ligneux et servent de cure-dents (Gattefossé, 1952 ; WHO, 2007 ; Khalil et al., 2020).
- **Les feuilles :** sont dentelées, en lanières, de forme pennée ou ovale avec des segments linéaires minces mesurant environ 20 à 30 mm de longueur et 0,5 à 1 mm de diamètre. Elles sont vertes dans la région supérieure et blanc grisâtre dans la partie inférieure (WHO, 2007 ; Khalil et al., 2020). La floraison normale d'*A. visnaga* est

généralement de juillet à septembre (parfois dès le mois de Mai dans les années sèches ou zones xérophiles).

- **Les fleurs :** sont blanches à pétales échancrés en deux lobes inégaux à pointe courbée formant des ombelles blanches inflorescent, chacune mesurant 6 à 10 cm de diamètre ; les tiges florales sont allongées, jusqu'à 20 cm de long. Et les fruits sont ovales et brunâtres avec des reflets violacés (Gattefossé, 1952 ; Khalil *et al.*, 2020).



Figure n°8 : Aspect de l'*Ammi visnaga* (Dirar *et al.*, 2014)

1.3. Répartition géographique

Ammi visnaga est très fréquente dans le bassin méditerranéen (Khalfallah *et al.*, 2011), son aire géographique est le nord d'Afrique, l'Europe, la région de la méditerranée orientale, l'Asie du sud-ouest, l'Amérique du Nord, l'Argentine, le Chili, le Mexique et les Îles de l'Atlantique « Canaries, Açores et Madère ». En France, elle existe dans le Midi mais plutôt dans les champs sablonneux. Elle est cultivée en Égypte, en Inde, en République islamique d'Iran, en Tunisie et en Fédération de Russie. Elle varie progressivement d'Est (Asie, Égypte) en ouest (Maroc, Espagne) (Gattefossé, 1952 ; WHO, 2007 ; Al –Sanfi, 2013).

En Algérie, *A. Visnaga* est une plante aromatique endémique (Brahmi *et al.*, 2016), largement distribuée dans le nord de l'Algérie, à Boumerdes (Brahmi *et al.*, 2014), à Constantine (Khalfallah *et al.*, 2011), à Mostaganem (Belkacem *et al.*, 2016) et à Blida (Keddad *et al.*, 2016).

1.4. Usage

La décoction de la khella est réputée pour avoir plusieurs propriétés curatives (Dirar *et al.*, 2014), elle est traditionnellement utilisée comme traitement de l'obstruction des voies respiratoires dans l'asthme, traitement des crampes gastro-intestinales, traitement des affections associées à la présence de calculs urinaires et pour les légers symptômes d'angine. (Al –Sanfi, 2013).

Les médecins arabes préconisent l'*A. visnaga* contre l'aménorrhée, la gravelle et, extérieurement, contre le rhumatisme, la gingivite et la carie dentaire (Gattefossé, 1952). Elle est également connue pour guérir le vitiligo et le psoriasis (Dirar *et al.*, 2014).

Dans la partie occidentale de la Méditerranée elle est connue pour l'usage anodin comme cure-dents (**Gattefossé, 1952**).

1.5. Composition chimique

Le composé principal de l'*A. visnaga* est la Khelline (0.3-1.2%) (**Al-Sanfi, 2013**) (2-méthyl-5 : 8-diméthoxy-6-7-furano-chromone), découverte en 1879 par Mustapha Ibrahim et identifiée en 1941 par Spaëth et Gruber. Les corps qui l'accompagnent dans les graines d'*Ammi* appartiennent à la même famille; ce sont surtout la Visnagine (0.05_0.30%), nettement moins active que la Khelline; la Khellinine, le khellinol, l'amiol et le Khellol. (**Gattefossé, 1952 ; Al-Sanfi, 2013**).

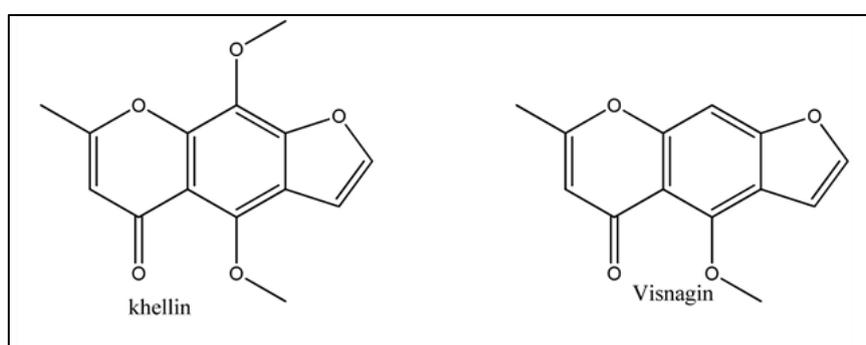


Figure n°9 : Les principaux composés chimiques présents dans l'espèce *Ammi visnaga* (Meepagala *et al.*, 2016).

L'*Ammi* contient aussi l'huile fixe (plus de 18%) et l'huile essentielle (**Satrani *et al.*, 2004 ; Gunaydin et beyazit, 2004 ; Zrira *et al.*, 2008 ; Khalfallah *et al.*, 2011 ; Khadhri *et al.*, 2011 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Soro *et al.*, 2015**).

Le screening phytochimique de la plante a révélé la présence de deux flavonoïdes : quercétine et kaempférol (**Figure n°10**) (**Dirar *et al.*, 2014**)

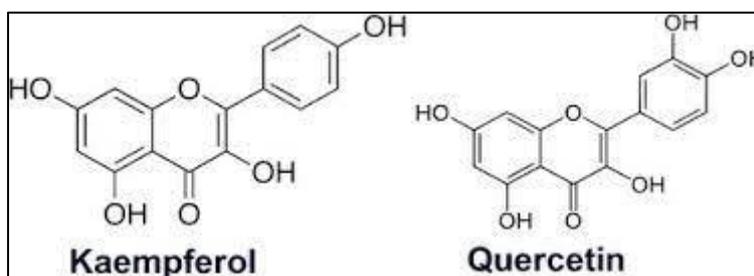


Figure n°10: les principaux flavonoïdes présents dans l'espèce *Ammi visnaga* (Dirar *et al.*, 2014).

2. *Marrubium vulgare*

M. vulgare est une plante herbacée annuelle ou vivace, le nom latin *Marrubium* dérive du mot hébreu « marrob », qui signifie « jus amer ». En anglais, le nom marrube vient des mots « har » et « hune » en vieil anglais, signifiant « plante duveteuse ». Le nom le plus courant dans la langue serbe est « ocajnica » qui signifie « femme désespérée », car le thé de cette herbe était généralement utilisé comme remède amer par les femmes incapables de concevoir (pour la régulation du cycle menstruel) (Acimovic *et al.*, 2020). Elle se développe sur des sols légers, légèrement alcalins, fortement calcaires et avec des teneurs moyennes à fortes en matière organique. (Bouterfas *et al.*, 2013).

M. vulgare est connu avec d'autres noms régionaux dans différentes parties du monde tels que : « Hashish el Kalb, Algama » en arabe, « merriwut, merriwa » en Algérie et au Maroc « ifzi » en berbère (Bellakhdar, 1997), « White Horehound » en anglais, « Marrube blanc » en français, « Weisse andorn » en allemand, « Ghandnaye kohl » en persan, « Faracin » en grecque, « Faracim » en indien (Ahvazi *et al.*, 2018) et elle est également appelée « Maromba ou Marroio » au Brésil (Meyre-Silva et Cechinel-Filho, 2010).

2.1. Taxonomie

Le marrube blanc appartient à la famille des *Lamiaceae* (Acimovic *et al.*, 2020), selon Nait said, (2007) sa classification est comme suit :

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Marrubium*

Espèce : *Marrubium vulgare*

2.2. Morphologie

Le marrube blanc est un Sous-arbrisseau herbacé, érigé, ascendant et vivace, pouvant atteindre plus de 50 cm de hauteur, avec des tiges couvertes de poils laineux dont la base des tiges devient sublignescente (Figure n°11) (Meyre-Silva et Cechinel-Filho, 2010 ; Ahvazi *et al.*, 2018).

- **La racine :** pivotante coriace, ligneuse, ramifiée ou à nombreuses racines latérales fibreuses. (Acimovic *et al.*, 2020).
- **Les tiges :** sont généralement ramifiées pour former une plante buissonnante arrondie ; jusqu'à 100 cm de haut, 20 à 100 cm de large (Ahvazi *et al.*, 2018).

- **Les feuilles** : sont arrondies, ovales, généralement dentées, pétiolées, veinées et blanchies à la surface, mesurent 6 cm de long, 1-5 cm de large et elles sont disposées par paires opposées le long de la tige. (Ahvazi *et al.*, 2018 ; Acimovic *et al.*, 2020).
- **Les fleurs** : les inflorescences se forment à l'aisselle des feuilles supérieures, avec des fleurs blanches en verticilles axillaires serrées. Le calice est tubulaire, lobé et à 10 dents, chaque dent avec une petite épine/soie crochue. (Acimovic *et al.*, 2020).



Figure n° 11: Aspect du *Marrubium vulgare* (Kahlouche-Riachi, 2014).

2.3. Répartition géographique

Le marrube blanc est trouvé nativement en Europe, Afrique du nord, Afrique du sud-ouest et Asie centrale (Hayat *et al.*, 2020). originaire d'Asie (Afghanistan, Arménie, Azerbaïdjan, Chine, Chypre, Iran, Kazakhstan, Liban, Syrie, Turquie, Turkménistan, Ouzbékistan jusqu'au Pakistan), d'Europe (Albanie, Autriche, Biélorussie, Belgique, Bulgarie, Tchécoslovaquie, Danemark, Estonie, Angleterre, France y compris la Corse, Grèce, Hongrie, Italie, Lettonie, Pays-Bas, Pologne, Portugal, Roumanie, Fédération de Russie, Espagne, sud Suède, Suisse, Ukraine et Yougoslavie), et Afrique du Nord (nord Algérie, nord Libye, Maroc, Açores, Madère, Canaries, Tunisie) (Ahvazi *et al.*, 2018).

En Algérie, le marrube blanc se trouve un peu partout, il est distribué de façon importante dans le nord algérien (Bouterfas *et al.*, 2013).

2.4. Usage

L'application traditionnelle la plus courante de *M. vulgare* dans le monde est le traitement des troubles gastro-intestinaux et respiratoires. (Acimovic *et al.*, 2020). La décoction de la plante est employée comme antidiabétique, anti-typhoïdique, anti-diarrhéique, fébrifuge, diurétique, emménagogue, anti-ictérique, expectorant, tonique et stimulant (pour les malades alités). Elle est aussi employée pour ses propriétés antispasmodiques, et pour traiter les maux de tête. Et elle est également utilisée comme un anti-inflammatoire pour les problèmes de foie, et pour traiter la grippe et l'asthme. (Bellakhdar, 1997 ; Meyre-Silva et Cechinel-Filho, 2010).

En usage externe, la plante hachée est couramment utilisée en cataplasmes sur le front contre les fièvres, sur les abcès et les furoncles crevés pour les panser et aider à leur cicatrisation. Elle est également mâchée contre les maux de dents (Bellakhdar, 1997). D'après Gattefossé, (1921), on instille dans les yeux et les oreilles, des gouttes de la décoction, contre les ophtalmies et les otites.

2.5.Composition chimique

M. vulgare produit des traces d'huile essentielle (Acimovic *et al.*, 2020). Le composé principal de la plante est les diterpènes dont « La marrubiine » (Figure n°12), responsable de la majorité des propriétés biologiques de la plante (Fulke *et al.*, 1968). Elle a été découverte en 1842 et fut le premier diterpénoïde et composé majeur à être isolé et caractérisé à partir des feuilles de *M. vulgare* (Ahvazi *et al.*, 2018), elle est produite et s'accumule dans les parties aériennes (Piccoli et Bottini, 2008).

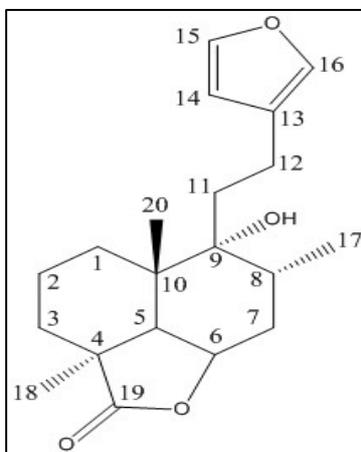


Figure n°12: structure chimique de la marrubiine (Amri *et al.*, 2017).

La plante est connue aussi pour sa haute teneur en composés phénoliques (Acimovic *et al.*, 2020) en particulier les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) (Figure n°13) (Nawwar *et al.*, 1989).

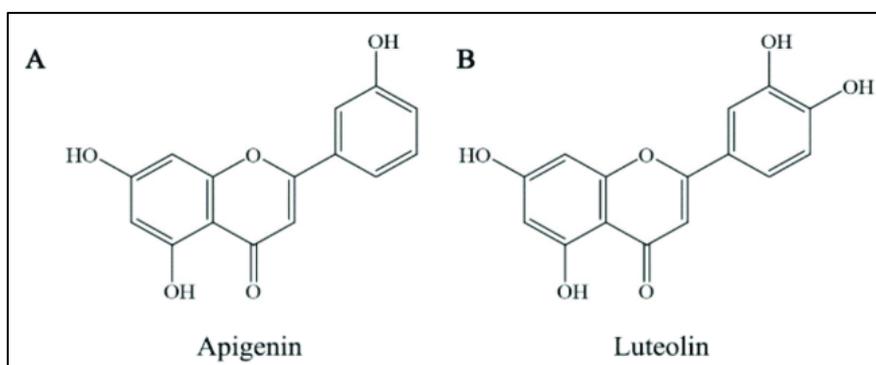


Figure n°13: Les structures chimiques des principaux flavonoïdes présents dans l'espèce *Marrubium vulgare* (Liu *et al.*, 2019)

Chapitre 3

Les activités biologiques des plantes médicinales

Les activités biologiques des plantes médicinales

Les observations populaires sur l'utilisation et l'efficacité des plantes médicinales contribuent de manière significative à la divulgation de leurs propriétés thérapeutiques, de sorte qu'elles sont fréquemment prescrites, même si leurs constituants chimiques ne sont pas toujours parfaitement connus (**Silva et Fernandes-junior, 2010**).

1. Activité antimicrobienne

1.1. Les infections nosocomiales

Les maladies infectieuses représentent une cause importante de morbidité et de mortalité dans la population (**Silva et Fernandes-junior, 2010**). Une infection est la pénétration dans l'organisme d'un agent étranger (bactérie, virus, champignon, parasite) capable de s'y multiplier et d'y induire des lésions pathologiques (**Delamare, 1999**), une infection est dite nosocomiales si elle apparaît au cours d'une hospitalisation, dans un lieu de soins et dans les cliniques dentaires, et si elle était absente avant l'admission, ce critère est applicable à toute infection (**Denis, 2002 ; Grenier, 2009**).

Les infections nosocomiales affectent 3,2 % de tous les patients hospitalisés aux États-Unis, 6,5 % dans l'Union européenne, et la prévalence mondiale est probablement beaucoup plus élevée, entraînant des augmentations significatives de la morbidité, des coûts hospitaliers et jusqu'à 5000 décès par an (**Johnson, 2002 ; Inweregbu et al., 2005 ; Sikora et Zahra, 2021**).

En Algérie, Une enquête de prévalence des infections nosocomiales portant sur l'ensemble des malades hospitalisés a été réalisée, du 8 février au 13 mars 1993, au CHU de Bab El Oued à Alger, parmi les 426 malades hospitalisés, 69 étaient infectés, soit une prévalence de 16.2% (**Bezzaoucha et al., 1994**). Au CHU de Blida, une stratégie de surveillance des infections associées aux soins par enquêtes de prévalence répétitives a été adoptée et réalisée entre 2001 et 2008, 2 200 patients ont été inclus et 107 infections nosocomiales ont été identifiées. La prévalence des infections était respectivement de 9,5 %, 7,0 %, 4,5 %, 3,9 %, 3,0 %, 3,0 %, 5,3 % et 3,5 % dans les 8 enquêtes (**Atif et al., 2009**).

Les infections nosocomiales peuvent apparaître après la sortie de l'hôpital et comprennent également les infections professionnelles susceptibles d'affecter le personnel (**Sikora et Zahra, 2021**). Les centres de contrôle et de prévention des maladies classent globalement les types d'infections nosocomiales comme suit (**Sikora et Zahra, 2021**) :

- Les bactériémies associées aux cathéters veineux ;
- Les infections des voies urinaires associées au cathéter ;
- Les infections de la peau et des tissus mous ;
- Les infections du site opératoire ;
- Les pneumonies sous ventilation assistée.

1.1.1. Les agents pathogènes responsables

L'étiologie des infections associées aux soins est basée sur la source ou le type d'infection et l'agent pathogène responsable, qui peut être bactérien, viral ou fongique (**Sikora et Zahra,**

2021). Les organismes considérés comme une flore résidente normale sur la peau, dans les voies respiratoires supérieures et dans le tractus gastro-intestinal peuvent devenir pathogènes s'ils accèdent à des parties normalement stériles du corps (Johnson, 2002).

Les principaux germes responsables des infections nosocomiales sont les bactéries, représentant la cause dans environ 90% des cas (Stobo *et al.*, 1996), avec la prédominance de l'agent pathogène *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), qui cause jusqu'à 60 % des infections nosocomiales (Inweregbu *et al.*, 2005). Suivi du *Clostridium difficile*, un organisme couramment rencontré dans les cas d'infections nosocomiales, il provoque une diarrhée et une colite associées aux antibiotiques (Inweregbu *et al.*, 2005 ; Sikora et Zahra, 2021). Ainsi que d'autres agents tels que : les entérocoques résistants à la vancomycine *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Legionella* spp, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Serratia marsescens* (Johnson, 2002 ; Inweregbu *et al.*, 2005 ; Khan *et al.*, 2015). En Algérie, les bactéries les plus isolées sont : *Micrococcus* spp. (27.50%), *Corynebacterium* spp. (27.50%), *Staphylococcus* spp. (25%), *Bacillus* spp. (21.25%), *Enterococcus* spp. (20%), *Enterobacter cloacae* (10%), *Klebsiella pneumoniae* (5%) et *Pseudomonas aeruginosa* (3.75%) (Baghdadi *et al.*, 2020).

Les bactéries ne sont pas les seuls agents responsables des infections nosocomiales, les champignons tels que *Candida albicans*, *Aspergillus* spp et *Cryptococcus neoformans* (Pierce, 2005 ; Khan *et al.*, 2017), et les virus tels que le virus de la fièvre hémorragique, virus de l'hépatite, le VIH, les virus respiratoires syncytiaux (VRS) et le nouveau virus de la COVID-19 (SARS-COV-2) (Abacioglu *et al.*, 2000 ; Mlinaric-Galinovic et Varda-Brkic, 2000 ; Panis *et al.*, 2009 ; Ferioli *et al.*, 2020 ; Tsergouli *et al.*, 2020), peuvent aussi être impliqués dans la transmission des infections associées au soins.

➤ Les voies de transmission

- **Par contact** : La voie de transmission la plus courante est le contact, les micro-organismes courants qui peuvent être transmis par contact sont les bactéries multi-résistantes (telles que le SARM, les organismes Gram-négatifs producteurs de BLSE, ERV), le *Clostridium difficile* et le rotavirus (Sikora et Zahra, 2021).
- **Par les voies respiratoires** : La transmission peut se produire lorsque les micro-organismes sont transmis par de grosses gouttelettes (supérieures à 5 microns) et de petites gouttelettes (moins de 5 microns). Les agents pathogènes infectieux qui sont transmis par la voie respiratoire comprennent la grippe, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, le virus de la varicelle, la tuberculose, la rougeole et le nouveau virus de la maladie COVID-19 (SARS-COV-2) (Ferioli *et al.*, 2020 ; Sikora et Zahra, 2021).

➤ Développement d'une infection

Après avoir envahi le corps humain, les micro-organismes doivent se multiplier pour provoquer une infection. L'invasion débute par une phase d'adhérence aux cellules du corps humain, le fait de pouvoir s'adhérer à la surface des cellules permet aux micro-

organismes d'établir un camp de base à partir duquel ils envahissent les tissus. Le degré de gravité de l'infection dépend de différents facteurs (**Bush, 2020**):

- **Production de toxines et d'enzymes** : Certains micro-organismes qui envahissent le corps humain produisent des toxines. Par exemple, la bactérie *Clostridium tetani* dans une plaie infectée produit une toxine responsable du tétanos. Certaines maladies sont provoquées par des toxines produites par les micro-organismes en dehors de l'hôte. Par exemple, des staphylocoques présents dans l'alimentation peuvent produire une toxine qui est responsable d'une intoxication alimentaire suite à l'ingestion.

- **Blocage des défenses de l'organisme** : certains micro-organismes ont la capacité de bloquer les mécanismes des défenses de l'organisme en :

- Interférant au niveau de la production des anticorps ou des lymphocytes T ;
- Se cachant à l'intérieur d'enveloppes protectrices externes (Capsule) empêchant ainsi les globules blancs de les ingérer.
- Résistant à l'éclatement (la lyse) provoquée par les substances qui circulent dans le sang.
- Produisant des substances qui s'opposent aux effets des antibiotiques.

- **Dysfonctionnement du système immunitaire** : Le système immunitaire peut mal fonctionner chez :

- Les personnes nées avec une anomalie héréditaire qui affaiblit le système immunitaire ;
- Les personnes ayant acquis une pathologie plus tard (virus du Sida) ;
- Les personnes qui ont besoin de prendre un médicament qui affaiblit le système immunitaire, tels que les immunodépresseurs ou les corticoïdes.

1.1.2. Les antibiotiques

➤ Définition

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec anti : contre, mikros : petit et bios : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes, et l'adjectif antibiotique (du grec anti : contre, biotikos : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre (**Muylaert et Mainil, 2013**).

➤ Les modes d'action

Les antibiotiques présentent différents mécanismes d'action contre les micro-organismes, ils peuvent agir sur (**Demoré et al., 2012**) :

- La synthèse du peptidoglycane et donc sur la membrane cellulaire (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), les membranes (polymyxines) ;
- La synthèse protéique (macrolides et apparentés, aminosides, phénicolés, tétracyclines) ;
- La synthèse des acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés) ;
- Le métabolisme intermédiaire (sulfamides, triméthopime).

1.1.3. La consommation des antibiotiques en Algérie

En Algérie, la prévalence des traitements antibiotiques retrouvés étaient 2 à 3 fois plus élevées que celles observées dans les CHU/CHR français en 2012, ceci est liée à l'augmentation de la prévalence des infections associées aux soins et des prescriptions antibiotiques injustifiées (**Atif et al., 2016**). Une enquête a été menée durant la période du 3 au 11 mai 2016 au CHU d'Oran, la prévalence des traitements antibiotiques était de 71.9%. la prescription était faite dans un contexte curatif pour 52% des patients, et 43% des patients ont reçu une antibioprophylaxie (traitement de prévention) (**Guertarni et al., 2019**). L'utilisation abusive des antibiotiques favorise souvent l'évolution des bactéries vers la résistance. Par conséquent, un plan d'action de bon usage des antibiotiques et une surveillance de prescription doivent impérativement être élaborés et suivis au niveau des établissements hospitaliers en Algérie.

1.2. La résistance microbienne aux antibiotiques

Les bactéries associées aux infections nosocomiales sont souvent résistantes aux antibiotiques, en particulier les antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans le milieu hospitalier (**Johnson, 2002**), en effet, l'émergence d'organismes multi-résistants aux médicaments est une autre complication observée avec les infections associées aux soins (**Sikora et Zahra, 2021**). Une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches (**Muylaert et Mainil, 2013**).

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle comme elle peut être acquise, la résistance naturelle est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, donc, partie du patrimoine génétique normal du germe (**Yala et al., 2001**).

Contrairement à la résistance naturelle, les espèces microbiennes présentent la capacité génétique d'acquérir et de transmettre une résistance contre les antibiotiques actuellement disponibles (Résistance acquise), car il existe de nombreux rapports sur l'isolement de bactéries connues pour être sensibles aux médicaments couramment utilisés et devenues multi-résistantes à d'autres médicaments disponibles sur le marché (**Silva et Fernandes-junior, 2010**). Cette résistance peut provenir par une mutation chromosomique, soit dans un gène de régulation, de production d'enzymes, soit dans un gène de structure d'une enzyme, ou par l'acquisition de matériel génétique étranger par le biais de plasmides, de bactériophages ou de transposons ((**Mainardi et al., 1996 ; Davies, 1997**).

1.2.1. Les mécanismes de la résistance

Trois mécanismes principaux sont responsables de la résistance aux antibiotiques (**Yala et al., 2001**) :

- **Modification de la cible des antibiotiques :**

Naturelle : chez le lactobacille (bactérie à Gram positif) qui est naturellement résistant à la Vancomycine et la Teicoplanine par modification de la cible.

Acquise : chez le *Staphylococcus aureus* à la méticilline et touche l'ensemble des β lactamines.

- **Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques :**

Naturelle : chez *Klebsiella* spp qui présente une résistance aux aminopénicillines (Ampicilline - Amoxicilline) et aux carboxypénicilline (Ticarcilline). Cette résistance est due à une pénicillinase constitutive.

Acquise : Chez les entérobactéries, le phénotype de résistance est dû à la production de pénicillinase plasmidique.

- **Diminution de la perméabilité bactérienne aux antibiotiques**

Naturelle : chez Les streptocoques et les entérocoques qui sont naturellement résistants aux aminosides.

Acquise : chez 10% des *Pseudomonas aeruginosa* qui présente une résistance acquise à l'Imipenème.

1.2.2. Les bactéries multi-résistantes

Une espèce bactérienne peut être résistante à plusieurs antibiotiques selon des mécanismes différents. *Staphylococcus aureus* est résistante à la méthicilline par modification de la cible et peut être résistante aux aminosides par production d'enzyme (Yala *et al.*, 2001). La multi-résistance est un phénotype complexe dont la caractéristique prédominante est la résistance à un large éventail d'antibiotiques (Gerlach *et al.*, 1986). Ce phénomène est en augmentation, et ceci est dû à l'utilisation accrue, répétée, inappropriée et incontrôlée des antibiotiques, y compris l'administration de doses sous-optimales, une durée de traitement insuffisante et un mauvais diagnostic (WHO, 2002).

La multi-résistance chez les bactéries peut être générée par l'un des deux mécanismes (Nikaido, 2009) :

- Premièrement ; ces bactéries peuvent accumuler plusieurs gènes, chacun codant pour la résistance à un seul médicament, dans une seule cellule. Cette accumulation se produit généralement sur les plasmides de résistance (R).
- Deuxièmement : la résistance à plusieurs antibiotiques peut également se produire par l'expression accrue de gènes qui codent pour les pompes d'efflux, extrudant une large gamme d'antibiotiques.

1.3. Propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales

La plupart des plantes contiennent plusieurs composés aux propriétés antimicrobiennes pour la protection contre les agents agresseurs, en particulier les micro-organismes (Silva et Fernandes-junior, 2010). L'activité antimicrobienne des huiles et des extraits de plantes a constitué la base de nombreuses applications, y compris la conservation des aliments crus et transformés, les produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles Hammer *et al.*, 1999).

Les huiles essentielles ont un grand pouvoir antimicrobien, ceci est dû à leur solubilité dans la bicouche phospholipidique des membranes cellulaires. Les terpenoïdes, présents dans les huiles essentielles, se caractérisent par leur labilité et interfèrent avec les réactions enzymatiques du métabolisme énergétique. Parmi les composés actifs présents dans certaines huiles essentielles, par exemple : le thym contient du thymol et du carvacrol, le clou de girofle contient de l'eugénol et de l'isoeugénol, et l'origan contient du carvacrol et du terpinénol-4. Dans certains cas, les terpènes d'essences solubles dans l'eau ont un pouvoir antibactérien plus élevé que d'autres (Knobloch *et al.*, 1989 ; Silva et Fernandes-junior, 2010).

Les composés phénoliques, sont également connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999), ils sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes en modifiant ainsi les équilibres enzymatiques, et il existe une relation étroite entre les flavonoïdes et les activités antibactériennes. En effet, les flavonoïdes se complexent avec les protéines extracellulaires et solubles et se complexent avec les parois cellulaires bactériennes, et perturbent ainsi les membranes microbiennes (Djahra *et al.*, 2012 ; Djahra *et al.*, 2013). Les tanins possèdent un effet inhibiteur et létal sur différentes souches microbiennes, leur mode d'action est lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire, et ils ont la capacité d'empêcher le développement des colonies bactériennes par la destruction de leurs parois cellulaires (Cowan, 1999 ; Djahra *et al.*, 2013).

➤ Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des composés naturels sont liés à : la désintégration de la membrane cytoplasmique ; la déstabilisation de la force proton motrice ; au flux d'électrons ; au transport actif et à la coagulation du contenu cellulaire (Burt, 2004) (Figure n°14).

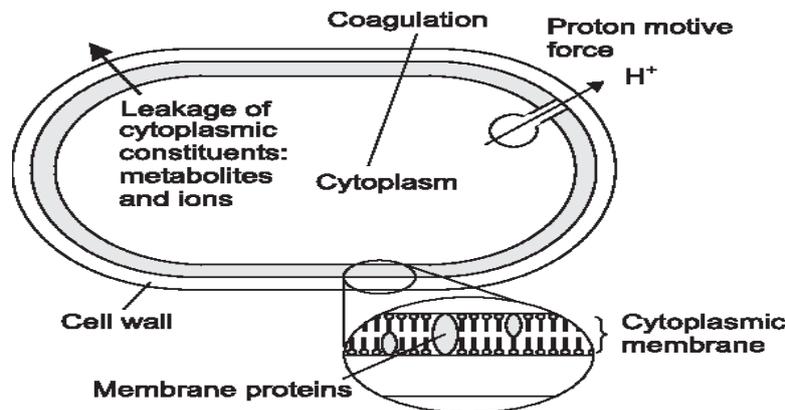


Figure n°14: Les sites d'action des composés naturels sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

2. Activité antioxydante

La sagesse populaire qui recommande de se méfier de ses meilleurs amis s'applique parfaitement à l'oxygène, molécule dont on ne pourrait se passer au-delà de quelques minutes et qui est pourtant à l'origine de métabolites notoirement toxiques. Notre relation avec

l'oxygène est cependant plus compliquée que cela et remonte aux origines de la vie (**Barouki, 2006**).

2.1. Le stress oxydatif

Le concept selon lequel l'oxygène, molécule indispensable pour la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés activés (radicaux libres) est encore mal perçu dans le milieu médical. Pourtant, de très nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont plus que suggéré le rôle de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse (**Pincemail et al., 2002**).

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense, dans ce cas on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre (**Favier, 2003**). Lorsqu'il y a un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant », et ceci conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (**Pincemail et al., 1999**). Cette situation peut résulter (**Pincemail et al., 2002**) :

- D'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie–reperfusion, vieillissement) ;
- D'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase) ;
- D'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ;
- D'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...).

Le stress oxydant par définition, c'est un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, et il est considéré comme la cause unique du vieillissement ou de la survenue de pathologies associées à l'âge (**Barouki, 2006**).

2.1.1. Pathologies liées au stress oxydatif

Tableau n° 1: exemples de pathologies liées au stress oxydatif (Bensakhria et al., 2018)

Maladies où le stress oxydatif est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydatif est le facteur déclencheur	Maladies entraînant un stress oxydatif secondaire
Cancer, Auto-immunité, Cataracte.	Maladie d'Alzheimer, Stérilité masculine, Rhumatismes, athéromes, asthmes.	Insuffisance rénale, Maladie de Parkinson, Diabète.

2.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003). Des oxydants chlorés (HOCl) sont libérés par les macrophages et ont une activité bactéricide importante (Barouki, 2006).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonson *et al.*, 2007). En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électron, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Cette réactivité chimique (Figure n°) est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants (Goudable et Favier, 1997). Toute réaction impliquant de l'O₂ et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des radicaux (Barouki, 2006), c'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est préféré à celui de radicaux libres (Goudable et Favier, 1997). Les ERO sont donc la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme, leur production est permanente et physiologique (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, en présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde, qui est un radical modérément réactif. Le monoxyde d'azote (NO) interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxyde d'azote, composé extrêmement réactif et toxique (Barouki, 2006). Les principales ERO : l'oxygène singlet ¹O₂, l'anion superoxyde O₂^{•-}, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle •OH et l'ozone O₃ (Bensakhria, 2018).

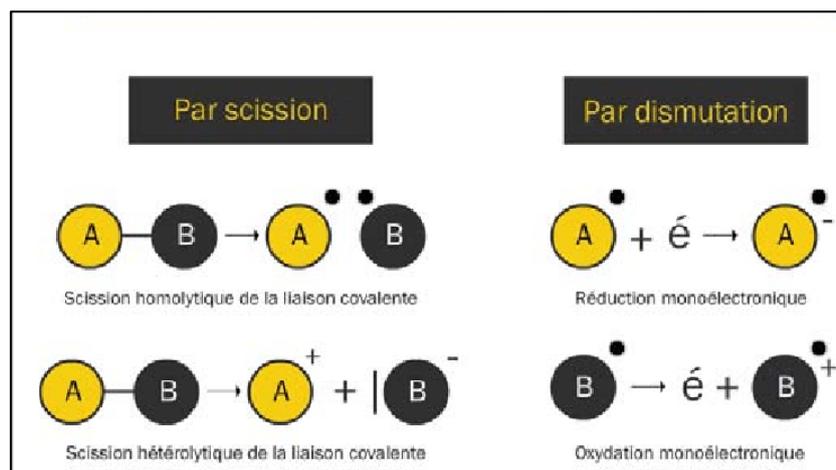


Figure n°15 : Réactions de formation des radicaux libres. (Bensakhria, 2018)

2.3. Les antioxydants

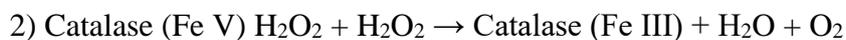
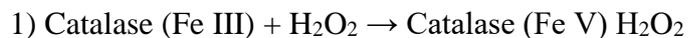
Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce dernier (**Bensakhria, 2018**). Ceux sont des molécules de défense présentes dans la cellule, notamment le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines... elles ont la capacité de neutraliser les radicaux libre et empêcher leur accumulation (**Barouki, 2006**).

2.3.1. Mécanismes d'action des antioxydants

Les défenses anti-oxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques (superoxydes dismutases, catalase, glutathion peroxydase) et non enzymatiques (vitamines C et E, polyphénols...) (**Leverve, 2009**).

➤ Système enzymatique :

Les défenses antioxydantes enzymatiques incluent trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase (GPX) (**Vamecq et al., 2004**). Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en H_2O_2 et en $OH + OH$ (**Goudable et Favier, 1997**). La catalase est une enzyme héminique ubiquitaire située à l'intérieur des globules rouges, elle élimine H_2O_2 par dismutation qui se fait en deux étapes (**Bensakhria, 2018**) :



La glutathion peroxydase, séléno-protéine ubiquitaire qui élimine 70% des proxydes organique et 94% de H_2O_2 par réduction (**Vamecq et al., 2004 ; Bensakhria, 2018**)

➤ Système non-enzymatique :

Les défenses antioxydantes non enzymatiques font référence à la neutralisation de l'espèce oxydante par une espèce dite antioxydante, Ils incluent toute une série de composés naturellement apportés par l'alimentation, comme par exemple la vitamine E et la vitamine C (**Vamecq et al., 2004**), les polyphénols (**Rolland, 2004**), la Provitamine A (caroténoïdes), la vitamine P (flavonoïdes), Coenzyme Q_{10} , Les oligoéléments (Se et Zn comme cofacteurs) et la glutathion (un cofacteur de l'enzyme GPX) (**Bensakhria, 2018**).

➤ Autre mécanismes :

Réparation de l'ADN : Lorsque les antioxydants s'avèrent « insuffisants » ou défaillants, la cellule possède un autre moyen pour réparer les lésions causées et empêcher ainsi le risque de mutagenèse et éventuellement de cancer (**Bensakhria, 2018**), la réparation de l'ADN fait intervenir plusieurs mécanismes, par exemple :

- Système de réparation des misappariements.

- Réparation par excision ou resynthèse.
- Réparation par excision des nucléotides.
- Recombinaison.

3. Activité anti-inflammatoire

3.1. L'inflammation

L'introduction d'un agent agresseur, quelle que soit sa nature, dans un organisme induit une perturbation dans l'équilibre. Cette perturbation s'exprime par des modifications à la fois vasculaires, cellulaires, intercellulaires et humorales. L'ensemble de ces perturbations, dites réactionnelles, constitue l'inflammation (**Parodi, 1993**). Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : Rougeur, chaleur, douleur, et lésion fonctionnelle énoncés par Aulus Cornelius Celsius (**Schorderet et al., 1998**).

La réaction inflammatoire (**Figure n°16**) est une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme à une agression tissulaire non spécifique. Cette réaction peut avoir plusieurs origines : bactérienne, virale, parasitaire, tumorale, traumatique (blessure, intervention chirurgicale), physique (brûlures, irradiations), nécrose tissulaire (infarctus), immunologique (maladie auto-immune, rejet de greffe) (**Engler, 1993**).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire (**Bounihi, 2016**).

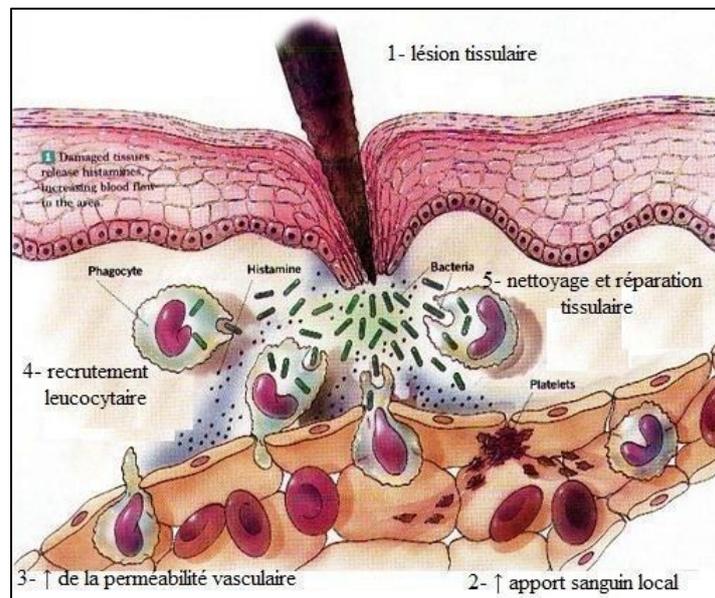


Figure n°16 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (Bounihi, 2016).

Les facteurs déclenchant l'inflammation sont multiples et variées, ils peuvent être exogènes (**Tehami, 2017**) :

- Agent biologique : contamination par des micro-organismes ;
- Agent physique : traumatisme, chaleur, froid, radiations ;
- Agent chimique : toxines, venins...

Ils peuvent aussi être endogènes (**Bounihi, 2016**) :

- Causes trophiques: elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation ;
- Conflits immunitaires: rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques (**Revillard, 2001**).

3.2. Les types d'inflammation

3.2.1. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse à court terme qui aboutit généralement à la guérison, les leucocytes infiltrant la zone endommagée, suppriment le stimulus et réparent le tissu (**Weiss, 2008**). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. La réaction inflammatoire peut être artificiellement divisée en trois phases (**Bounihi, 2016**) :

- **La phase vasculaire et plasmatique**

Caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème, un dégagement de chaleur locale. Il se produit une altération des micros capillaires par la libération des cytokines et de facteurs vasoactifs (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine, dérivés du complément) entraînent une vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire et par conséquent l'exsudation plasmatique (**Cousins et Poweer, 1999 ; Buckley et al., 2014**).

- **La phase cellulaire**

Cette phase fait suite à la réponse vasculaire, elle implique surtout les cellules endothéliales et les leucocytes circulants (**Kada, 2018**). La migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes et la libération de cytokines sont à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération de médiateurs (**Kidd et Urban, 2001**). Cette activation se caractérise par un afflux de leucocytes, des polynucléaires neutrophiles (PMNs) dans un premier temps puis des monocytes (**Kada, 2018**). Cette migration est facilitée par la dégradation de la membrane basale par les métallo-protéases et d'autres enzymes libérées lors de la dégranulation des phagocytes (**Ellis et Murphy, 2001**).

- **La phase de régénération**

Débuté par une élimination de l'agent causal et des débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire de façon interne (phagocytose, pinocytose) ; externe par les orifices naturels ou par formation d'abcès : artificielle (incision chirurgicale). Puis réparation tissulaire par cicatrisation, qui aboutit à un tissu conjonctif néoformé qui remplace le tissu détruit, ou régénération, lorsque la destruction d'un tissu épithélial est partielle (**Bounihi, 2016**). La résolution de l'inflammation est un processus finement régulé, elle est médiée par la décroissance de médiateurs pro-inflammatoires et la production précoce de

médiateurs anti-inflammatoires. Ces médiateurs contra-régulateurs et pro-résolvants régulent le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (**Barnig, 2016**).

3.2.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique, en revanche, est une réponse prolongée, dérégulée et inadaptée. Une telle inflammation persistante est associée à de nombreuses affections et maladies humaines chroniques, notamment l'allergie, l'athérosclérose, le cancer, l'arthrite et les maladies auto-immunes (**Weiss, 2008**). Elle correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années (**Serhan et al., 2010**) et conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes. L'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus (**Bounihi, 2016**).

3.3. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogènes. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation (**Diallo, 2019**). Ils sont classés en deux groupes : anti-inflammatoires stéroïdiens (cortisone et dérivés), anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

3.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes (**Tableau n°2**), constituent une classe des médicaments qui sont des dérivés synthétiques des hormones naturelles sécrétées par les glandes surrénales « la cortisone », ce sont des puissants anti-inflammatoires et sont doués également de propriétés immuno-modulatrices et antiallergiques (**Coutinho et Chapman, 2011**). Les corticoïdes constituent une classe thérapeutique très puissante qui inhibe toutes les étapes de la réaction inflammatoire aussi bien précoces que tardives (**Kernouf, 2019**). Ils représentent le traitement le plus efficace des maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (**Kessel et al., 2014**).

Il est à noter que l'utilisation prolongée des corticostéroïdes a des inconvénients, ils sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections, des troubles psychiatriques, l'ostéoporose, la nécrose articulaire aseptique, l'insuffisance surrénalienne, les effets gastro-intestinaux, hépatiques et ophtalmologiques (**Buchman, 2001 ; Capet et al., 2001**).

Tableau n°2 : Les principaux corticoïdes (Henzen, 2003)

Corticoïdes	Nom commercial
Cortisol (hydrocortisone)	Hydrocortone, Solu-cortef
Cortisone	Cortison CIBA
Prednisone	Prednison Streuli
Prednisolone	Spiricort, Ultracorten
Méthylprednisone	Urbason, Solu-Medrol
Bétaméthasone	Celestene, Diprostene

3.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Tableau n°3**) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Ces médicaments ont un effet antalgique et antipyrétique associé à un effet anti-inflammatoire (**Kada, 2018**). Le mode d'action commun de tous les AINS est la diminution de la production de prostaglandines du fait de l'inhibition de la cyclooxygénase. Les prostaglandines sont directement impliquées dans l'inflammation, la douleur et l'hyperthermie (**Bounihi, 2016**).

Les AINS sont le groupe le plus important de médicaments impliqués dans les réactions d'hypersensibilité aux médicaments, les symptômes cutanés sont les plus fréquents, l'urticaire et l'anaphylaxie étant les manifestations cliniques typiques, ainsi que des réactions spécifiques à un organe telles que l'hépatite ou la pneumonie (**Cornejo-Garcia et al., 2009**).

Tableau n° 3: Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Wallace et Staats, 2004)

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
Salicylates	Acétyle Salicylique Diflusal	Aspirine, Dolobid
Dérivés d'acide propionique	Ibuprofène Fenoprofène calcium Flurbiprofène Ketoprofène	Ibuprofène
Dérivés d'acide acétique	Diclofénac	Voltarène
Indoles	Indométacine Tolmetin Sulindac	Indocine Tolectine Clinoril

3.4. Propriétés anti-inflammatoires des plantes médicinales

La nature est une riche source de composés aux propriétés anti-inflammatoires. Dans la littérature moderne, plusieurs espèces de plantes médicinales ont montré des actions anti-inflammatoires et immuno-modulatrices importantes (**Tasneem et al., 2018**), leurs composés bioactifs peuvent servir de matrice pour la synthèse de nouveaux médicaments anti-inflammatoires tout en ayant des effets secondaires minimes et des effets pharmacologiques très puissants (**Agyare et al., 2013**). Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la

cyclooxygénase et la lipooxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (**Bounihi, 2016**). Les molécules dotés d'effets anti-inflammatoires dans les plantes sont principalement les polyphénols, les stérols et les terpènes (**Adedapo et al., 2009**). Une étude a montré que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes (**Karlsen et al., 2007**). Les polyphénols ont des modes d'action multi-cible, ses substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipooxygénase (**Yoon et Baek, 2005**). Des travaux menés *in vitro* ont montré que les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production de TNF- α par des macrophages stimulés par le LPS (**Muzamal et al., 2013**). Les terpenoïdes ont également montré une activité anti-inflammatoire sur plusieurs modèles d'inflammation (**Baheti et al., 2011**). L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été mise en évidence par de nombreux travaux, elle est due aux monoterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes hydrocarbonés et aux alcools sesquiterpéniques (**Chao et al., 2005**).

Des études menées chez l'homme sain ont montré qu'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma (**Salas-Salvado et al., 2008**) et que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma dû à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN (**Nantz et al., 2006**).

4. Activité insecticide

4.1. Les pucerons

Les pucerons constituent un petit groupe de 4500 espèces dans l'immense monde des insectes, ils sont distribués dans le monde entier mais sont plus fréquents dans les zones tempérées du nord. Ils sont apparus il y a environ 280 millions d'années et sont connus pour être de redoutables ravageurs agricoles (**Bonnemain, 2010**). Insectes de type piqueurs-suceurs, les pucerons s'alimentent exclusivement aux dépens de la sève élaborée, ils insèrent leurs stylets dans les tissus de la plante qui progressent entre les cellules jusqu'à atteindre le phloème et occasionnent des dommages tant directs qu'indirects aux plantes (**Harmel et al., 2008**) :

- **Dégâts directs** : Le puceron effectue des piqûres dans la plante pour atteindre les tubes criblés. Cette perforation et l'injection d'une salive liquide dans les tissus végétaux peuvent avoir des effets toxiques responsables de perturbations de nature physiologique se traduisant par des crispations, des dépigmentations des feuilles et la formation de galles (**Harmel et al., 2008**).

- **Dégâts indirects** : Le miellat excrété par les pucerons constitue un milieu favorable au développement des champignons saprophytes responsables des fumagines, et peut également induire des phénomènes de dessiccation (**Huang et al., 1983**). Les pucerons véhiculent de nombreux virus, les dégâts causés sont localisés au niveau des feuilles, avec l'apparition de taches nécrotiques, de mosaïques, d'enroulement ou de dépigmentations foliaires. Certains virus induisent également des nécroses au niveau des tubercules qui les rendent non commercialisables (**Harmel et al., 2008**) .

4.2. *Aphis spiraecola*

Aphis spiraecola, est une espèce de puceron polyphage avec une distribution mondiale, c'est un ravageur des agrumes (Cole, 1925), des pommes (Pfeiffer *et al.*, 1989) et des plantes ornementales (Wang et Tsai, 2000). Il a comme hôtes primaires les *Spiraea* spp d'où son appellation « *Aphis spiraecola* ». Et en agriculture, le genre *Citrus* est l'hôte le plus important pour cette espèce d'où son appellation également « *Aphis citricola* » (Andreev *et al.*, 2009). Il présente des phénomènes de résistances aux insecticides et il est très dommageable aux agrumes en Algérie (Saharaoui et Hemptienne, 2009). *Aphis spiraecola* apparait à la fin du mois d'Avril sur *Citrus* (Aroun, 2015), il est responsable de la transmission du virus de la Tristeza des agrumes (Bové, 1967).

L'origine d'*Aphis spiraecola* est l'Extrême-Orient. L'insecte a été découvert en Amérique du Nord en 1907, en Australie en 1931, dans la région méditerranéenne vers 1939 et en Afrique en 1961 (Andreev *et al.*, 2009).

4.2.1. Classification

Selon Mohammedi-Boubekka, (2015), *Aphis spiraecola* est classée comme suit :

- Super ordre : Hémiptéroïdes
- Ordre : Hémiptères
- Super- famille : Aphidoïdea
- Famille : Aphididae.
- Sous famille : Aphidinae
- Tribu : Aphidini
- Genre : *Aphis*
- Espèce : *Aphis spiraecola*

4.2.2. Description

Aphis spiraecola, est un puceron de couleur vert pomme mesurant 1.2 à 2.2 mm. L'ailé est vert avec une tête brune, mesure 1.2 à 2.3 mm. Il a un corps ovale et un peu aplati avec des téguments mous. Des yeux composés et des antennes longues et fines. Dans la région spinopleurale de l'abdomen, on trouve des sclérites marginaux circulaires et des postcorniculaires. Les cornicules sont droites, noires, un peu plus longues que la queue. Cette dernière est de couleur noire, allongée, arrondie à l'extrémité et resserrée vers le quart inférieur (Kindlmann *et al.*, 2007 ; Sullivan, 2008 ; Mohammedi-Boubekka, 2015).

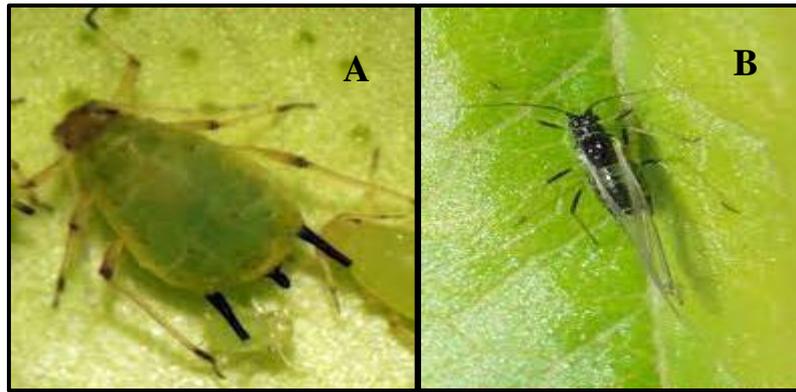


Figure n°17 : *Aphis spiraecola* adulte aptère (A) et ailé (B). (Sekkat, 2015)

4.2.3. Cycle biologique

Aphis spiraecola est anholocyclique, il peut se reproduire à la fois asexuellement et sexuellement. Dans les régions tempérées, la reproduction sexuée s'effectue à l'automne et aboutit à la production d'œufs hivernants, qui éclosent au printemps suivant et lancent un autre cycle (Turpeau *et al.*, 2015). Plusieurs générations se développent au cours de l'année sur *Citrus* (Abdreev *et al.*, 2009). L'alternance des phases sexuée et asexuée est sous le contrôle des paramètres environnementaux (Williams et Dixon, 2007).

4.3. Moyens de lutte contre les pucerons

L'utilisation des pesticides dans la lutte contre les pucerons engendre des problèmes de résidus, des phénomènes de résistance, ainsi qu'un impact sur les auxiliaires naturels et l'environnement (Saharaoui et Hemptienne, 2009). A la fin des années 80, 423 espèces d'insectes et d'acariens sont devenus résistants aux pesticides (Hewage *et al.*, 1997). *Aphis spiraecola* est devenu résistant à un certain nombre d'insecticides, y compris le pirimicarbe (George *et al.*, 2019). De plus, l'utilisation de quantités croissantes d'insecticides chimiques représente un risque pour la santé humaine, contamine les eaux de surface ainsi que les eaux souterraines, et contamine le sol en ayant un effet sur sa fertilité (Aktar *et al.*, 2009). Il convient dès lors de développer des méthodes de lutte alternatives, novatrices et efficaces. L'utilisation d'insectes aphidiphages tels que des prédateurs ou des insectes hyménoptères parasitoïdes a été envisagée (Harmel *et al.*, 2008). Le recours à certains virus, bactéries ou champignons entomopathogènes est également un moyen de lutte contre les pucerons (Ying *et al.*, 2003), mais, la pratique de la lutte biologique reste encore à ce jour en Algérie à la phase expérimentale (Saharaoui et Hemptienne, 2009). Les plantes médicinales peuvent efficacement être utilisées comme bio-insecticide pour lutter contre les ravageurs en raison de leurs effets amicaux avec l'environnement, et avec moins d'effet secondaires que les insecticides synthétiques actuellement disponibles (Ahmad *et al.*, 2013).

4.4. Propriétés insecticides des plantes médicinales

Les plantes sont utilisées comme protecteur traditionnel depuis des siècles, divers produits végétaux ont été étudiés pour leur activité insecticide (Ahmad *et al.*, 2013). Trois familles ; *Apiaceae*, *Asteraceae* et *Lamiaceae*, et plus de dix espèces végétales voir plus de 70% des

espèces étudiées, possèdent un pouvoir insecticide (**Amoabeng et al., 2019**) et peuvent être utilisées comme bio-pesticides.

Les plantes possèdent des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les composés phénoliques et les huiles essentielles dont les terpénoïdes, qui peuvent avoir une activité sur les insectes (**Koul, 2004**). Les monoterpénoïdes ; en raison de leur nature hautement volatile, ils ont une activité insecticide importante qui pourrait être utile pour lutter contre les ravageurs (**Ahmad et al., 2013**). Tout de même, le limonène présente des effets toxiques contre les moustiques (**Hebeish et al., 2008**). Le mélange thymol et carvacrol peut être considéré comme un ingrédient actif pour le développement d'un bio-insecticide (**Youssefi et al., 2019**). En effet, des analyses faites sur le carvacrol, d'une part, ont montré son efficacité insecticide et qu'il peut être utilisé comme agent de lutte contre les ravageurs avec une valeur potentielle ; il ne laisse pas de résidus car il se dégrade par lui-même dans l'environnement (**Tang et al., 2011**). D'autre part, des analyses ont montré l'efficacité insecticide du thymol et ses dérivés et les interactions biochimiques qui existent entre eux établissent les tendances de la résistance et le mode d'action possible (**Pengsook et al., 2021**). Les composés phénoliques possèdent de forts pouvoirs insecticides (**Hashim et Devi, 2003 ; Boualem et al., 2017**) ; Les flavonoïdes ont été signalés pour avoir une activité ovicide et insecticide remarquable, ils peuvent devenir une source potentielle de bio-pesticides pour une stratégie de lutte contre les ravageurs agricoles (**Upasani et al., 2003 ; Mendki et al., 2005**). Les saponosides, à leur tour, parmi les hétérosides ont été aussi signalés pour avoir un potentiel pesticide très intéressant, leur activité est due à leur interaction avec le cholestérol provoquant ainsi une perturbation de la synthèse des ecdystéroïdes (**Chaieb, 2010**).

Les plantes médicinales, en tant que bio-pesticides sont relativement inoffensifs pour les espèces non ciblées en raison de leur dégradation rapide, de leur caractère sélectif et du risque réduit de résistance aux insecticides (**Amoabeng et al., 2019**).

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre 4 : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Récolte :

Les espèces végétales ont été récoltées durant le mois de mai 2019 de deux régions de l'ouest algérien, *Ammi visnaga* a été récoltée de la région de Béni-saf, située à l'ouest de la wilaya de Ain Témouchent et *Marrubium vulgare* a été récoltée de la région de Sidi Bel Abbès (Figure n°18). Les coordonnées géographiques sont présentés ci-dessous (Tableau n°4)

Tableau n°4: données géographiques de la récolte des espèces végétales étudiées

Espèce végétale	Région	Coordonnées géographiques
<i>Ammi visnaga</i> L.	Béni-saf (La forêt Fantaguerra)	Altitude : 25m, longitude 1°23'1''O Latitude : 35°18'8''N
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Sidi Bel Abbès	Altitude : 483m, longitude : 0°38'29''O Latitude : 35°12'0''N

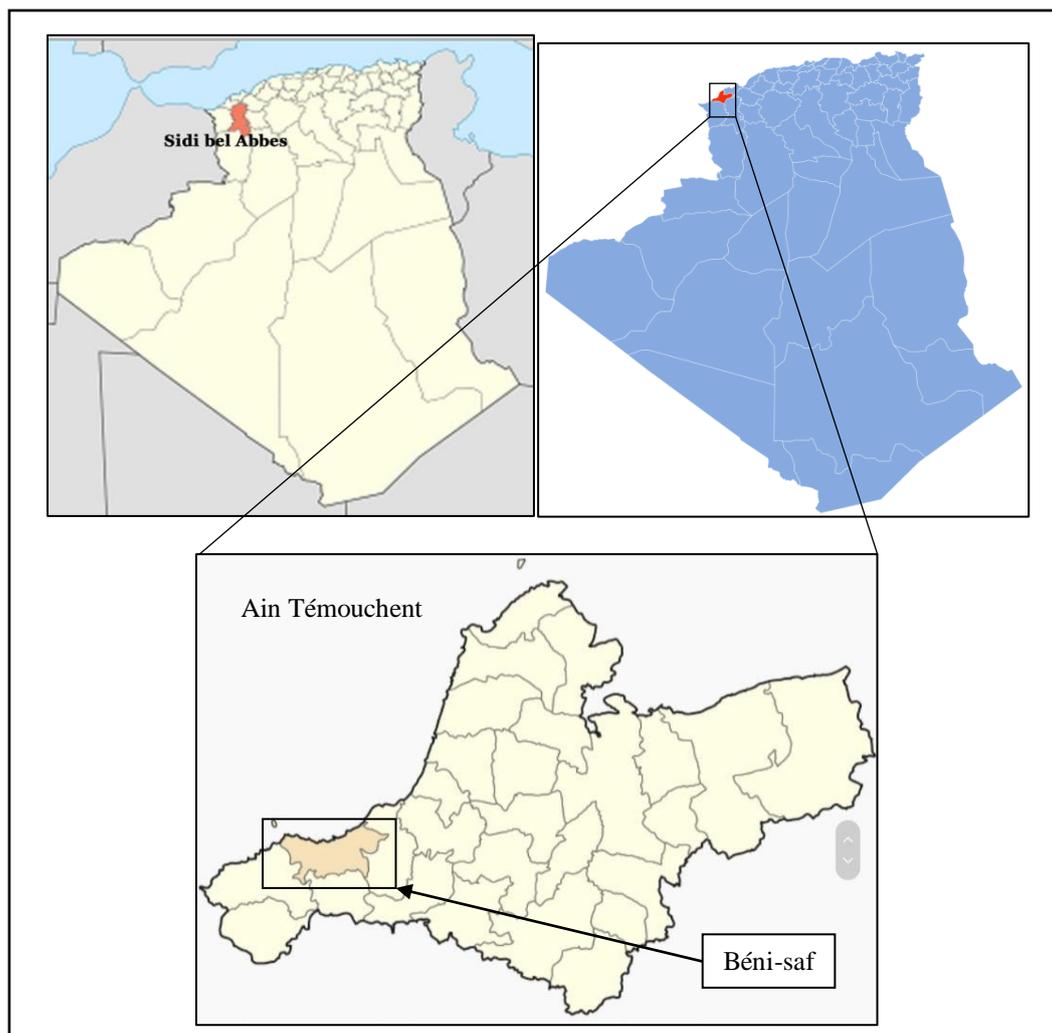


Figure n° 18: Situation géographique des régions de collecte des plantes étudiées

Les deux espèces ont été identifiées par Mr. Hachemi BENHASSAINI, professeur à l'université Djillali Liabès-Sidi Bel Abbès. Un spécimen de référence a été déposé au laboratoire de microbiologie et biologie végétale, Mostaganem, (A.V-A.A.27-2019) et (M.V-A.A.27-2019) pour *Ammi visnaga* et *Marrubium vulgare* respectivement.

Le matériel végétal est ensuite lavé pour éliminer toute trace de terre et recouverts de papier-peint pour éviter l'accumulation des moisissures, et séché à l'ombre pendant 15 jours. La température de séchage est comprise entre 22 et 25°C (Ouari *et al.*, 2015).

1.2. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique a pour but de mettre en évidence la composition chimique d'une plante afin de détecter les classes de composés existants dans les différents organes des plantes. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

L'analyse phytochimique a été réalisée sur la partie aérienne d'*Ammi visnaga* et de *Marrubium vulgare* en utilisant les tests standards selon les protocoles de Trease et Evans (1987), Debray *et al.*, (1971) ; Paris *et al.*, (1969) Rizk (1982) et Cavé (1993).

1.2.1. Les flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5mL de l'extrait éthanolique avec 1mL de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes.

1.2.2. Les alcaloïdes :

La réaction de détection des alcaloïdes est mise en évidence par une macération de 24 heures de 2 grammes de poudre végétale mélangés à 50mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 50%. Le mélange est filtré et rincé à l'eau de manière à obtenir 50mL de filtrat. Ensuite on a pris deux tubes à essai dans lesquels 1mL du macéra est introduit.

Dans le tube n° 1, ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer ;

Dans le tube n° 2, ajouter 5 gouttes de réactif de Wagner ;

La présence des alcaloïdes est traduite par l'apparition d'un précipité blanc dans le tube n°1 et brun dans le tube n°2.

1.2.3. Les tanins :

La réaction de détection des tanins est mise en évidence par l'ajout de 2mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ (1 %) à 1mL de l'extrait éthanolique.

L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tanins galliques, et la verte ou bleu-verte est celle des tanins cathéchiques.

1.2.4. Les coumarines :

Dans un tube contenant quelques gouttes d'eau distillée ajouter 1g de poudre végétale. Avec du papier imbibé de NaOH dilué recouvrir le tube et porter à ébullition. La présence des coumarines est caractérisée par l'apparition d'une fluorescence jaune après examen sous ultra-violet.

1.2.5. Stérols et triterpènes :

La présence des stérols et triterpènes est mise en évidence par la réaction de Liebermann-Burchardt, 10 mL de l'extrait éthanolique est évaporé à sec et le résidu est ensuite dissout dans un mélange de 5mL d'anhydride acétique ($C_4H_6O_3$) et de 5mL de chloroforme ($CHCl_3$). Le mélange est filtré, le filtrat est traité par quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré.

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des stérols et triterpènes.

1.2.6. Les anthocyanes :

Pour mettre en évidence la présence des anthocyanes, un volume de 2mL d'extrait aqueux est additionné à 2mL de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes.

1.2.7. Composés réducteurs :

La détection des composés réducteurs consiste à traiter 1 mL de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. La formation d'un précipité rouge brique indique que le test est positif.

1.2.8. Les saponosides :

Pour détecter la présence des saponosides, 1g de poudre végétale est ajoutée à 100 mL d'eau distillée et porté à ébullition pendant 15 minutes, après refroidissement la suspension est filtrée puis complétée à 100 mL par de l'eau distillée.

Dans une série de 10 tubes à essais, ajouter des volumes allant de 1 à 10 mL de décocté successivement. Chaque tube est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée puis est agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min, la hauteur de la mousse dans chaque tube est mesurée. Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de 1 cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$IM = 1000/N$$

IM : Indice de Mousse.

N : nombre de tube dans lequel la mousse est de 1 cm.

2. Les huiles essentielles

2.1. Hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été réalisée par la méthode de l'hydrodistillation, à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**figure n°19**). Selon le protocole décrit par **Khalfallah et al., (2011)**, elle consiste à introduire 200g de matériel végétale dans un ballon de 2L contenant de l'eau distillée, le tout est porté à ébullition pendant 3 heures, la vapeur chargée d'huile essentielle traverse le réfrigérant et se condense avant de chuter dans l'ampoule de décantation. L'huile se sépare de l'eau par différence de densité. L'huile obtenue est conservée à une température de congélation dans des tubes en verre opaque.

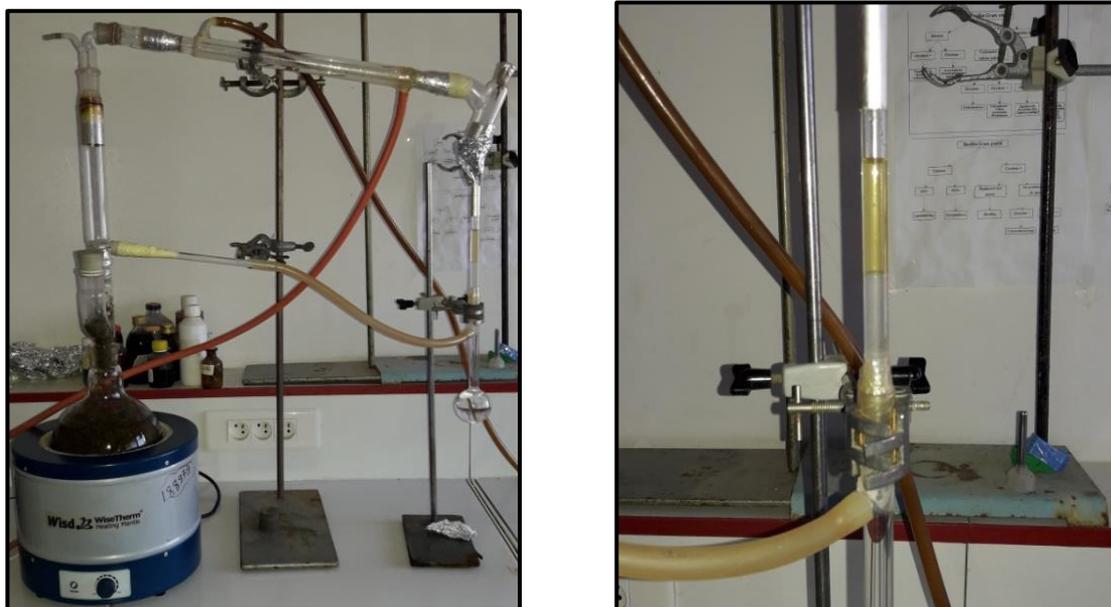


Figure n°19 : Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

2.2. Calcule du rendement

Le rendement en huile essentielle est exprimé en pourcentage et est calculé selon la norme **AFNOR (1986)**, comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée, par la formule suivante :

$$R\% = M_{HE} / M_P \times 100$$

R% : Rendement en huile essentielle.

M_{HE} : Masse d'huile essentielle en gramme.

M_P : Masse de plante en gramme.

2.3. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

2.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC ThermoQuest équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire SE-52 (5% de phényle; 95% de diméthylpolysiloxane) de 50 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 1.0 μm d'épaisseur de film. La température du four a été programmée à 60°C pendant 1 min puis à 250°C, à raison d'une montée de 3°C/min. Les températures de l'injecteur (split/splitless) et du détecteur ont été fixées à 230°C et 250°C, respectivement. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1.5 mL/min. Le volume d'échantillon d'huile essentielle injecté par le mode split est de 0.1 μL à un rapport de division de 1/100.

2.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC ThermoQuest muni d'une colonne capillaire SE-52 de (50 m x 0.25 mm) et 1.0 μm d'épaisseur de film, couplé à un spectromètre de masse de type ThermoQuest Automass Solo quadripolaire. Les températures de la source ionique et de l'interface ont été réglées respectivement à 230°C et 250°C. Le four a été programmé de 60°C à 250°C, à raison d'une montée de 3°C/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 230°C et 250°C, respectivement. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1.5 mL/min. 0.1 μL d'échantillon d'huile essentielle est injecté par le mode split à un rapport de division de 1/100. Les spectres de masse ont été obtenus par un impact électronique (IE) de 70 eV, un balayage sur une gamme de masse allant de 40 à 500 unités avec une vitesse de 0.5 sec et un filament de 300 μA .

2.3.3. Identification des composés chimiques

Les constituants de chacune de nos huiles essentielles ont été identifiés en utilisant le logiciel ThermoXcalibur 1.2 en corrélant leurs spectres de masse respectifs avec ceux des bibliothèques (NIST08, Wiley 8ème édition, Adams (Adams, 2001) et Mass Finder. Les indices de rétention ont été déterminés selon van Den Dool et Kratz (1963).

3. Les extraits de plantes

3.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

La préparation des extraits bruts méthanoliques de chaque partie de *Marrubium vulgare* (feuilles et fleurs), a été réalisée par macération (**figure n°20**) selon le protocole décrit par Boulila *et al.* (2015) avec quelques modifications, 10g de la poudre de chaque partie de la plante a été placée dans un erlenmeyer contenant 100mL de méthanol à 70% (MeOH-H₂O) et portée à l'agitation à température ambiante. Après 24 heures le mélange est filtré et évaporé à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif.

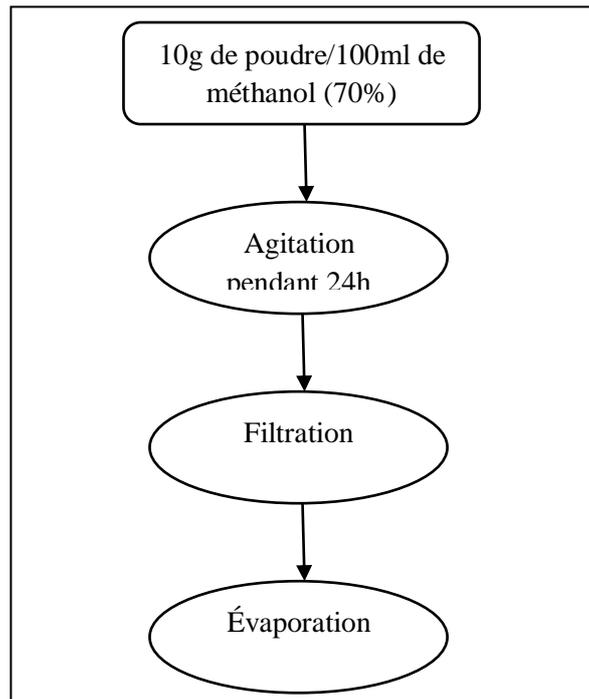


Figure n°20 : Protocole d'extraction des extraits bruts

3.2. Calcule du rendement des extraits bruts

Nous pouvons déterminer le rendement de différentes parties de la plante en extraits secs en calculant le rapport suivant :

$$R\% = [P_1 - P_2 / P_3] \times 100$$

P_1 : poids du ballon après évaporation.

P_2 : poids du ballon avant évaporation.

P_3 : poids de la matière végétale.

3.3. Dosage des composés phénoliques

3.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été effectué par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu. En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro-polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daelsrakotoarison, 1999).

➤ **Mise en œuvre pratique :**

La teneur totale en polyphénols totaux est déterminée selon la méthode décrite par **Wong et al. (2006)**. Une quantité de 100µL de chaque extrait est mélangée avec 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) et laissée réagir pendant 5 minutes. 2,5mL d'une solution saturée de Na₂CO₃ sont ensuite ajoutés, après une heure à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 725 nm.

L'absorption de l'extrait a été comparée avec celle de l'acide gallique traité à différentes concentration avec le même réactif et dans les mêmes conditions, Une courbe d'étalonnage a été réalisée.

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent d'acide gallique/gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g).

3.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été effectué par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium.

➤ **Mise en œuvre pratique :**

Selon le protocole décrit par **Talbi et al. (2015)**, 1 mL d'échantillon d'extrait (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 mL de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 415 nm.

L'absorption de l'extrait a été comparée avec celle de la quercétine traité à différentes concentrations et dans les mêmes conditions, Une courbe d'étalonnage a été réalisée.

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent de quercétine/gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g)

3.3.3. Dosage des tanins

Le dosage des tanins condensés dans les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été effectué par la méthode à la vanilline, cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide.

➤ **Mise en œuvre pratique :**

La teneur totale en tanins condensés est déterminée en utilisant la procédure rapportée par **Sun et al. (1998)**, Un volume de 500 µL de l'extrait brut est ajouté à 3 mL de la solution vanilline/méthanol (4%) et un volume de 1,5 mL d'acide chlorhydrique. Le mélange a été laissé au repos pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 500nm.

L'absorption de l'extrait a été comparée avec celle de la catéchine traité à différentes concentrations et dans les mêmes conditions, Une courbe d'étalonnage a été réalisée.

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent de catéchine/gramme de matière végétale sèche (mg EC/g).

4. Procédés d'étude microbiologique

4.1. Souches microbiennes testées

Pour cette étude, sept souches microbiennes de références connus comme responsables d'infections nosocomiales, ont été testées pour leur sensibilité vis-à-vis des agents antimicrobiens standards (antibiotiques et antifongiques) et biologiques (huiles essentielles et extraits de plantes). Six souches bactériennes dont quatre Gram négatives et deux Gram positives, et une souche fongique.

Tableau n°5 : Liste des souches microbiennes testées.

Souche	Code	Gram	Source
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	positive	Institut pasteur d'Alger
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négative	
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659	Négative	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négative	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Positive	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Négative	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	/	

ATCC: American Type Culture Collection.

4.2. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards

La sensibilité des souches testées aux antibiotiques et aux antifongiques a été évaluée par la méthode de Vincent (NCCLS, 1997). pour les bactéries, 100 µL de suspension bactérienne ajustée à une densité approximative de 10^8 UFC/mL (Brahmi *et al.*, 2014) a été ensemencé sur un milieu de culture gélosé Mueller Hinton. Des disques d'antibiotique ont ensuite été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface.

Pour les levures, un volume de 100 µL de suspension fongique ajustée à une densité approximative de 10^6 UFC/mL (Pozzatti *et al.*, 2010) a été ensemencé sur un milieu de culture gélosé PDA (Potato Dextrose Agar), des disques imprégnés d'une solution d'antifongique ont ensuite été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface.

En parallèle, des témoins ont été utilisés pour le contrôle de la croissance des souches testées. Les boîtes de Pétri ont été fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes, ensuite portées à incubation à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 25°C

pendant 48H pour les levures. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque souche microbienne.

Les résultats ont été évalués par la mesure de la zone d'inhibition formant une auréole autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

4.3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits

4.3.1. La méthode de Vincent (technique de l'aromatogramme)

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et des extraits de *Marrubium vulgare* a été réalisée par la méthode de Vincent, qui repose sur le même principe de l'antibiogramme (NCCLS, 1997). Des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre imbibés d'huile essentielle et des extraits à tester, sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec 100 µL de suspension microbienne dont la turbidité a été ajustée à 0.5 McFarland. Les boîtes de Pétri sont fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être incubées à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 25°C pendant 48H pour les levures. Les essais sont effectués en triple.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque.

4.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration en huile essentielle ou extraits de plante sans croissance microbienne visible (pas de turbidité) (Zhang *et al.*, 2015). Elle a été réalisée par la méthode de macrodilution en milieu liquide. L'huile essentielle est préparée par émulsion dans une solution d'agar à 0.2% et les extraits dans de l'eau distillée stérile. Des dilutions successives de la solution obtenue est ensuite effectuée par progression géométrique de raison 2 de façon à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128 (Oussou *et al.*, 2004). La gamme de concentrations finales utilisée va de 0.781 à 50 µL/mL (v/v) pour l'huile essentielle et de 15.625 à 1000 µg/mL pour les extraits.

Concernant les bactéries, la suspension bactérienne a été préparée dans le bouillon Mueller Hinton avec une turbidité de $5 \cdot 10^6$ bactéries/mL (Koné *et al.*, 2007). 0.2 mL de chacune des solutions d'huile essentielle et des extraits est introduit dans un tube de la série expérimentale contenant la suspension bactérienne. L'ensemble est ensuite incubé à 37°C pendant 24H.

Concernant la levure *Candida albicans*, la suspension fongique a été préparée dans le bouillon Sabouraud avec une turbidité de $1 \cdot 10^6$ cellule/mL (Ramage *et al.*, 2000). 0.1mL de chacune des solutions d'huile essentielle et des extraits est introduit dans un tube de la série expérimentale contenant la suspension fongique. Les tubes sont ensuite incubés à 25°C pendant 48H.

Des tubes contenant le milieu de culture stérile et une concentration d'huile essentielle déterminée sont utilisés comme contrôles positifs, et un tube ne contenant que le milieu de culture et l'inoculum est utilisé comme contrôle négatif. La lecture des résultats a été faite en

comparant avec les contrôles par observation à l'œil nue. Les essais sont effectués en triple pour chacune des concentrations d'huile essentielle et des extraits utilisées.

4.3.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide et fongicide (CMB - CMF)

Pour déterminer la concentration minimale bactéricide et fongicide, une sous-culture de chaque tube ou aucune croissance microbienne n'a été observée est ensemencée sur milieu gélosé MH pour les bactéries puis incubée à 37°C pendant 24H, et Sabouraud pour la levure *C.albicans* ensuite incubée à 25°C pendant 48H, en commençant par le tube correspondant à la CMI (Silva *et al.*, 2011). La CMB et la CMF correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle et d'extraits dont le repiquage ne montre aucune croissance de germe (Zhang *et al.*, 2015). Chaque essai est réalisé trois fois.

5. Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et des extraits de *Marrubium vulgare* a été effectuée par deux méthode : le test DPPH et le test de FRAP.

5.1. Le test DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'un composé à réduire le radical DPPH (Habibou *et al.*, 2019), et ceci se traduit par le changement de couleur de la solution du DPPH qui vire du violet au jaune lorsque le radical est réduit par l'antioxydant (Karagözler *et al.*, 2008). La réaction est alors quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotométrie à 517 nm (Karagözler *et al.*, 2008).

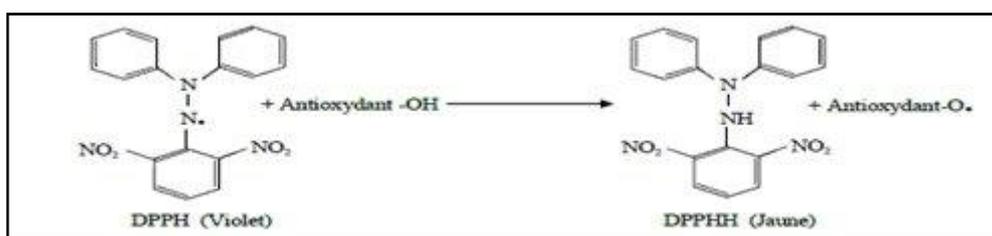


Figure n°21 : Réduction du DPPH par un antioxydant (Habibou *et al.*, 2019)

5.1.1. Mise en œuvre pratique

L'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH selon la méthode décrite par Dung *et al.* (2008), Un volume de 100 µL de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle et des extraits préparées à différentes concentrations est mélangé avec 2.9 mL d'une solution d'éthanol de DPPH° à 0,004%. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm par spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif (antioxydant de référence) à différentes concentrations allant de 0.2 à 1 mg/mL. Un contrôle négatif est également préparé contenant 100 µL d'éthanol et de 2.9 mL de la solution de DPPH° est également préparé.

Les concentrations d'huile essentielle d'*Ammi visnaga* testées sont comprises entre 100 et 500 mg/mL, tandis que les concentrations des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* sont comprises entre 10 et 30 mg/mL. La concentration nécessaire pour dégrader 50 % du radical DPPH (CI50) a été déterminée.

5.1.2. Expression des résultats

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de réduction de la solution de DPPH°, et elle est déterminée par la formule suivante (Eyob *et al.*, 2008):

$$PR = (AC - AE) / AC \times 100$$

PR : Pouvoir de la réduction exprimé en pourcentage (%) ;

AE : Absorbance de la solution de DPPH° en présence de l'huile essentielle, des extraits ou de l'acide ascorbique ;

AC : Absorbance de la solution de DPPH° en absence de l'huile essentielle, des extraits et de l'acide ascorbique.

5.2. Le test de FRAP

Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'un composé à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) (Habibou *et al.*, 2019), et ceci se traduit par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux (Karagözler *et al.*, 2008), La réaction est alors quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par spectrophotométrie à 700nm.



5.2.1. Mise en œuvre pratique

Le pouvoir de l'huile essentielle et des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), un volume de 500 µL de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle et des extraits préparées à différentes concentrations, est mélangé avec 1.25 mL d'une solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) (annexe n°) et 1.25 mL d'une solution de ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes puis, refroidi à température ambiante. Ajouter 1.25 mL d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min. 1.25 mL du surnageant est mélangé avec 1.25 mL d'eau distillée et 250 µL de trichlorure de fer $FeCl_3$ à 0.1%. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 700 nm par spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif (antioxydant de référence) à différentes concentrations allant de 0.1 à 1 mg/mL. Les concentrations d'huile essentielle d'*Ammi*

visnaga testées sont comprises entre 100 et 500 mg/mL, tandis que les concentrations des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* sont comprises entre 10 et 30 mg/mL.

5.2.2. Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de graphe, l'abscisse représente les différentes concentrations de l'huile essentielle, des extraits et de l'acide ascorbique, et l'ordonnée représente les absorbances obtenues. L'augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. La CE₅₀, définie comme étant la concentration nécessaire pour réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) à 50 %, elle est déterminée par interpolation à partir de l'analyse de régression linéaire (Oyaizu, 1986).

6. Etude pharmacologique

L'étude pharmacologique a été réalisée *in vivo* sur des Rats wistar, dans le but d'évaluer la toxicité aigue de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* par administration orale et de leur activité anti-inflammatoire par le test de l'œdème plantaire.

6.1. Matériel animal

Pour les tests *in vivo*, les animaux expérimentaux sont des rats blancs femelles de souche *wistar* dont le poids est compris entre 160 et 220 g. Obtenus de l'institut pasteur, ils ont été placés dans des cages en polypropylène et ont été acclimatés aux conditions de laboratoire (une température de 20 à 22 °C, 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité) pendant 7 jours (Lebri *et al.*, 2015).

6.2. Toxicité aigue

L'étude de la toxicité aigue a été adaptée à celle décrite par la ligne directrice de l'Organisation de la Coopération Economique et Développement (OCDE) 423 (OCDE, 2001), les rats ont été mis à jeun 18 H avant l'expérimentation avec accès libre à l'eau. L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été solubilisée dans du tween 80 (1%) en suspension pour fournir une solution à 100 mg/mL (Faria *et al.*, 2011), tandis que les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* ont été solubilisés dans de l'eau distillée avant d'être administré par voie orale à des groupes de souris (n = 3), à des doses de 50, 300 et 2000mg/kg. Le groupe témoin n'a reçu que le tween 80 à 1% (10 mL/kg). Les animaux ont été observés en continu pendant 2 heures pour détecter des changements dans les réponses autonomes ou comportementales et surveillés pour toute mortalité pendant les 48 heures qui suivent, puis pendant 7 jours, si aucun décès n'est survenu, le test sera répété à des doses plus élevées jusqu'à 5000 mg/kg.

6.3. Etude de l'activité anti-inflammatoire

6.3.1. Test de l'œdème plantaire induit par carragénine

Le pouvoir anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été évalué par la méthode d'inhibition de

l'œdème plantaire induit par injection de carragénine décrite par **winter *et al.* (1962)**. Les rats ont été à jeun pendant 18h avec accès à l'eau ; ils ont été divisés en six groupes de cinq animaux chacun (n=5). Le groupe 1, témoin, a reçu le véhicule (Tween 80 à 1%, 10 mL/kg). Le groupe 2, standard, a reçu l'anti-inflammatoire de référence diclofénac (10 mg/kg). Les groupes 3 et 4 ont reçu de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* à des doses de 50 et 100 mg/kg respectivement. Les groupes 5 et 6 ont reçu l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* à des doses de 200 et 400 mg/kg respectivement et les groupes 7 et 8 ont reçu l'extrait des fleurs de *Marrubium vulgare* à des doses de 200 et 400 mg/kg respectivement. L'œdème a été induit par injection de la carragénine (0,1 mL) 30 minutes après le traitement par administration orale, dans la région sous-plantaire de la patte arrière droite (**Figures n°22 et 23**).

À l'aide d'un pied à coulisse digital, le volume de la patte a été mesuré (**Figure n°24**), avant l'injection et 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures après (**Vesudevan *et al.*, 2006**).



Figure n°22 : Administration orale d'huile essentielle et des extraits



Figure n°23 : Injection de la carragénine.



Figure n°24 : Mesure de l'épaisseur de la patte à l'aide d'un pied à coulisse.

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule suivante (Olajide *et al.*, 1999) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(V_t - V_0)_{\text{témoin}} - (V_t - V_0)_{\text{traité}} / (V_t - V_0)_{\text{témoin}}] \times 100$$

V_0 : Volume de la patte avant injection de la carragénine ;

V_t : Volume de la patte à un intervalle de temps déterminé après injection de la carragénine.

6.3.2. Analyse statistique

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et des extraits a été réalisée en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'écart-type. L'étude statistique a été effectuée par ANOVA suivie du test HSD de Tukey, en utilisant le logiciel SPSS. Les valeurs avec $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

7. Etude de l'activité insecticide

7.1. L'insecte étudié

Pour cette étude, *Aphis spiraecola*, un puceron connu comme responsables des ravages des agrumes (Cole, 1925), a été testées pour sa sensibilité vis-à-vis des agents biologiques (huile essentielle d'*Ammi visnaga* et extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*). L'insecte a été collecté à partir d'un verger des oranges situé à la région de Stidia, à l'ouest de la wilaya de Mostaganem, en mois de juin. Ensuite il a été ramené au laboratoire pour être immédiatement testé.

7.2. Evaluation de la toxicité de l'huile essentielle et des extraits par contact

7.2.1. Mise en œuvre pratique

L'évaluation du pouvoir insecticide de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été déterminée par la méthode de contact décrite par Ebrahimi *et al.* (2013). Pour cela, des boîtes de Pétri ont été utilisées comme chambre pour la détermination des matériaux d'essai sur le puceron.

10 adultes (une sélection aléatoire des deux sexes) du même âge ont été transférés sur des feuilles d'oranger placées sur du papier filtre humide (saturé d'eau distillée) dans une boîte de Pétri, et laissés reposer pendant une demi-heure. L'huile essentielle a été préparé avec du tween 80 (1%) à des doses de 50 et 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, et les extraits ont été préparé avec du DMSO (10%) à des doses de 15 et 30 mg/mL . Les échantillons ont été appliqués sur du papier Wattman et fixés sur la surface intérieure de la boîte de pétri pour éviter tout contact direct avec le puceron. Un traitement contrôle a été préparé contenant seulement le tween 80 (1%) pour ceux traité avec l'huile essentielle et le DMSO (10%) ceux traité avec les extraits. Les boites de pétri ont été scellés avec du parafilm pour éviter toute fuite des pucerons. Chaque essaie a été réalisé cinq fois.



Figure n°25 : Feuilles d'oranger infectées par le puceron *Aphis spiraecola*



Figure n°26 : Protocole de détermination du pouvoir insecticide.

7.2.2. Expression des résultats

La mortalité a été enregistrée 24h après l'exposition des pucerons à l'huile essentielle et aux extraits (Albouchi *et al.*, 2018). Les pucerons incapables de se déplacer après un léger contact avec un pinceau fin ont été considérés comme morts (Ebrahimi *et al.*, 2013). Le pourcentage de mortalité est calculé selon la formule d'Abbott (Abbott, 1925) :

$$M\% = [(M_T - M_C) / S_C] \times 100$$

M% : Pourcentage de mortalité ;

M_T : Mortalité (individus morts) dans la population traitée avec l'huile essentielle et les extraits ;

M_C : Mortalité (individus morts) dans la population contrôle.

S_C : Nombre de survivant dans la population contrôle.

8. Etude de l'activité anticancéreuse

8.1. Culture cellulaire

L'activité cytotoxique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été testée sur des lignées cellulaires de macrophage (J774E.1) et de fibroblaste (3T3), ainsi que sur des lignées cellulaires cancéreuses canines représentant un ostéosarcome (D-17) et un lymphome à cellules B (CLBL-1).

La lignée cellulaire J774E.1, isolée à partir d'ascite, a été obtenue de l'American type culture collection (ATCC) et fourni par l'Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale, Académie polonaise des sciences, Wrocław, Pologne. Les lignées cellulaires 3T3 et D-17 ont été obtenues de l'ATCC, et la lignée cellulaire CLBL1 de Barbara C. Reutgen, Institut d'immunologie, Département de pathobiologie de l'Université de médecine vétérinaire de Vienne (Rutgen *et al.*, 2010).

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 complété par 10% de sérum bovin fœtal, 4mM de glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine.

8.2. Evaluation de la cytotoxicité de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

La cytotoxicité a été déterminée par ensemencement des cellules dans une plaque à 96 puits, avec $7,5 \times 10^3$ de cellules J774E.1 et D-17, 4×10^3 de cellules 3T3 et 30×10^3 de cellules CLBL-1.

L'huile essentielle a été préparé dans le DMSO puis ajouté au milieu de culture de façon à obtenir les concentrations finales allant de 1 à 150 $\mu\text{g/mL}$. Les cellules ont été ensuite incubées avec les différentes concentrations de l'huile essentielle dans un incubateur humidifié à 5% de CO_2 .

La viabilité des cellules est évaluée par le test MTT, après 72h, 20 μL de MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) ont été ajouté à chaque puits et le mélange est incubé pendant trois heures. Le MTT est réduit par voie enzymatique dans les cellules vivantes, et ceci se traduit par la formation d'une couleur violette. Le formazan violet a été solubilisé par l'ajout d'un tampon de lyse, composé de 225 mL de DMF, 67,5 g de SDS et 275 mL d'eau distillée.

L'absorbance a été mesurée avec un lecteur de microplaques à 570 nm, avec une longueur d'onde de référence de 630 nm. Les tests ont été effectués en triple et les résultats sont utilisés pour calculer la concentration de l'huile essentielle testée nécessaire pour tuer 50% des cellules (CE_{50}).

8.3. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du logiciel STATISTICA (version 10.0 MR1 2012 PL, StatSoft, Kraków, Pologne). L'ANOVA à sens unique avec le test post hoc de Tukey a été utilisée pour les comparaisons multiples entre les groupes.

8.4. Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et d'erreur standard de la moyenne (SEM). Les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.

Chapitre 5
Résultats et discussion

1. Matériel végétal

1.1. Screening phytochimique

La détermination de la composition phytochimique des parties aériennes d'*Ammi visnaga* et de *Marrubium vulgare*, par les réactions de coloration et de précipitation, nous ont permis de constater la présence de différents groupes chimiques. Les résultats son exprimés dans le tableau n°6.

Tableau n°6 : résultats du screening phytochimique d'*Ammi visnaga* et des feuilles et fleurs de *Marrubium vulgare*.

<i>Composés phytochimiques recherchés</i>		<i>Ammi visnaga</i>	<i>Marrubium vulgare</i>	
			Feuilles	Fleurs
<i>Flavonoïdes</i>		+++	+	++
<i>Alcaloïdes</i>	<i>Réactif de Mayer</i>	-	-	-
	<i>Réactif de Wagner</i>	-	-	-
<i>Tanins</i>	<i>Tanins simple (FeCl₃)</i>	+++	++	++
	<i>Tanins galliques</i>	+++	++	++
	<i>Tanins cathéchiqes</i>	-	-	-
<i>Coumarines</i>		+++	-	-
<i>Stérols et triterpènes</i>	<i>Hétérosides stéroïdiques</i>	++	-	+
	<i>Hétérosides triterpéniques</i>	-	-	-
<i>Anthocyanes</i>		+	+	-
<i>Composés réducteurs</i>		++	+++	+
<i>Saponosides</i>		-	+	-

(+) : Présents ; (++) : abondants ; (+++) : très abondants ; (-) : absents.

Le **tableau n°6** présente le résultat du screening phytochimique de la partie aérienne des plantes étudiées, ces résultats montrent que l'espèce *Ammi visnaga* est très riche en flavonoïdes, en tanins galliques et en coumarines. L'analyse phytochimique a montré aussi la présence des hétérosides stéroïdiques, des anthocyanes et des composés réducteurs dans la partie aérienne avec des intensités plus ou moins variable, et l'absence totale des alcaloïdes, des tanins cathéchiques, des hétérosides triterpéniques et des saponosides.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ez zoubi et al. (2016)** et **Zaher et al. (2019)**. En effet, ces derniers ont indiqué la présence des flavonoïdes, des tanins simples, des coumarines et des stérols et triterpènes dans la partie aérienne d'*Ammi visnaga* tandis que **Amin et al. (2015)** ont montré la présence que des tanins et des flavonoïdes. D'autre part les alcaloïdes et les saponosides ont montré l'absence totale dans la partie aérienne de notre espèce, et ce résultat est en accord avec ceux d'**Arouabi et al. (2018)**, **Amin et al. (2015)** et **Zaher et al. (2019)**.

Les analyses faites par **Soro et al. (2015)**, **Ez zoubi et al. (2016)** et **Arouabi et al. (2018)** rapportent respectivement l'absence des tanins galliques et la présence des tanins cathéchiques dans les extraits d'*Ammi visnaga* alors que notre étude indique le contraire, la présence des tanins galliques et l'absence des tanins cathéchiques. Les résultats des analyses menées par **Zaher et al. (2019)** sont en accord avec les nôtres dans la présence des composés réducteurs, tandis que les anthocyanes révélés positifs au cours de notre analyse, ont été au contraire, négatifs selon son analyse.

Une autre étude faite par **El karkouri et al. (2020)** confirme la présence des flavonoïdes, des stérols et triterpènes mais aussi des l'absence des tanins cathéchiques dans la partie aérienne de la plante, en revanche, elle apporte l'absence totale des tanins galliques qui se révèlent très abondants dans notre étude.

Les résultats du screening phytochimique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, indiquent la présence de divers composés dans les feuilles et les fleurs de la plante. Il s'agit des flavonoïdes, des tanins (simples et cathéchiques) et des composés réducteurs. D'autres composés sont absents, il s'agit des alcaloïdes, des tanins galliques, des coumarines et des hétérosides triterpéniques. Des différences sont observées entre les deux parties de la plante, en effet, les hétérosides stéroïdiques, d'une part, sont absents dans les feuilles et présents dans les fleurs. D'autre part, les anthocyanes et les saponosides sont mis en évidence dans les feuilles de *Marrubium vulgare* et s'avèrent absents dans les fleurs.

Nos résultats sont en accord total avec ceux obtenus par **Hayat et al. (2020)**, en effet, ce dernier a indiqué la présence des flavonoïdes et des tanins cathéchiques, et l'absence des alcaloïdes, des tanins galliques et des coumarines dans la partie aérienne de la plante. Une autre étude faite par **Yousefi et al. (2014)** confirme la présence des flavonoïdes.

Les analyses faites par **Bouterfas et al. (2014)** confirme l'absence des alcaloïdes et des coumarines, mais indique aussi l'absence des saponosides et des anthocyanes qui se sont révélés positif dans les feuilles du marrube blanc au cours de notre analyse. Tandis que les résultats des analyses menées par **Kahlouche, (2014)**, confirme la présence des saponosides

et indique aussi la présence des stérols et terpenoïdes qui ont été positif que dans les fleurs de *Marrubium vulgare* dans notre étude.

Les recherches effectuées sur les différents extraits des deux espèces étudiées révèlent la présence d'importants métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les saponosides, les hétérosides stéroïdiques, les composés réducteurs et une faible quantité des anthocyanes avec des intensités variables. Ces composés sont produits comme métabolites secondaires (Okwu et Okwu, 2004). Ils sont connus pour posséder divers propriétés biologiques (Verdan et Alves Stefanello, 2012 ; Kholkhal, 2014 ; Abdelli, 2018) ce qui peut contribuer à l'utilisation d'*Ammi visnaga* et de *Marrubium vulgare* comme remèdes en médecine traditionnelle. Les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antiulcéreuses (Fankibe et al., 2020). Les tanins, en plus de leur activité antiseptique, antimicrobienne, antifongique, antivirale et antitumorale ils sont aussi doués d'un pouvoir astringent qui leur confère des propriétés vasculo-protectrices et cicatrisantes (Hennebelle et al., 2004 ; Iqbal et al., 2015 ; Fankibe et al., 2020). Les composés phénoliques peuvent être responsables de l'activité antioxydante chez les plantes (Kim et al., 2003 ; Haddouch et al., 2016). Les alcaloïdes ont été signalés comme un poison puissant pour leur activité antimicrobienne, antipaludique, anti-inflammatoire, antispasmodique et la cytotoxicité, et sont d'autre part employées contre les œdèmes et les maladies oculaires (N'guessan et al., 2009 ; Iqbal et al., 2015). Selon N'guessan et al., (2009) les coumarines sont utiles pour arrêter les hémorragies et les saponosides ont un effet cicatrisant et antiasthmatique.

2. Les huiles essentielles

2.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* extraite par hydrodistillation, a été calculé en fonction de la masse du matériel végétal traité. Le résultat obtenu est exprimé dans le **tableau n°7**.

Tableau n°7 : Rendement en huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga*

Huile essentielle	Rendement (%)
<i>Ammi visnaga</i>	1,78

Le résultat du **tableau n°7** montre que la partie aérienne d'*Ammi visnaga* a donné un rendement en huile essentielle de 1.78%.

Une étude faite par Khalfallah et al. (2011) sur l'espèce *Ammi visnaga* récoltée à Constantine, à l'est du pays, a permis d'obtenir un rendement en huile essentielle de 1.3%. Une autre étude a été faite par Brahmi et al. (2014) sur l'espèce provenant de Boumerdes, au nord du pays, a montrée des rendements de 0.16, 0.32 et 0.48% respectivement avant la

floraison, pendant la floraison et après la floraison. Ces résultats sont un peu proches mais restent nettement plus inférieurs du rendement obtenu par l'*Ammi visnaga* récoltée de la région de Béni-saf.

En dehors de l'Algérie, toutes les études réalisées sur l'espèce *Ammi visnaga*, ont donné des rendements inférieurs au nôtre. Au Maroc, **Satrani et al. (2004)**, **Zrira et al. (2008)** et **Soro et al. (2015)** ont obtenu des rendements de 0.27, 0.4% et 0.13 % respectivement. En Tunisie, une étude réalisée par **Khadhri et al. (2011)**, a obtenu un rendement de l'ordre de 0.2%, et en Turquie, **Gunaydin et beyazit, (2004)** ont obtenu un rendement de 0.1%.

Les différences dans les rendements en huile essentielles observée varient en fonction de la période de récolte et du séchage de la plantes (**Satrani et al., 2004**), la zone géographique de collecte, la génétique de la plante, l'organe utilisé, le stade de développement et la période de séchage (**Sefidkon et al., 2001; Vekiari et al., 2002**). Le climat peut aussi influencer la production d'huile essentielle, en effet, en jours long une intensité lumineuse et une température élevé favorise la production d'huile essentielle, l'augmentation de la quantité d'huile essentielle avec la longueur du jour s'accompagne d'une augmentation du taux de matière sèche par plante et de la teneur en huile essentielle (**Burbott et Loomis, 1987**). Selon l'étude faite par **Zrira et al. (2008)**, la technique d'extraction peut également influencer le rendement en huiles essentielles.

2.2. Analyse de la composition chimique

Les résultats de l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) sont résumés dans le **tableau n°8**

Tableau n°8 : composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

N°	Composés	IR	Aire%
1	alpha-thujene	931	0,2
2	alpha-pinene	940	1,0
3	Sabinene	978	tr.
4	beta-pinene	984	0,1
5	Myrcene	990	0,3
6	Verbenene	1009	0,2
7	delta-3-carene	1016	0,1
8	alpha-terpinene	1021	0,2
9	p-cymene	1028	19,9
10	Limonene	1034	27,8
11	gamma-terpinene	1063	10,0
12	p-cymenene	1093	0,3
13	Linalool	1098	tr.
14	alpha-thujone	1111	0,2
15	beta-thujone	1122	tr.
15	trans-limonene oxide	1143	0,1
17	Camphor	1153	tr.
18	Menthol	1172	tr.
19	terpinen-4-ol	1185	1,0
20	alpha-terpineol	1196	0,1
21	dihydro carvone	1202	0,1
22	cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1232	0,2
23	Carvone	1249	0,1
24	Thymoquinone	1253	0,3
25	Thymol	1283	14,2
26	Carvacrol	1290	18,7
Total identifié			95,1

IR : indice de rétention ; tr : Traces (valeurs moins de 0.05%)

L'analyse chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* (**Tableau n°8**), nous a permis d'identifier 26 composés volatiles représentant un total de 95.1% de l'huile. Cette huile est principalement riche en limonène qui représente le composant majeur avec un taux de 27.8%, suivi de p-cymène (19.9%), carvacrol (18.7%), thymol (14.2%) et gamma-terpinène avec un taux de 10%. D'autres composants sont présents à des teneurs de 0.1, 0.2 et 0.3%, et les restes sont sous forme de traces (moins de 0.05%).

Selon ces résultats, nous constatons qu'il y a des différences considérables qualitativement et quantitativement par rapport aux résultats précédemment rapportés dans les analyses d'huiles essentielles *Ammi visnaga*. En Algérie, des analyse effectuées sur l'*Ammi visnaga* récoltée de Boumerdes ont permis d'identifier 49 composants avec la prédominance du 2-méthylbutyl 2méthyl butanouate (16,53 %), suivi du β -linalol (13,61 %) et du verticiol (7,19 %) (**Brahmi**

et al., 2014). Une autre analyse est faite par **Khalfallah *et al.* (2011)** à Constantine, a permis d'identifier 21 composés, le composant majeur été l'acide 2,2Dimethylbutanoïque (30.1%) suivi de l'isobutyl isobutyrate (14.0 %) et de la croweacine (12.2%). Ces résultats sont totalement différents des nôtres.

Au Maroc, l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est caractérisée par la présence d'isobutyrate d'amyle, du linalol, du methyl-2-butyrate d'isoamyle et du valerate d'amyle comme composés majoritaires (**Satrani *et al.*, 2004**).

Zrira *et al.* (2008) et **Soro *et al.* (2015)** au Maroc et **Khadhri *et al.* (2011)** en tunisie ont identifié respectivement 23, 39 et 40 composés avec la dominance du linalol et du 2-methylbutyl isobutyrate.

Un autre rapport sur l'*Ammi visnaga* provenant de la Turquie, a montré que l'huile des fruits mûrs contenait 12 composants avec la prédominance du nérol (29,98 %), α -bisabolol (20,86 %) et du butylhydroxytoluène (BHT) (18,55 %) (**Gunaydin et beyazit, 2004**).

Les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* sont peu étudiées, les variations rencontrées dans leur composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif peuvent être associée à des variations de l'environnement, des origines géographiques et des différences de biotypes (**khalil *et al.*, 2020**). L'origine des changements doit être recherchée principalement dans les différences de nature des sols d'une part et du rayonnement solaire d'autre part (**Khadhri *et al.*, 2011**).

Zrira *et al.* (2008) a trouvé dans son étude que les techniques d'extraction ont influencé la composition chimique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*.

3. Les extraits de plantes

3.1. Rendement en extraits bruts

Les rendements moyens en extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* extraits par macération, ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal traité. Le résultat obtenu est exprimé dans le **tableau n°9**.

Tableau n°9 : Les rendements en extraits méthanoliques obtenus des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*

Extraits	Solvant utilisé	Rendements (%)	
		<i>Marrubium vulgare</i>	
		Feuilles	Fleurs
Extraits bruts	Méthanol	16.60	13.99

Les résultats obtenus (**Tableau n°9**) montrent que les feuilles de *Marrubium vulgare* ont donné un rendement de 16.60% en extrait bruts méthanolique, tandis que les fleurs ont donné un rendement de 13.99%.

De nombreux travaux effectués sur le marrube blanc provenant de différentes régions en Algérie montrent des rendements en extraits très variables et très élevés comparés aux nôtres.

Une étude faite sur les feuilles de *Marrubium vulgare* récoltées du mont de Tessala (Oran), a donné un rendement de 32.5% (**Bouterfas et al., 2014**), ce résultat est largement supérieur au rendement qu'on a obtenue. **Bouterfas et al.**, a fait une autre analyse en (**2016**), sur *Marrubium vulgare* récoltée de trois régions différentes, mont de Tessala (Oran), forêt de M'sila et ain Skhouna (Saida), et a obtenu des rendements de 29.5%, 19.25% et 22.5% respectivement, ce qui reste nettement supérieur à nos résultats. Une autre étude faite à Batna, a donné un rendement plus faible que celui de notre espèce et qui est de l'ordre de 10.9% (**Ghedadba et al., 2014**).

En dehors de l'Algérie, une étude est faite sur le Marrube blanc en Tunisie, récoltée de six régions différentes, a montré un rendement moyen de 8.9% d'extrait brut éthanolique (**Boulila et al., 2015**), un résultat qui reste largement plus faible comparé au nôtre.

3.2. Dosage des composés phénoliques

3.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode au réactif du Folin-Ciocalteu, l'acide gallique pris comme contrôle positif nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage (**Figure n°27**), ce qui nous a permis de calculer la teneur en polyphénols pour les différents extraits de *Marrubium vulgare* qui est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAC/g).

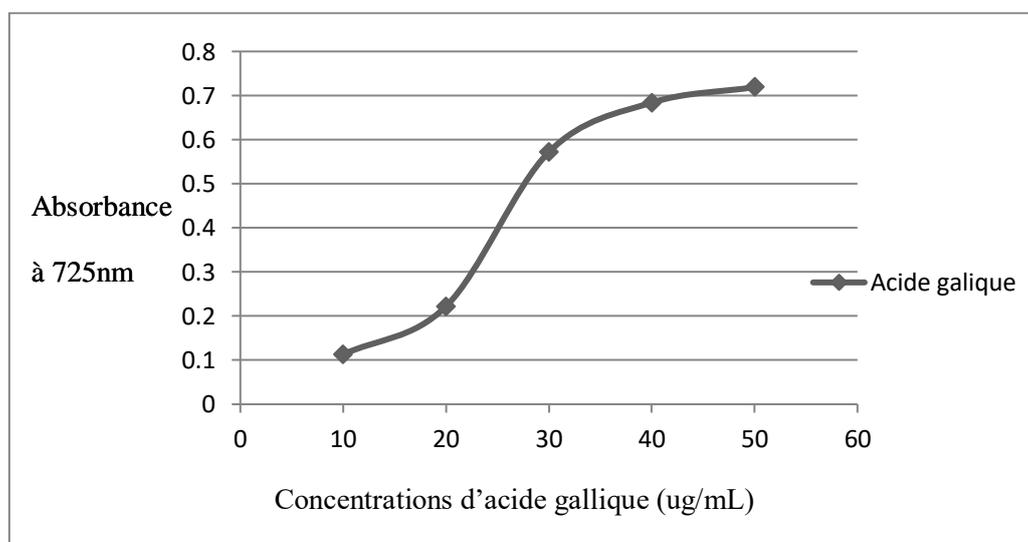


Figure n°27 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

La teneur en polyphénols totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Figure n°27), et les résultats sont exprimés dans la figure ci-dessous (**Figure n°28**)

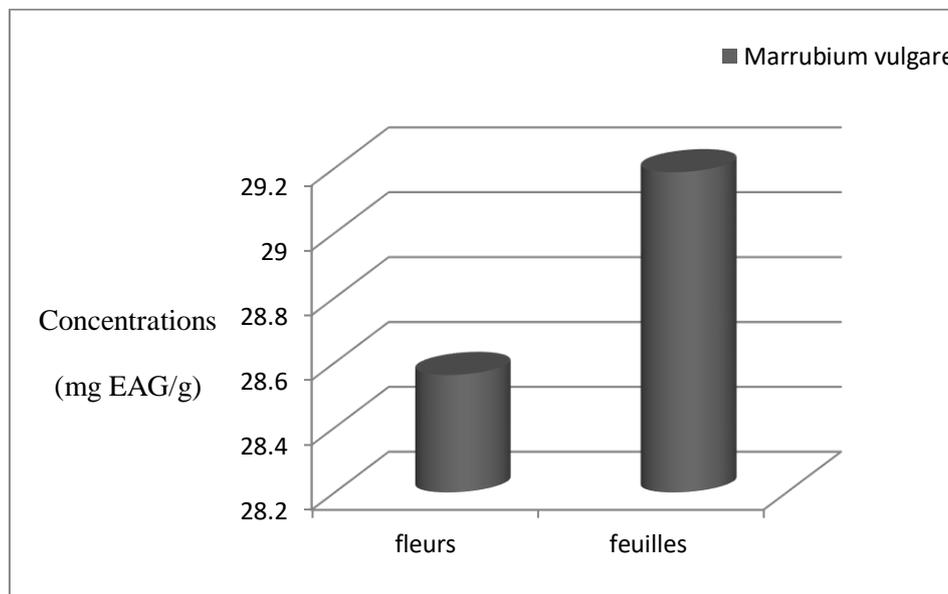


Figure n°28 : teneur en polyphénols totaux pour les extraits des feuilles et les fleurs de *Marrubium vulgare*

La figure n°28 montre la teneur en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*, nous remarquons que la teneur en polyphénols dans l'extrait des feuilles (29.19mg EAG/g) est un peu élevée par rapport à celle dans l'extrait des fleurs (28.56 mg EAG/g).

3.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est déterminé par la méthode au chlorure d'aluminium, la quercétine prise comme contrôle positif nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage (**Figure n°29**), ce qui nous a permis de calculer la teneur en flavonoïdes dans les différents extraits de *Marrubium vulgare*, qui est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g).

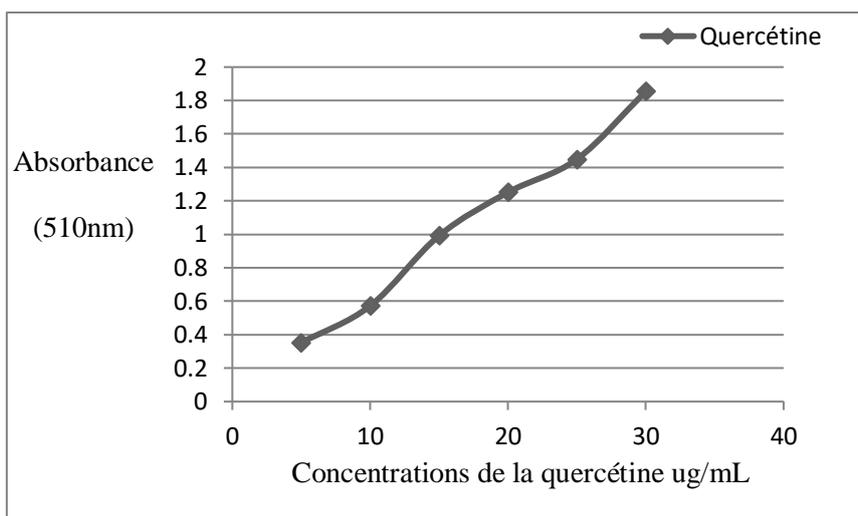


Figure n°29 : courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage tracée de la quercétine (figure n°29), et les résultats sont exprimés dans la **figure n°30**.

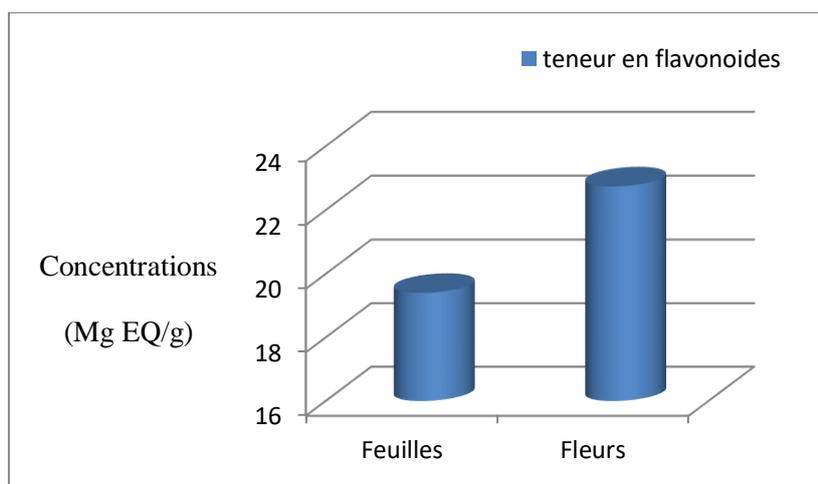


Figure n°30 : teneur en flavonoïdes pour les extraits des feuilles et les fleurs de *Marrubium vulgare*

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Marrubium vulgare* est de 19.41 mg EQ/g, qui est inférieure à celle obtenue dans l'extrait méthanolique des fleurs et qui est de l'ordre de 22.75 mg EQ/g.

3.2.3. Dosage des tanins

Le dosage des tanins est évalué par la méthode à la vanilline, la catéchine prise comme contrôle positif nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage (**Figure n°31**), ce qui nous a permis de calculer la teneur en tanins dans les différents extraits de *Marrubium vulgare*, qui

est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g).

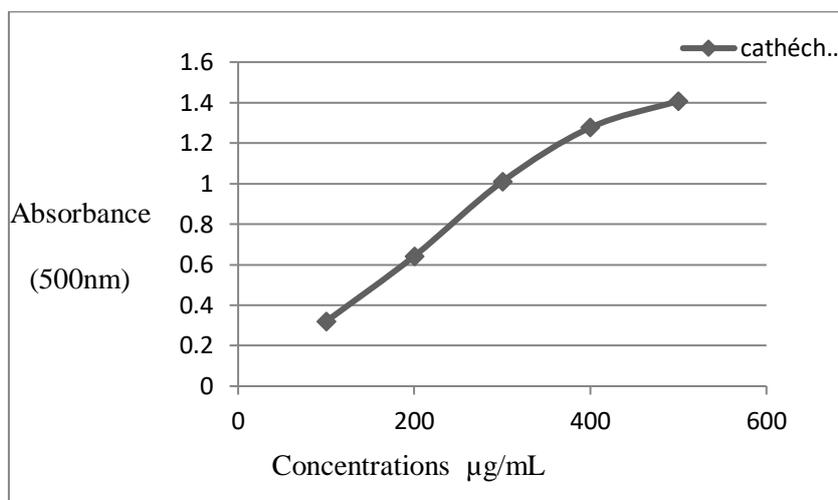


Figure n°31 : courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins

La teneur en tanins dans les extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* est calculée à partir de la courbe d'étalonnage tracée de la catéchine (figure n°31), et les résultats sont exprimés dans la **Figure n°32**

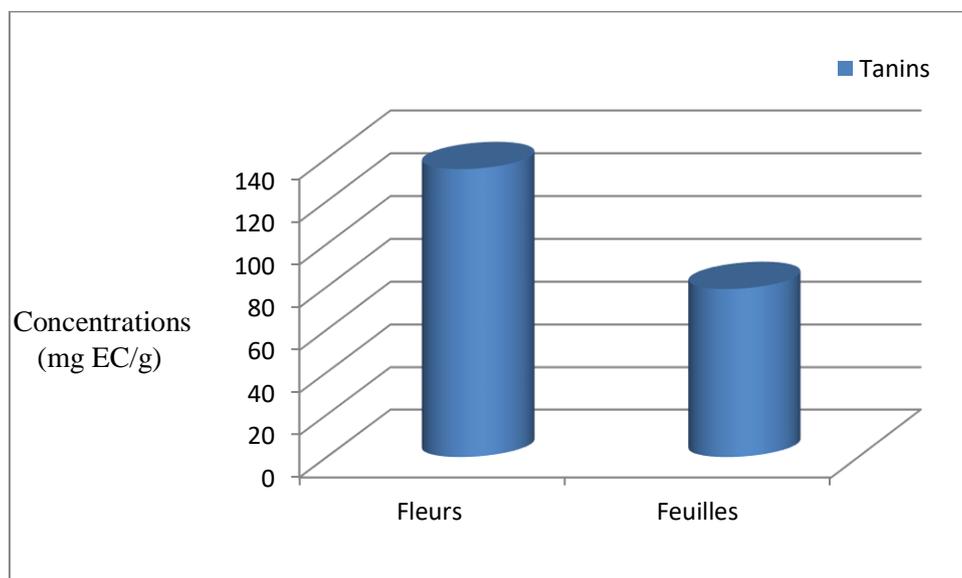


Figure n°32 : teneur en tanins pour les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*

La teneur en tanins dans l'extrait des fleurs de *Marrubium vulgare* obtenue est élevée par rapport à celle obtenue dans l'extrait des feuilles, les valeurs sont de l'ordre de 135 mg EC/g et 79 mg EC/g respectivement.

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables et variables en polyphénols, flavonoïdes et tanins dans les feuilles et les fleurs de *Marrubium vulgare*. Les taux des flavonoïdes et des tanins étaient plus élevés dans les fleurs comparés aux feuilles, et ont donné des valeurs de 22.75mg EQ/g et 135mg EC/g respectivement dans les fleurs, et 19.41mg EQ/g et 79mg EC/g respectivement dans les feuilles. Contrairement aux polyphénols, qui se trouvent plus élevés dans les feuilles que les fleurs, avec des valeurs de 29.19mg EAG/g et 28.56mg EAC/g respectivement.

Dans l'extrait méthanolique des feuilles la teneur en polyphénols est plus élevée que celle des flavonoïdes, et ce résultat est en accord avec celui obtenu par **Yousefi et al. (2016)** en Iran. Contrairement à **Ghedadba et al. (2014)** qui dans son étude sur le marrube blanc de Batna, la teneur en flavonoïdes s'est révélée largement plus élevée que celle des polyphénols. La teneur en tanins est largement plus élevée que celle des polyphénols et des flavonoïdes dans les deux parties de la plante (79mg EC/g dans les feuilles et 135mg EC/g dans les fleurs), et ces résultats sont accord avec ceux obtenus par **Hayat et al. (2020)** dans son étude sur la même espèce au Maroc. Une autres étude a été faite sur la même espèce à M'Sila, le dosage des polyphénols dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne était de l'ordre de 18mg EAG/g (**Boudjellal, 2013**), une valeur qui est largement inférieur à celle qu'on a obtenu (29.19mg EAG/g).

Les teneurs des polyphénols, flavonoïdes et des tanins varient en fonction des conditions géographiques et climatiques du lieu de la récolte, du type d'extrait et de la polarité des solvants (**Hayat et al., 2020**), ce qui explique la différence remarquable dans les valeurs des teneurs obtenues dans notre étude comparées à d'autres études menées sur le marrube blanc récolté d'autres régions et pays.

4. Etude de l'activité antimicrobienne

4.1. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antimicrobiens standards

La sensibilité des souches microbienne testées vis-à-vis des agents antimicrobiens standards a été évaluée par antibiogramme, les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau n°10.

Tableau n°10 : Résultats de l'activité antimicrobienne des antibiotiques et des antifongiques exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Agent anti-microbien	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Amoxicilline	21.5±0.41	17.5±0.41	20.83±0.62	24.17±0.24	22.5±0.41	19.2±0.16	-
Tobramycine	22.14±0.23	19.67±0.47	25±0.00	18.33±0.24	12.5±0.41	0	-
Norfloxacine	25±0.41	29±0.00	20.17±0.23	0	33±1.41	26.33±0.47	-
Sulfaméthoxazole	12.33±0.47	24.5±0.41	8.17±0.24	0	13.17±0.24	15±0.00	-
Chloramphénicol	25.17±0.24	13.33±0.47	20.5±0.41	0	21.5±0.41	22±0.00	-
Acide Nalidixique	15±0.00	21.67±0.47	16.33±0.47	8±0.00	14.5±0.41	21±0.82	-
Erythrocyne	16±0.82	8.5±0.41	0	0	0	0	-
Néomycine	13.33±0.47	18.83±0.62	17±0.00	8.5±0.41	14.67±0.47	20±0.81	-
Céfalexine	24.5±0.41	26.6±0.94	21.83±0.24	22.5±0.41	15.5±0.41	14.17±0.85	-
Doxycycline	18.57±0.41	0	8.67±0.62	10.17±0.24	14.07±0.33	15.13±0.19	-
Pipéracilline	9±0.82	8±0.00	9±0.41	0	0	0	-
Pristinamycine	10±0.00	15±0.41	10±0.81	14.5±0.41	16.5±0.41	17±0.00	-
Econazole	-	-	-	-	-	-	24.17±0.62
Miconazole	-	-	-	-	-	-	12.83±1.31
Clotrimazole	-	-	-	-	-	-	21.5±0.41

B.c: *Bacillus cereus* ATCC 10876; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P.m: *Proteus mirabilis* ATCC 35659; S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; K.p: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; C.a: *Candida albicans* ATCC 10231 ; ATCC : American Type Culture Collection. Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type.

En se basant sur les résultats présentés dans le **tableau n°10**, nous constatons que les souches microbiennes testées ont présenté différents degrés de sensibilité à la plupart des agents antimicrobiens employés. Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés varient entre 8 et 33 mm.

Les antibiotiques qui ont donné les plus grandes zones d'inhibition sont les suivants : norfloxacine (NOR) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (33mm), *Escherichia coli* ATCC 25922 (29mm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (26.33mm) et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (25mm), céfalexine (CN) contre *Escherichia coli* ATCC 25922 (26.6mm) et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (24.5mm), chloramphénicol (C) contre *Bacillus cereus* ATCC 10876 (25.17mm) et tobramicine (TOB) contre *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (25mm).

Les antibiotiques qui se sont montrés inactifs contre plus de deux bactéries sont : érythromycine vis-à-vis *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, et pipéracilline vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Concernant les antifongiques contre *Candida albicans* ATCC 10231, l'éconazole s'est avéré être le plus actif avec un diamètre d'inhibition de 24.17mm, suivi du clotrimazole (21.5mm) et miconazole (12.83mm).

4.2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits bruts

4.2.1. *Ammi visnaga*

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, et les résultats sont présentés dans le **tableau n°11**.

Tableau n°11 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Souches	<i>Ammi visnaga</i>
<i>B. cereus</i> ATCC10876	33.97 ± 0.34
<i>E. coli</i> ATCC 25922	22.53 ± 0.37
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	24.93 ± 0.33
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	19.47 ± 0.50
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	36.1 ± 0.22
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	17.73 ± 0.54
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	32.57 ± 1.44

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type; ATCC: American Type Culture Collection.

En se basant sur les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (**tableau n°11**), nous constatons que cette dernière a exercé un pouvoir antimicrobien très important contre les souches microbiennes testées, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 17.73 et 36.1 mm. Les souches les plus sensibles sont *S. aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 10876 et *C. albicans* ATCC 10231 avec des diamètres de zones d'inhibition de 36.1, 33.97 et 32.57 mm respectivement. La souche la moins sensible est *K. pneumoniae* ATCC 700603 avec un diamètre de zone d'inhibition de 17.73mm.

Plusieurs études se sont concentrées sur l'importante activité inhibitrice des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*, montrant leur efficacité contre divers micro-organismes. **Khalfallah et al. (2011)** confirme que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* possède un effet antimicrobien puissant contre un large éventail de microorganismes, les diamètres des zones d'inhibition obtenus sur *S. aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont respectivement 25, 29 et 25 mm. Ces résultats montrent que *S. aureus* ATCC 43300 était moins sensible. Une autre étude faite par **Brahmi et al. (2014)** a montré que *S. aureus* ATCC43300 (15 mm), *P. aeruginosa* ATCC27853 (16 mm), *P. mirabilis* ATCC49565 (15 mm) et *K. pneumoniae* ATCC 33495 étaient moins sensibles, par contre *E. coli* ATCC25922 (30 mm) était plus sensible à l'huile essentielle. En revanche, **Satrani et al. (2004)** a démontré que *S. aureus* et *B. subtilis* sont plus résistantes qu'*E. Coli*, ces résultats diffèrent des nôtres, dont nous avons trouvé une plus grande sensibilité chez *S. aureus* par rapport à *E. coli*.

➤ **Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)**

Les résultats de la détermination des paramètres antimicrobiens (CMI, CMB et CMF) de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* sont exprimés dans le **tableau n°12**.

Tableau n°12: Valeurs des paramètres antimicrobiens de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* exprimées en µl/mL

souches	CMI	CMB CMF	CMB/CMI CMF/CMI	Activité
<i>B.c</i>	1.56	1.56	1	Bactéricide
<i>E.c</i>	3.12	6.25	2	Bactéricide
<i>P.m</i>	3.12	3.12	1	Bactéricide
<i>P.a</i>	12.5	50	4	Bactéricide
<i>S.a</i>	12.5	12.5	1	Bactéricide
<i>K.p</i>	12.5	25	2	Bactéricide
<i>C.a</i>	3.12	3.12	1	Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; B.c: *Bacillus cereus* ATCC 10876; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P.m: *Proteus mirabilis* ATCC 35659 ; S.a : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ; K.p : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; C.a : *Candida albicans* ATCC 10231

En se basant sur les résultats des paramètres antimicrobiens de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (**tableau n°12**), nous remarquons que cette dernière a exercé une grande activité contre les souches microbiennes testées, les valeurs obtenues sont d'une gamme allant de 1.56 à 12.5 µl/mL pour la CMI et de 1.56 à 50 µl/mL pour la CMB et la CMF.

La susceptibilité a été particulièrement importante chez *B. cereus*, la CMI et la CMB ont été toutes deux enregistrées à la plus faible valeur qui est de l'ordre de 1.56 µl/mL. Par contre la sensibilité est moins importante chez *P. aeruginosa*, la CMI et la CMB sont à des valeurs plus élevées, 12.5 et 50 µl/mL respectivement. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de **Khalfallah et al. (2011)** et **Brahmi et al. (2014)** où *pseudomonas aeruginosa* était plus sensible que les autres. Les résultats de **Satrani et al. (2004)** sont en accord avec les nôtres en ce qui concerne la sensibilité de *E. coli* par rapport à *S. aureus*. Effectivement, *E. coli* a été plus sensible que *S. aureus* à l'huile essentielle d'*A. visnaga*.

Selon **Marmonier (1990)**, si le rapport d'activité CMB/CMI ou CMF/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à 4, cette dernière est qualifiée de substance bactéricide ou fongicide et si le rapport est supérieur à 4, elle est alors dite bactériostatique ou fongistatique. D'après les résultats du **tableau n°12**, l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est bactéricide et/ou fongicide envers toutes les souches microbiennes testées.

Les actions antimicrobiennes d'une huile essentielle sont liées à son hydrophobie, l'une des caractéristiques les plus importantes dans les huiles essentielles, elle entraîne une perméabilité cellulaire accrue et une fuite conséquente des constituants cellulaires (**Faleiro, 2011**). Notre huile a montré une meilleure activité contre les souches Gram-positives que les souches Gram-négatives, comme la majorité des huiles essentielles testées pour leur propriétés antimicrobiennes, ceci est dû à la différence dans la structure de la paroi cellulaire (**Trombetta et al., 2005**), étant donné que le principal site d'action des huiles essentielles est la membrane bactérienne (**Brahmi et al., 2014**), la présence d'une membrane externe chez les bactéries Gram-négatives forme un obstacle et les rend plus résistantes à l'action de l'huile (**Teneva et al., 2019**). Cela explique la forte sensibilité observée chez *B. cereus* (33.97 mm) et *S. aureus* (36.1 mm) envers notre huile essentielle.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est principalement liée à son profil chimique, ce dernier montre une dominance du limonène, p-cymène, carvacrol et du thymol. Le limonène pourrait démolir la morphologie de la paroi cellulaire, et la membrane cellulaire pourrait entraîner la fuite de certaines substances intracellulaires, telles que l'extravasation de protoplasmes, entraînant ainsi la mort cellulaire (**Han et al., 2019**). Une étude faite par **Zahi et al. (2017)** sur le mode d'action du limonène, montre que la structure sphérique de *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* et la structure bacilliforme d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis* après avoir été traitées par ce dernier, présentent différentes formes de distorsion et de déformation. Le carvacrol et le thymol, sont des monoterpénoïdes phénoliques structurellement très similaires (**Rua et al., 2019**), leur combinaison produit un effet additif contre les microorganismes (**Faleiro, 2011**). Leur effet antimicrobien se produit lorsque la fraction hydrophobe de ces molécules interagit avec le domaine hydrophobe de la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes, et la présence

de groupes hydroxyle libres de ces composés perturbe les gradients ioniques des cellules bactériennes (Rua *et al.*, 2019 ; Sim *et al.*, 2019). Ils interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique et s'alignent entre les chaînes d'acides gras, provoquant l'expansion et la déstabilisation de la structure membranaire en augmentant sa fluidité et sa perméabilité (Nastro et papalia, 2012). De même, les composants de structure phénolique tels que, Carvacrol et Thymol sont fortement actifs contre les microorganismes et agissent comme des agents dénaturants les protéines (Boutlelis Djahra *et al.*, 2012). Le P-cymène, quant-à lui, précurseur du carvacrol, ce composé hydrophobe provoque un gonflement plus important de la membrane cytoplasmique par rapport au carvacrol (Silva et Fernandes junior, 2010), il améliore également les propriétés antimicrobiennes d'autres substances par le biais de synergies, d'antagonismes et d'effets additifs (Marchese *et al.*, 2017).

Il est possible que les composants en pourcentage inférieur soient impliqués dans la synergie avec les autres composés actifs (Shunying *et al.*, 2005). En effet, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est due à des interactions complexes entre les composants individuels qui conduisent à l'activité globale et pas seulement aux effets des composants majoritaires (Silva *et al.*, 2011 ; Faleiro, 2011).

4.2.2. *Marrubium vulgare*

L'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été évaluée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, et les résultats sont présentés dans le **tableau n°13**.

Tableau n°13 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Souches	Extraits méthanoliques <i>Marrubium vulgare</i>	
	Feuilles	Fleurs
<i>B. cereus</i> ATCC10876	24.33±0.62	17.17±0.62
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15±0.41	10.67±1.03
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	12.17±0.62	8.77±0.21
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	19.33±0.62	23.34±0.62
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	08.33±0.62	9.4±0.54
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10.33±1.03	9.43±0.99
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	8.17±0.62	9.17±0.62

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart type; ATCC: American Type Culture Collection.

En se basant sur les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* (**tableau n°13**), nous constatons que ces derniers ont un faible pouvoir antimicrobien contre les souches microbiennes testées. Pour l'extrait des feuilles, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 08.17 et 24.33 mm, la souche la plus sensible est *B. cereus*, et la moins sensible est *C. albicans*. Pour l'extrait des fleurs, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 8.77 et 23.34 mm, la souche la plus sensible est *P. aeruginosa* et la moins sensible est *P. mirabilis*.

Des travaux antérieurs confirment que les extraits de *Marrubium vulgare* possèdent un effet antimicrobien, une étude faite par **Masoodi et al. (2008)** a montré que *S. aureus* MTCC 740 était beaucoup plus sensible (20mm) et *E. coli* MTCC 443 a donné le même diamètre de zone d'inhibition (15mm), par contre *P. aeruginosa* MTCC 424 a été résistante à l'extrait méthanolique du marrube blanc (0mm). Une autre étude a été faite sur le marrube blanc récolté d'Oran, les résultats sont plus ou moins semblables aux nôtres en ce qui concerne *B. cereus* (31mm), *P. aeruginosa* (16mm) et *E. coli* (16mm), par contre, *S. aureus* (27mm) semble être beaucoup plus sensible (**Bouterfas et al., 2014**). En ce qui concerne la levure *C. albicans*, une autre étude a été faite par **Bouterfas et al. (2016)** sur l'activité antifongique des extraits bruts du marrube blanc, et ses résultats diffèrent des nôtres et montrent que *C. albicans* été beaucoup plus sensible et a donné des diamètres de zone d'inhibition de 26, 24.45 et 23.05 mm contre les extraits méthanoliques de *Marrubium vulgare* récolté de trois régions différentes.

➤ **Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF)**

Les résultats des paramètres antimicrobiens (CMI, CMB et CMF) des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* sont résumés dans le **tableau n°14**.

Tableau n°14: Valeurs des paramètres antimicrobiens des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* exprimées en mg/mL

Souches	Feuilles				Fleurs			
	CMI	CMB CMF	CMB/CMI CMF/CMI	Activité	CMI	CMB CMF	CMB/CMI CMF/CMI	Activité
B.c	62.5	>1000	-	Bactériostatique	250	>1000	-	Bactériostatique
E.c	125	250	2	Bactéricide	250	1000	4	Bactéricide
P.m	250	>1000	-	Bactériostatique	250	1000	4	Bactéricide
P.a	125	1000	8	Bactériostatique	62.5	500	8	Bactériostatique
S.a	125	500	4	Bactéricide	125	500	4	Bactéricide
K.p	125	500	4	Bactéricide	250	>1000	-	Bactériostatique
C.a	250	>1000	-	Fongistatique	125	1000	8	Fongistatique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; CMF : Concentration Minimale Fongicide ; B.c: *Bacillus cereus* ATCC 10876; E.c: *Escherichia coli* ATCC 25922; P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; P.m: *Proteus mirabilis* ATCC 35659 ; S.a : *Stapylococcus aureus* ATCC 6538 ; K.p : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; C.a : *Candida albicans* ATCC 10231.

Les résultats des paramètres antimicrobiens des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* (**tableau n°14**), confirment le faible effet de ces derniers sur les souches microbiennes testées. En effet, les extraits ont montré une activité bactériostatique et/ou fongistatique sur la majorité des souches microbiennes testés.

La susceptibilité a été importante le plus chez *E. coli* à l'extrait des feuilles, la CMI et la CMB ont été enregistrées à des valeurs de l'ordre de 125 et 250 mg/mL respectivement, suivi de *S. aureus* et *K. pneumoniae* avec des valeurs de CMI et CMB à l'ordre de 125 et 500 mg/mL respectivement. Les autres souches été moins sensibles, les CMB ne sont pas définies.

Concernant l'extrait des fleurs, la souche la plus sensible est *S. aureus* avec des valeurs de 125 et 500 mg/mL de CMI et CMB respectivement, suivi d'*E. coli* et *P. mirabilis* avec des valeurs de CMI et CMB à l'ordre de 250 et 100 mg/mL respectivement. Les autres souches ont été moins sensibles.

Selon la caractérisation chimique des extraits, les tanins étaient la principale classe phénolique chez *Marrubium vulgare*, suivi des polyphénols et des flavonoïdes. Le pouvoir antimicrobien des extraits du marrube blanc peut être lié à la présence des composés phénoliques. En effet, les tanins exercent un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et notamment sur *E. coli* et *S. aureus* (**Djahra et al., 2013**), ceci confirme l'activité bactéricide de nos extraits sur ces deux espèces bactériennes. Le mode d'action des tanins peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**). Enfin, ils ont la capacité d'empêcher le développement des colonies

bactériennes par la destruction de leurs parois cellulaires (**Djahra et al., 2013**). Selon certaines recherches actuelles, il existe une relation étroite entre les flavonoïdes et les activités antibactériennes (**Djahra et al., 2012**). Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et solubles et à se complexer avec les parois cellulaires bactériennes, et ils peuvent également perturber les membranes microbiennes (**Cowan, 1999**). Les composés phénoliques, quant-à eux, ils sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes en modifiant ainsi les équilibres enzymatiques (**Djahra et al., 2013**). Ils possèdent une chaîne latérale C3 à un niveau d'oxydation inférieur et ne contenant pas d'oxygène, souvent cités comme antimicrobiens, ils sont considérés comme bactériostatique (**Cowan, 1999**).

Djahra et al. (2013) confirment que les extraits de *Marrubium vulgare* pourraient bien rivaliser les produits chimiques synthétiques, les antibiotiques utilisés dans les traitements des maladies infectieuses nosocomiales.

En ce qui concerne l'effet bactériostatique noté pour la majorité des souches microbiennes testées, selon **Ghedadba et al. (2014)**, ça peut être dû à la structure de la paroi de la bactérie. En effet, la paroi des Gram négatives est très riche en lipopolysaccharides (LPS) qui empêchent les molécules comme les terpènes hydrophobes de lui adhérer. Quant-aux Gram positives, la structure de paroi hétérogène de la bactérie : la présence de l'exopolysaccharide contenant une couche externe, la présence de certains composants comme l'acide techoïque et quelques liens entre les divers composants donnent au polymère fortement réticulé de parois une structure tertiaire inconnue (**Sharif et al., 2009**).

5. Etude de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*A. visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* a été évaluée en utilisant deux test, le test DPPH et le test de FRAP.

5.1. *Ammi visnaga*

5.1.1. Test DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été réalisée par la mesure de la capacité de cette dernière, à différentes concentrations, à piéger le radical libre DPPH. L'acide ascorbique a été utilisé, à différentes concentrations, comme antioxydant standard afin de comparer son pouvoir antiradicalaire à celui des plantes étudiées. La CE₅₀ a été également calculée. Les résultats obtenus sont illustrés dans les **figures n°33 et 34** et le **tableau n°12**.

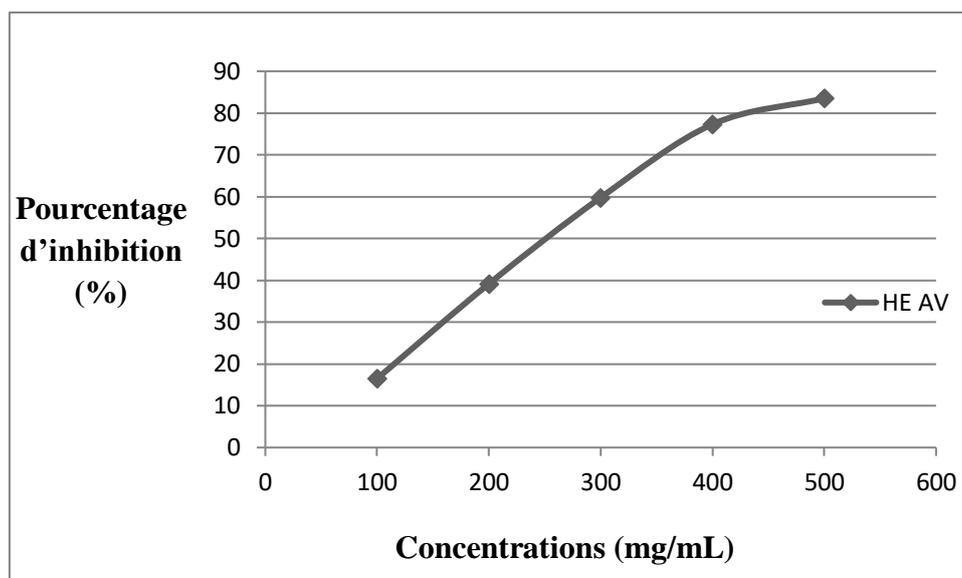


Figure n°33 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

La figure n°33 indique une augmentation des pourcentages d'inhibition de l'absorbance de la solution du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle testée. A la plus faible concentration (100 mg/mL), l'huile de *Ammi visnaga* a présenté un PI de 16.79%, tandis qu'à la plus grande concentration (500 mg/mL), le PI a atteint 83.50%. Ceci montre que l'espèce *Ammi visnaga* possède un grand potentiel antioxydant.

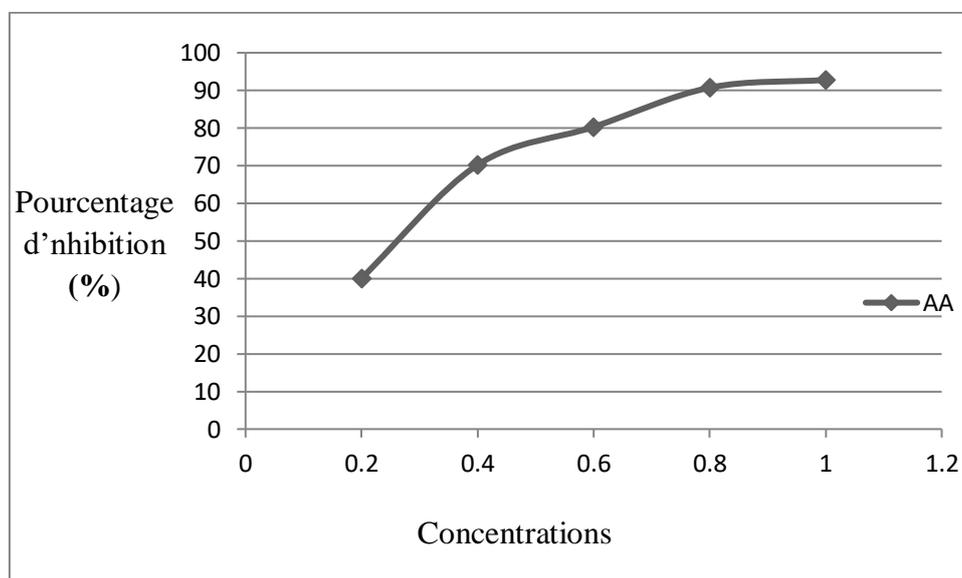


Figure n°34 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique

Nous notons d'après la figure n°34, que l'acide ascorbique a provoqué une réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire DPPH-H. la réduction de l'absorbance du DPPH a été beaucoup plus importante, en effet, à seulement 0.2 mg/mL le PI a atteint 40.10%, puis à

partir de cette concentration, une augmentation extrêmement intense a été observée donnant ainsi, à 0.4 mg/mL, un PI de 70.20% qui atteint une réduction de 92.98% à la plus grande concentration (1mg/mL).

Tableau n°15 : Valeurs de la concentration efficace 50 de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et de l'acide ascorbique obtenues par le test de DPPH

Huile essentielle	<i>Ammi visnaga</i>	Acide ascorbique
CE ₅₀ (mg/mL)	269.74	0.21

La CE₅₀ exprime la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% de la concentration du radical libre DPPH. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. En effet, plus la valeur de CE₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande (**Dung et al., 2008**). Sa détermination permet d'évaluer et de comparer l'efficacité de nos échantillons. D'après les résultats du **tableau n°15**, la valeur de CE₅₀ de l'acide ascorbique est de 0.21 mg/mL, tandis que celle de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est de 269.74 mg/mL.

5.1.2. Test de FRAP

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été réalisée par la mesure de l'aptitude de cette dernière, à différentes concentrations, à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). L'acide ascorbique a été utilisé, à différentes concentrations, comme antioxydant standard afin de comparer son pouvoir réducteur, exprimé en absorbances, à celui des plantes étudiées. La CE₅₀ a été également calculée. Les résultats obtenus sont illustrés dans les **figures n°35 et 36** et le **tableau n°16**.

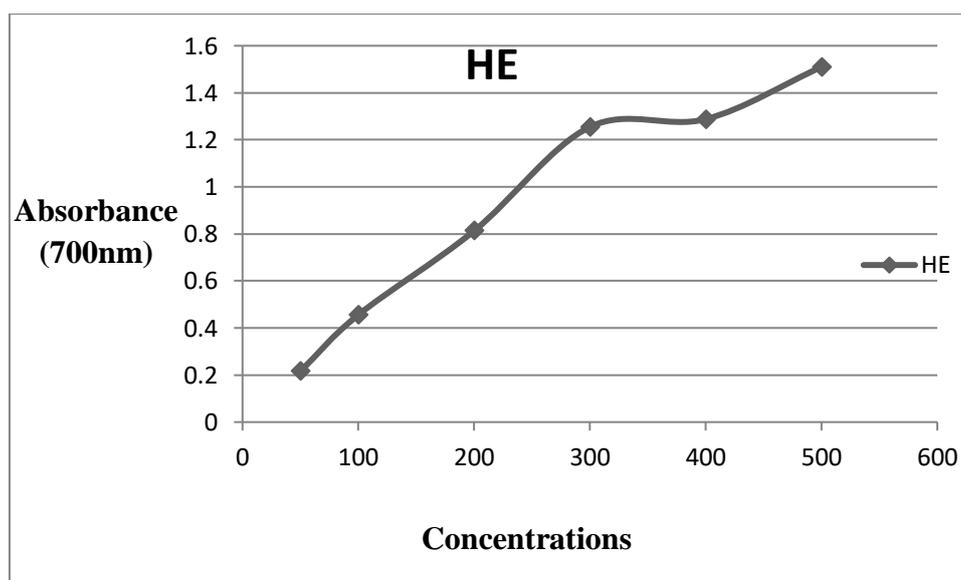


Figure n°35 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

Nous remarquons que le pouvoir réducteur, exprimé en absorbances, de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est proportionnel à l'augmentation des concentrations, à la plus faible concentration (100 mg/mL), l'huile a présenté une densité optique (DO) de 0.456. Tandis qu'à la plus grande concentration (500 mg/mL), la densité optique est de l'ordre de 1.510. Ceci confirme le grand potentiel antioxydant de l'espèce *Ammi visnaga*.

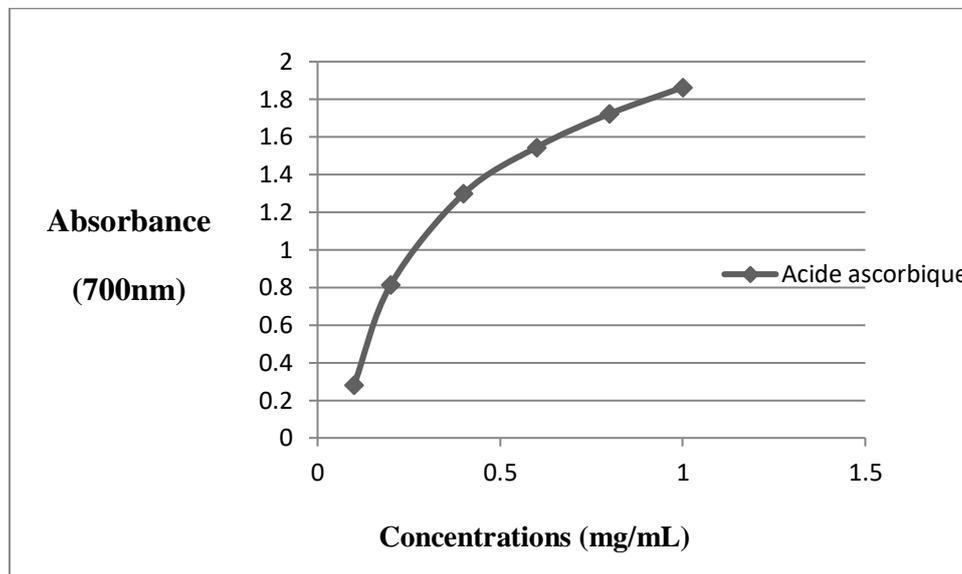


Figure n°36 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

Nous notons selon les résultats de la figure n°36 que la réduction du fer par l'acide ascorbique, a été bien plus importante, en effet, la plus grande absorbance a été de 1.863 et ce, à 1 mg/mL.

Tableau n°16 : Valeurs de la concentration efficace 50 de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP

Huile essentielle	<i>Ammi visnaga</i>	Acide ascorbique
CE ₅₀ (mg/mL)	158	0.054

D'après les résultats du **tableau n°16**, la valeur de CE₅₀ de l'acide ascorbique est de 0.054 mg/mL, tandis que celle de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est de 158 mg/mL.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux test, nous avons choisis le test DPPH et le test de FRAP, parmi les tests les plus utilisés pour l'évaluation de l'activité en sujet (**Pérez-Jiménez et al., 2008**). Notre huile a présenté une activité antioxydante modérée par rapport à l'antioxydant standard. En comparant les CE₅₀, nous pouvons conclure que le test de FRAP est bien plus puissant que le DPPH. L'évaluation par le DPPH est intéressante car le radical du DPPH est plus stable que les radicaux hydroxyles ou superoxyde (**Qadir et al., 2019**). Le test de FRAP, utilisé comme test confirmatif, il est simple, rapide, peu coûteux, ne nécessite pas

d'équipement spécialisé et donne des résultats rapides et reproductibles (Benzie et strain, 1996 ; Prior *et al.*, 2005).

L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est peu étudiée pour son pouvoir antioxydant, une étude a été menée à ce sujet en Iran par Rasooli *et al.* (2007), le résultat montre des pourcentages d'inhibition de 21.04% et 33.73% par le test DPPH et le b-carotène respectivement. Ces valeurs sont largement inférieures à celle notée au cours de notre étude (85%).

Les huiles essentielles sont des mélanges assez complexes constitués de plusieurs dizaines de composants, et cette complexité rend souvent difficile l'explication du schéma d'activité. Pour cette raison, de nombreux rapports sur les potentiels antioxydants des huiles essentielles font souvent référence à des concepts tels que la synergie, l'antagonisme et l'additivité. (Benhassouna *et al.*, 2017).

L'activité antioxydante d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique (Saleh *et al.*, 2010 ; Zhigzhitzhapova *et al.*, 2019), donc le pouvoir antioxydant de notre huile peut être attribué à la présence du limonène (27.84%), du carvacrol (18.71%) et du thymol (14.23%). En effet, il a été rapporté que le limonène a la capacité de piéger les radicaux libres (Bancali *et al.*, 2015 ; Teneva *et al.*, 2019). Selon Saleh *et al.* (2010) le carvacrol et le thymol sont aussi responsables de l'activité en sujet.

5.2. *Marrubium vulgare*

5.2.1. Le test DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été réalisée par la mesure de la capacité de ces derniers, à différentes concentrations, à piéger le radical libre DPPH. L'acide ascorbique a été utilisé, à différentes concentrations, comme antioxydant standard afin de comparer son pouvoir antiradicalaire à celui des échantillons étudiées. La CE₅₀ a été également calculée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure n°37 et le tableau n°17.

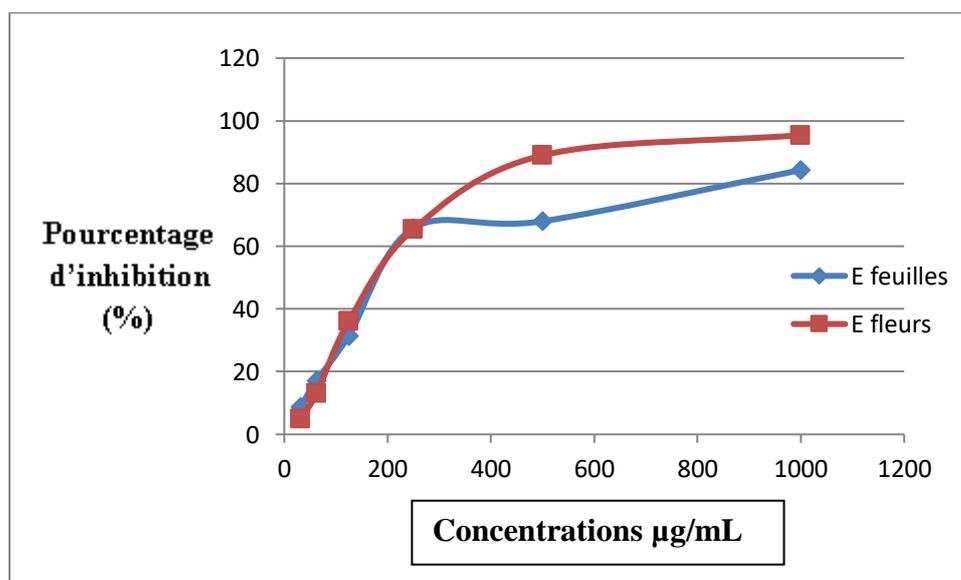


Figure n°37 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*

La figure n°37 indique une augmentation des pourcentages d'inhibition de l'absorbance de la solution du DPPH en fonction des concentrations des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*. A la plus faible concentration (62.5 µg/mL), l'extrait des feuilles a présenté un PI de 17.10%, largement plus important que celui des fleurs qui est de l'ordre de 13%. Par contre, à la plus grande concentration (1000 µg/mL), l'extrait des feuilles a présenté un PI de 84.31%, une valeur qui est largement plus inférieure à celle de l'extrait des fleurs (95.44%). Ceci montre que les extraits méthanoliques de l'espèce *Marrubium vulgare* possèdent un pouvoir antioxydant très important.

Tableau n°17 : Valeurs de la concentration efficace 50 des extraits de *Marrubium vulgare* et de l'acide ascorbique obtenues par le test DPPH

Extraits	<i>Marrubium vulgare</i>		Acide ascorbique
	Feuilles	Fleurs	
CE ₅₀ (µg/mL)	625.53	591.73	210

D'après les résultats du tableau n°17, la valeur de CE₅₀ de l'acide ascorbique est de 210 µg/mL, tandis que celles des extraits des feuilles et des fleurs du marrube blanc sont de 625.53 µg/mL et 591.73 µg/mL respectivement. Nous remarquons que le pouvoir du piégeage du radical DPPH de l'extrait des fleurs est plus important que celui des feuilles.

5.2.2. Le test de FRAP

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* a été réalisée par la mesure de l'aptitude de ces derniers, à différentes concentrations, à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). L'acide ascorbique a été utilisé, à différentes concentrations, comme antioxydant de référence afin de comparer son pouvoir réducteur, exprimé en absorbances, à celui des échantillons étudiées. La CE₅₀ a été également calculée. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure n°38 et le tableau n°18.

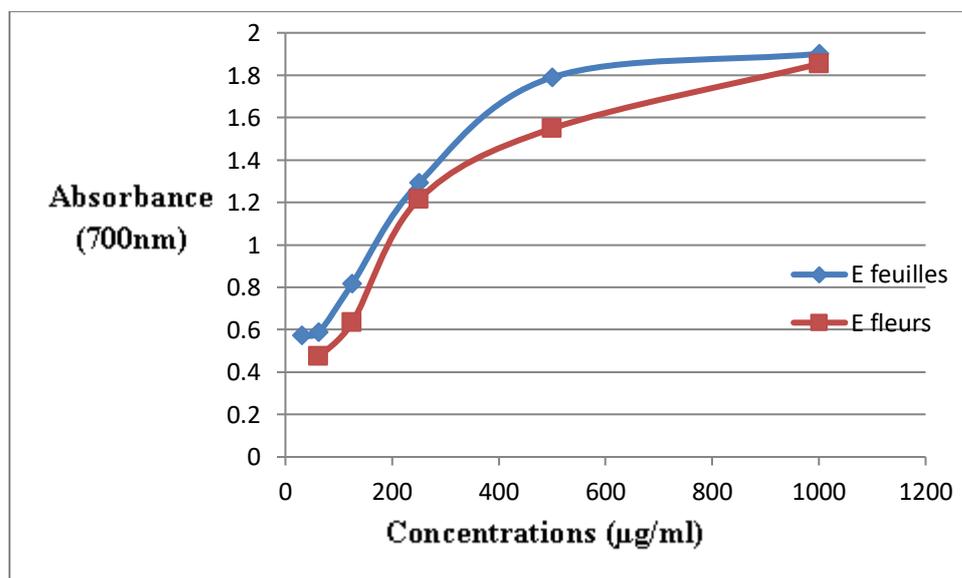


Figure n°38 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare*

Nous remarquons que le pouvoir réducteur, exprimé en absorbances, des extraits des feuilles et des fleurs du marrube blanc est proportionnel à l'augmentation des concentrations. L'effet antioxydant de l'extrait des feuilles était plus important que celui des fleurs. En effet, à la plus faible concentration (62.5 µg/mL), l'extrait des feuilles a présenté une DO plus importante que celle des fleurs, qui sont de l'ordre de 0.572 et 0.474 respectivement. D'autre part, à la plus grande concentration (1000 µg/mL), les DO notées sont de l'ordre de 2.901 et 1.353 respectivement pour les feuilles et les fleurs. Ceci confirme l'importance du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques de l'espèce *Marrubium vulgare*.

Tableau n°18 : Valeurs de la concentration efficace 50 des extraits de *Marrubium vulgare* et de l'acide ascorbique obtenues par le test de FRAP

Extraits	<i>Marrubium vulgare</i>		Acide ascorbique
	Feuilles	Fleurs	
CE ₅₀ (µg/mL)	225.66	376.7	54

D'après les résultats du **tableau n°18**, la valeur de CE₅₀ de l'acide ascorbique est de 54 µg/mL, tandis que celles des extraits des feuilles et des fleurs du marrube blanc sont de 225.66 µg/mL et 376.7 µg/mL respectivement. Nous remarquons que le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles est plus important que celui des fleurs.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce *Marrubium vulgare* nous ont permis de constater que les deux extraits possédaient un fort pouvoir antioxydant, mais qui reste largement plus inférieur à celui de l'acide ascorbique. Par comparaison, **Edziri et al. (2012)** ; **Boulila et al. (2015)** et **Amri et al. (2017)**, ont montré par le test DPPH, que les extraits méthanoliques des feuilles de *M. vulgare* ont été largement plus actifs (CE₅₀: 150, 118.20 et 38.56 µg/mL respectivement). **Bouterfas et al. (2016b)** a fait le même constat dans son étude du pouvoir antioxydant du marrube blanc, par le test DPPH, récolté de trois régions différentes, le résultat a présenté un pouvoir antioxydant très important (33.7, 52.7 et 124 µg/mL).

Une étude menée par **Hayat et al. (2020)** sur la même espèce récoltée de deux différentes régions, a montré aussi que l'extrait méthanolique des feuilles de *M. vulgare* présente une activité antioxydante importante. Les CE₅₀ enregistrées sont de l'ordre de 333.58 µg/mL, une valeur qui est largement plus inférieure et plus importante des valeurs que nous avons obtenues, et 793.75 µg/mL, une valeur moins importante comparée à celle que nous avons obtenue. Une autre étude est menée par **Kozyra et al. (2019)** a présenté un résultat plus ou moins semblable au nôtre, avec une valeur de CE₅₀ = 570 µg/mL.

Le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des deux parties de la plante peut être attribué à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes (**Edziri et al., 2012** ; **Amri et al., 2017**), en effet, nos extraits ont présenté une teneur importante en polyphénols et en flavonoïdes. **Bouterfas et al. (2016b)** confirme cet effet en signalant qu'il y a une corrélation linéaire entre l'activité antioxydante et l'intensité de la couleur de l'extrait. Selon **Berreta et**

al. (2005), un extrait de couleur foncée a une teneur élevée en polyphénols, donc un fort pouvoir antioxydant. Le fort pouvoir antioxydant des flavonoïdes a été également confirmé par **Hanasaki *et al.* (1994)** et **Seyoum *et al.* (2006)**. L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'explique par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux (**Bahorun *et al.*, 1996**).

6. Etude pharmacologique

6.1. Toxicité aigue

La toxicité aigue de l'huile essentielle d'*A. visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* a été réalisée par administration orale chez des rats wistar. Basée sur la méthode par classe de toxicité aigue décrite par la ligne directrice OECD code 423 (**OECD, 2001**).

6.1.1. *Ammi visnaga*

Les résultats de la toxicité aigue de l'huile essentielle d'*A. visnaga* nous ont permis de constater après 18 heures, la mort de 3 rats sur 3 dans le lot traité à la dose de 2000 mg/kg, avec un sédentarisme et une salivation durant les premières heures. Un léger sédentarisme et une forte respiration ont été également notés dans le lot traité à la dose de 300 mg/kg. Concernant la troisième dose (50 mg/kg), aucune mort ou de modifications dans les réponses autonomes ou comportementales chez les rats, n'a été observé.

En se basant sur la classification établie par GHS (Globally Harmonized System), notre huile essentielle appartient à la catégorie 4 ($300 < DL_{50} < 2000$ mg/kg), la DL_{50} est égale à 500mg/kg. Selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (**Ahmed et Azmat, 2014**), nous concluons que notre huile est légèrement toxique.

L'huile essentielle d'*A. visnaga* n'a pas été étudiée pour sa toxicité aigue, une étude a été menée par **Korriem *et al.* (2019)** sur la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait éthanolique de la plante, et ce dernier n'a induit aucune mort ni symptôme toxique chez les rats traités.

6.1.2. *Marrubium vulgare*

Les résultats de la toxicité aigue des extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* nous ont permis de constater que ces derniers sont sans danger. En effet, les extraits des deux parties de la plante n'ont montré aucune mort ni de modifications dans les réponses autonomes ou comportementales chez les rats. Tous les animaux ont survécu à l'issue des 7 jours d'observation.

En se basant sur la classification établie par GHS (Globally Harmonized System), nos extraits ne sont pas classés ($DL_{50} = \infty$). Selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (**Ahmed et Azmat, 2014**), nous concluons que nos extraits sont pratiquement non toxiques.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude menée précédemment sur la toxicité de *Marrubium vulgare*, dont aucun signe de toxicité ni de changement dans la consommation de la nourriture et de l'eau n'a été observé après l'administration de l'extrait méthanolique de la

plante (De Oliveira *et al.*, 2011). Une autre étude a été menée par Ibrahim *et al.*, (2016) sur les extrait de la même espèce, la mort de la moitié des souris a été observée à des dose de 2, 2.5, 2.5 et 3 g/kg respectivement pour les extraits de l'ether de pétrole, chloroforme, l'acétat d'éthyle et le méthanol. Jaouhari *et al.* (1999), a signalé d'autre part que l'infusion du marrube blanc a présenté une tachycardie 1 h après la prise et une perte d'appétit après 3 h chez les souris traitées. Par contre, Rhallab *et al.* (2014), n'a observé aucun signe de toxicité ni de décès au cours des 14 jours d'observation.

6.2. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*A. visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* a été réalisée par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine chez les rats Wistar.

6.2.1. *Ammi visnaga*

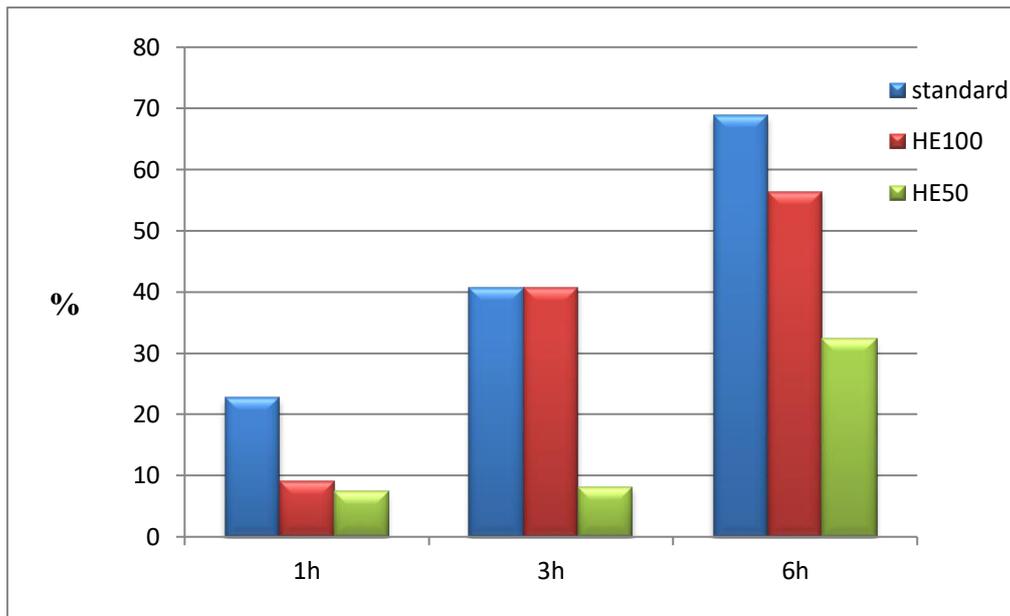
Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*A. visnaga* sont présentés dans le **tableau n°19** et la **figue n°39**

Tableau n°19 : Effet de l'huile essentielle d'*A. visnaga* sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats.

Heure	Diamètre de la patte (mm)			
	Contrôle (10mL/kg)	Standard (10mg/kg)	HE <i>A. visnaga</i>	
			50 mg/kg	100 mg/kg
1H	6,08 ± 0,14	5.94 ± 0,19	6,15 ± 0,14	6,31 ± 0,08
2H	6,17 ± 0,11	5,69 ± 0,21	5,93 ± 0,16	5,76 ± 0,24
3H	6,05 ± 0,23	5,4 ± 0,13	6,10 ± 0,26	5,37 ± 0,15
4H	6,42 ± 0,17	5,54 ± 0,15	6,43 ± 0,33	5,79 ± 0,09
5H	6,41 ± 0,23	4,89 ± 0,25***	6,51 ± 0,29	5,83 ± 0,19
6H	6,27 ± 0,07	4,66 ± 0,27***	5,56 ± 0,14	5,02 ± 0,15*

Contrôle : véhicule (Tween 80 à 1%) ; Standard : Diclofénac ; HE : Huile essentielle ; * p < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 différences statistiquement significatives comparé au groupe témoin.

Les résultats du **tableau n°19** indiquent une augmentation progressive du volume de la patte suite à l'injection de la carragénine, atteignant son pic à 4 heures dans le groupe témoin (6,42 ± 0,17 mm). Dans le groupe standard, traité au diclofénac, l'inflammation a commencé à diminuer après 2 heures, et par rapport au groupe témoin, elle a très significativement réduit le volume de la patte (p<0,001) à partir de la 5^{ème} heure (4.89 ± 0,25 mm). Tandis que l'huile essentielle d'*A. visnaga* a considérablement réduit le volume des pattes (P < 0,05) à la dose la plus élevée (100 mg/kg) au bout de 6 heures (5.02 ± 0,15 mm).



Standard : Diclofénac ; HE : Huile essentielle

Figure n°39 : Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par l'huile essentielle d'*A. visnaga* et le diclofénac

La **figure n°39** montre l'effet inhibiteur exercé par l'huile essentielle et le diclofénac sur le développement de l'inflammation en fonction des heures. Nous remarquons que le seuil maximal a été atteint à 6 heures. Les pourcentages d'inhibitions obtenus à 50 et 100 mg/kg sont respectivement 32.28% et 56.35%. Le diclofénac a été plus actif vu que le pourcentage d'inhibition était supérieur (68.80%).

Les maladies inflammatoires chroniques restent l'un des principaux problèmes de santé de la population mondiale (**Olajide et al., 1999**). Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour l'évaluation des médicaments anti-inflammatoires, l'une des techniques les plus couramment employées est basée sur la capacité de ces agents à inhiber l'œdème produit dans la patte arrière du rat par injection d'un agent phlogistique, la carragénine. (**Winter et al., 1962**). Le développement de l'œdème induit par la carragénine est bi-phasique, la première phase (1 à 2 heures) est attribuée à la libération d'histamine, de 5-HT et de kinines, tandis qu'à la deuxième phase (3 à 6 heures) il y a libération de prostaglandines, leucotriènes, lysozymes, protéases, oxyde nitrique (NO) et aussi il y a infiltration locale de neutrophiles (**Olajide et al., 1999 ; Banerjee et al., 2000**). La COX-2, est une enzyme inductible trouvée dans les cellules inflammatoires activées, elle joue un rôle crucial dans la production de cytokines et dans la libération de médiateurs prostanoides (**Fachini-queiroz et al., 2012**).

A travers nos résultats, nous avons constaté que l'huile essentielle testée à différentes doses, possédait un effet anti-inflammatoire considérable, en effet, au bout de 6 heures, elle a pu inhiber l'inflammation de façon significative comparée au groupe témoin. L'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*A. visnaga* n'a pas été étudié auparavant, mais il a été montré selon la teneur de la plante en visnagine, qui provoque une diminution de l'expression

de l'ARNm et de la libération des cytokines (Khalil *et al.*, 2020). De plus, la visnagine a un effet neuroprotecteur en termes de suppression de la pathogenèse induite par l'acide kaïnique dans le cerveau, et ceci est associé à ses effets anti-inflammatoires (Kwon *et al.*, 2010).

L'effet de notre huile peut être principalement attribué à ses composés majeurs. Le thymol a une action importante sur les enzymes COX (Veras *et al.*, 2013). Une étude réalisée par Riella *et al.* (2012), a montré le rôle important du thymol sur la réponse inflammatoire avec une inhibition de 35,3% ($p < 0,001$) sur la réponse de l'œdème (Riella *et al.*, 2012). Des recherches antérieures ont indiqué que le carvacrol a également un rôle important dans la réponse inflammatoire en supprimant le LPS induit par la COX-2, ce qui peut provoquer la répression de l'inflammation (Tsai *et al.*, 2011). Le p-cymène, pourrait aussi avoir une part de contribution à l'activité, il est capable d'inhiber également les enzymes COX, et de bloquer les voies de signalisation, entraînant ainsi une réduction dans la sécrétion des cytokines (Zhong *et al.*, 2013 ; Veras *et al.*, 2013). Ceci explique l'effet anti-inflammatoire de notre huile étant donné que le p-cymène, le thymol et le carvacrol sont parmi ses composants majoritaires.

6.2.2. *Marrubium vulgare*

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* sont présentés dans le **tableau n°20** et la **figure n°40**

Tableau n°20 : Effet des extraits de *Marrubium vulgare* sur l'œdème plantaire induit par carragénine chez les rats.

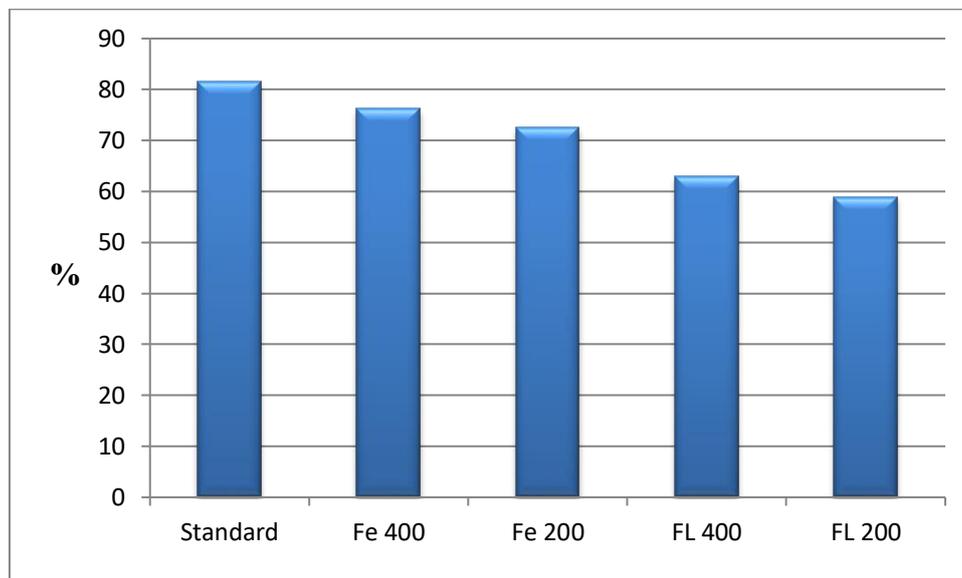
Traitement	Diamètre de la patte (mm)					
	1H	2H	3H	4H	5H	6H
Contrôle	6,08±0,28	6,97±0,21	6,05±0,47	6,42±0,35	6,41±0,47	6,27±0,14
Standard	5,34±0,18	5,68±0,41	5,54±0,31	4,89±0,49** *	4,76±0,39** *	4,26±0,19** *
Fe 200 mg/kg	4,76±0,19	4,80±0,23	4,8 ±0,09*	4,61±0,56** *	4,40±0,39** *	3,85±0,57** *
Fe 400 mg/kg	5,48±0,43	4,35±0,32	4,17±0,63** *	4,57±0,67** *	4,6±0,29***	4,40±0,12** *
FL 200 mg/kg	4,94±0,50	4,31±0,35	4,81±0,61* *	4,36±0,35** *	4,58±0,56** *	4,35±0,26** *
FL 400 mg/kg	4,91±0,35	4,74±0,19	4,39±0,23** *	4,61±0,50** *	4,52±0,65** *	4,27±0,64** *

Contrôle : eau distillée ; Standard : Diclofénac ; Fe : Feuilles ; FL : Fleurs ; * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ différences statistiquement significatives comparé au groupe témoin.

D'après le **tableau n°20**, nous remarquons une augmentation progressive du volume de la patte suite à l'injection de la carragénine, atteignant son pic à 4 heures dans le groupe témoin ($6,42 \pm 0,35$ mm). Comparé à ce dernier, les groupes traités avec les différentes doses des extraits du marrube blanc, montrent une diminution significative ($p < 0,05$) de l'œdème à la

dose de 200 mg/kg, et hautement significative ($p < 0.001$) à la dose de 400 mg/kg, et ce, à partir de 3 heures.

Par ailleurs, dans le groupe standard, traité au diclofénac, l'inflammation a commencé à diminuer après 3 heures, et par rapport au groupe témoin, le volume de la patte a été très significativement réduit ($p < 0,001$) à partir de la 4^{ème} heure ($4,89 \pm 0,49$ mm). Au bout de 6 heures, le volume de la patte a atteint $4,26 \pm 0,19$ mm.



Standard : Diclofénac ; Fe400 : Feuilles 400mg/kg ; Fe200 : Feuilles 200mg/kg ; FL400 : Fleurs 400mg/kg ; FL200 : Fleurs 200mg/kg.

Figure n°40 : Inhibition de l'œdème plantaire (en %) par les extraits de *Marrubium vulgare* après 6 heures.

La figure n°40 montre l'effet inhibiteur exercé par les extraits des feuilles et des fleurs du marrube blanc et du diclofénac sur le développement de l'inflammation après six heures. Nous remarquons que le diclofénac a été le plus actif vu que son pourcentage d'inhibition était supérieur à celui des deux extraits (81.64%). Nous remarquons aussi qu'au bout de six heures, l'extrait des feuilles était plus actif que celui des fleurs, les pourcentages d'inhibition obtenus sont respectivement 76.18 et 62.96% à la dose de 400 mg/kg. Et 72.56 et 58.98 % à la dose de 200 mg/kg.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *M. vulgare* nous ont permis de constater que ces derniers ont un très fort pouvoir anti-inflammatoire, qui est proche de celui du diclofénac. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Kanyonga et al. (2011)** et **Ghedadba et al. (2016)**. L'extrait méthanolique a montré une inhibition significative (34,0 %) à une dose de 200 mg/kg dans le test d'œdème de la patte arrière induit par la carragénine, cette activité est similaire à celle des médicaments de référence (**Kanyonga et al., 2011**). L'administration d'extrait méthanolique de *M. vulgare* à la dose de 200 mg/kg a réduit significativement ($P < 0,05$) l'œdème plantaire chez les rats dès la troisième heure de traitement (**Ghedadba et al., 2016**).

Une étude faite par **Yousefi et al. (2014)** montre que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* a de forts effets protecteurs ($P < 0.001$) contre l'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol et ceci est dû à ses effets anti-inflammatoires. Une autre étude a été faite au sujet l'effet de l'extrait méthanolique des feuilles du marrube blanc sur l'inflammation gastrique, montre que le traitement avec l'extrait méthanolique et l'oméprazole a réduit significativement l'indice de lésion ($P < 0.05$ et $P < 0.01$ respectivement) comparé au groupe contrôle (**De oliveira et al., 2011**). Ces résultats suggèrent que l'extrait de la plante inhibe la cycloxygénase et de la lipoxigénase (**Kanyonga et al., 2011**).

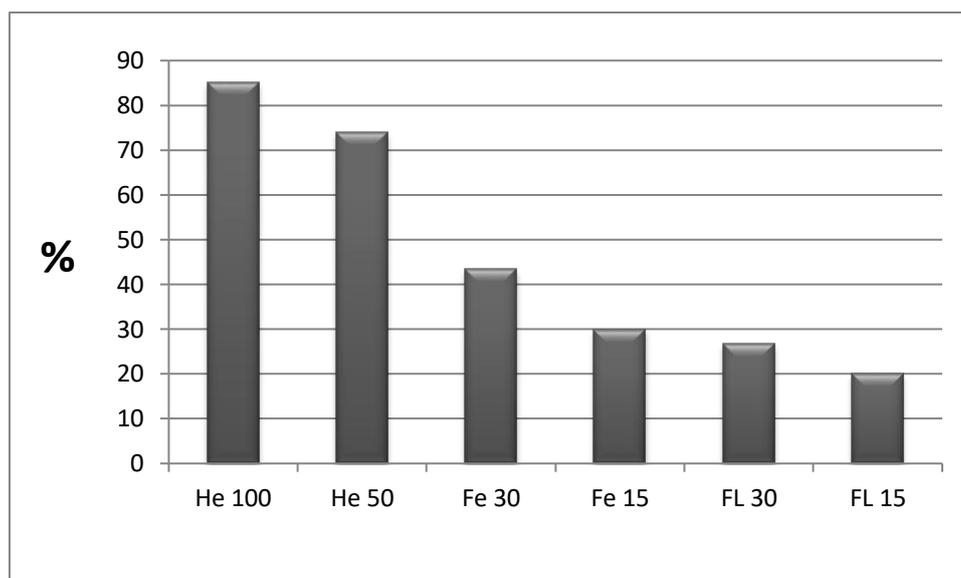
Le pouvoir anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *M. vulgare* pourrait être dû à leur richesse en composés bioactifs, majoritairement des polyphénols et des flavonoïdes (**Ghedadba et al., 2016 ; Lodhi et al., 2017**). En effet, les polyphénols ont été rapportés pour être efficace pour améliorer le stress inflammatoire à court et à long terme (**Joseph et al., 2015**). Ils régulent la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et peuvent supprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires (**Yahfoufi et al., 2018**). En ce qui concerne les flavonoïdes, ils ont également été rapportés pour avoir des effets anti-inflammatoires *in vivo* (**Kim et al., 1993**), Ils ont un effet sur les médiateurs cellulaires des processus physiologiques et pathologiques, sur l'expression d'iNOS et de COX-2 et sur la production et l'expression des molécules pro-inflammatoires (**Kim et al., 2004**). Selon **Rathee et al. (2009)**, le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes est l'inhibition de la biosynthèse des prostanoïdes, de la libération d'histamine, des phosphodiésterases et des protéines kinases. Les flavonoïdes semblent être une alternative prometteuse dans les maladies inflammatoires chroniques dans lesquelles les effets secondaires graves sont fréquents en raison des longues périodes de traitement (**Gomes et al., 2008**).

7. Activité insecticide

L'activité insecticide de l'huile essentielle d'*A. visnaga* et des extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* a été évaluée par la méthode de contact direct avec l'insecte. Les résultats sont présentés dans le **tableau n°21** et la **figure n°41**

Tableau n°21 : Evaluation de la toxicité de différentes doses de l'huile essentielle et des extraits par contact.

Echantillon	HE <i>A. visnaga</i> (µL/mL)			Extraits <i>M. vulgare</i>				
	Contrôle	50	100	Contrôle	Feuilles (mg/mL)		Fleurs (mg/mL)	
					15	30	15	30
<i>Aphis spirecola</i>	1±0,81	7,67±0,47	8,66±0,47	0	3±0,82	4,33±0,47	2±0.81	2,66±0.94



HE : Huile essentielle ; Fe : Feuilles ; FL : Fleurs

Figure n°41 : Taux de mortalité d'*Aphis spiraecola* sous l'effet de différentes doses de l'huile essentielle et des extraits des plantes étudiées

Les résultats de l'activité insecticide (**Tableau n°21 ; Figure n°41**) indiquent que l'huile essentielle d'*A. visnaga* et les extraits des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* ont un pouvoir insecticide très intéressant. Nous remarquons que l'huile essentielle d'*A. visnaga* a un très fort pouvoir sur les insectes, étant donné que son pourcentage de mortalité était de l'ordre de 85.18% à la dose de 100 µl/mL, et 74.07% à la dose de 50 µl/mL.

Le pouvoir insecticide de l'huile essentielle d'*A. visnaga* n'a pas été étudié auparavant, mais celui de la khelline et de la visnagine a été étudié contre *Tetranychus urticae*, une espèce d'acariens, et le moustique *Culex quinquefasciatus*, et a montré que ces dernières étaient très prometteuses et pourraient être utilisées pour le développement de nouveaux acaricides et insecticides botaniques à partir d'*A. visnaga* (**Pavela, 2015 ; Pavela et al., 2016**). De plus, la toxicité de la khelline a également été étudiée par **Maleck et al. (2013)** contre *Oncopeltus fasciatus*, une punaise nord-américaine, et le moustique tigre *Aedes aegypti*, où elle a montré une grande activité. **Brahmi et al. (2016)** a contribué à l'effet insecticide d'extraits méthanoliques d'*A. visnaga* contre *Toxoptera aurantii*, et l'extrait le plus efficace était celui des graines.

Le pouvoir insecticide de notre huile est probablement dû à ces composants majoritaires. **Karr et Coats. (1988)** indiquent que le limonène a des propriétés insecticides, il a été légèrement toxique contre *Sitophilus oryzae*. De plus, le limonène confère une activité toxique contre les moustiques dans le traitement des tissus en coton (**Hebeish et al., 2008**). Concernant le thymol et le carvacrol, **Youssefi et al. (2019)** a souligné que le rapport 1-4 du mélange thymol-carvacrol peut améliorer l'efficacité insecticide sur le moustique *Culex pipiens*. En effet, **Knio et al. (2008)** a étudié leur activité larvicide et a indiqué que ces composés possédaient des effets plus toxiques contre les larves d'*Ochlerotatus caspius*. **Pengsook et al. (2021)** confirme la toxicité du thymol et ces dérivés contre les insectes, en

particulier la chenille *Spodoptera exigua*. Le carvacrol a montré une bonne activité insecticide contre *Aphis craccivora* et *Leucania separata*, ravageurs de l'agriculture qui ont développé une résistance aux insecticides de synthèse conventionnels (Tang *et al.*, 2011). Ainsi, le thymol et le carvacrol peuvent être considéré comme un ingrédient actif pour le développement d'insecticides botaniques (Youssefi *et al.*, 2019).

En ce qui concerne *M. vulgare*, nous avons remarqué que l'extrait des feuilles était plus actif sur les insectes que celui des fleurs, son pourcentage de mortalité était de l'ordre de 43.33 et 30% pour les doses de 30 et 15 mg/mL respectivement. Tandis que le pourcentage de mortalité de l'extrait des fleurs était de l'ordre de 26.66 et 20% respectivement pour les doses de 30 et 15 mg/mL.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Moussouni *et al.* (2018) dont le taux de mortalité larvaire de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* à 50 mg/ml était de l'ordre de 51 % après 24 h contre les vers *Strongylida*. Une étude faite par Aouati et Berchi. (2015) indique que l'extrait méthanolique des feuilles de *M. vulgare* a montré un pourcentage de mortalité supérieur au nôtre, qui est de l'ordre de 39% à la dose de 0.9 mg/mL seulement. Une autre étude a été faite sur l'extrait méthanolique des feuilles du marrube blanc, indique que ce dernier a montré une forte activité contre la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* (Allahverdizadeh et Mohammadi, 2016). Divers recherches ont rapporté l'importance de la toxicité des extraits de plantes vis-à-vis les insectes (Talukder et Howse, 1994 ; Pascual-Villalobos et Robledo, 1999 ; Pavela, 2008 ; Alqurashi et Bakhshwain, 2010 ; Ladhari *et al.*, 2013). Cette toxicité est bien marquée lorsque le temps d'exposition est plus long (Aouati et Berchi, 2015).

L'activité insecticide de nos extraits est probablement due à l'action des composés bioactifs qu'ils contiennent. Effectivement, les polyphénols et les flavonoïdes ont démontré des activités insecticides importantes (Balahbib *et al.*, 2019). De plus, il a été rapporté que certains composés phénoliques influencent négativement la croissance de la spongieuse *Lymantria dispar* (Rossiter *et al.*, 1988). Les flavonoïdes ont montré d'excellentes activités insecticides (Mendki *et al.*, 2005), ovicide et de dissuasion de ponte contre *Callosobruchus chinensis*, un ravageur des graines de légumineuse (Upasani *et al.*, 2003). Les polyphénols ont également été rapportés pour avoir des actions insecticides (Hashim et Devi, 2003), ils ont montré de bonnes propriétés insecticides contre l'insecte en sujet *Aphis spiraecola* (Boualem *et al.*, 2017). Les propriétés insecticides du marrube blanc peuvent aussi être liées à la richesse de la plante en saponosides, ces substances sont connues par leur toxicité pour les insectes nuisibles (Roopashree et Naik, 2019). Leur activité insecticide est due à leur interaction avec le cholestérol, provoquant ainsi une perturbation de la synthèse des ecdystéroïdes (Chaieb, 2010).

Les résultats de l'activité insecticides des deux plantes étudiées suggèrent que *Ammi visnaga* et *Marrubium vulgare* peuvent être une alternative, un substitut aux insecticides de synthèse. Il serait intéressant de poursuivre les investigations sur ces plantes afin d'isoler et d'identifier les molécules responsables de cette action insecticide, qui sont sans danger pour l'environnement et la biodiversité.

8. Activité anticancéreuse

L'activité cytotoxique des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a été réalisée sur deux lignées cellulaires normales : macrophages (J774E.1) et fibroblastes (3T3), et deux lignées cellulaires cancéreuses canines : ostéosarcome (D-17) et lymphome à cellules B (CLBL-1). La CE₅₀ a été calculée et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant (Tableau n°22).

Tableau n°22 : Activité cytotoxique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (CE₅₀ = µg/mL)

Lignée cellulaire	3T3	J774E.1	D-17	CLBL-1
CE ₅₀ (µg/mL)	137.31 ± 0.9	117.95 ± 3.7	36.3 ± 9.0*	88.35 ± 4.0*

* : p<0,05.

L'huile étudiée a montré une activité cytotoxique plus élevée pour les lignées cellulaires cancéreuses exprimée par des valeurs de CE₅₀ inférieures par rapport à celles des lignées cellulaires normales. La lignée cellulaire la plus sensible était D-17 avec une valeur CE₅₀ de 36.3 ± 9.0 µg/mL. Par contre, la lignée cellulaire la plus résistante était 3T3 avec une CE₅₀ de 137.31 ± 0.9 µg/mL.

L'activité cytotoxique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* pourrait être principalement attribuée à son profil chimique, donc à ses composés majeurs. Effectivement, plusieurs études ont montré l'efficacité anticancéreuse du limonène, **Rabi et Bishayee (2009)** ont montré que le limonène renforce l'effet antitumoral du docétaxel sur les cellules cancéreuses de la prostate sans être toxique pour les cellules épithéliales normales de la prostate. Dans une autre étude, le limonène a inhibé la croissance des cellules cancéreuses du poumon et supprimé la croissance des tumeurs transplantées chez les souris, car il peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses en favorisant l'autophagie (**Yu et al., 2018**), et ceci a été confirmé aussi par **Araujo-Filho et al. (2021)**. Des recherches antérieures ont indiqué que le carvacrol a également un rôle important dans la cytotoxicité, il a induit des altérations positives sur les lignées cellulaires de glioblastome humain (U87MG) (**Yazici et al., 2021**). Le carvacrol a une capacité anticancéreuse contre les cellules malignes en diminuant les expressions de la métalloprotéase, en induisant l'apoptose, en augmentant l'expression des protéines pro-apoptotiques, en perturbant la membrane mitochondriale, en supprimant la transduction du signal de la kinase et en diminuant également la phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B (**Imran et al., 2022**). Le thymol, pourrait aussi avoir une part de contribution à l'activité, une étude a montré qu'il était responsable de l'induction de l'apoptose dans des cellules cancéreuses gastriques (**Kang et al., 2016**). Il a été montré que le thymol a des effets anticancéreux dans divers systèmes d'essai, y compris les souris, les rats et les cellules cancéreuses en culture, par le biais de diverses voies telles que l'induction de stress oxydatif, l'apoptose, les voies anti-inflammatoires et immuno-modulatoire (**Islam et al., 2019**). Par conséquent, le thymol pourrait servir d'agent provisoire à l'avenir pour traiter le cancer (**Kang et al., 2016**). Ceci explique l'effet cytotoxique de notre huile étant donné que le limonène, le thymol et le carvacrol sont parmi ses composants majoritaires.

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche, cet intérêt vient du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs d'une part, et du besoin de la recherche d'une thérapie avec le moins d'effets secondaires possible d'autre part. L'objectif primordial assigné par ce présent travail est de valoriser la flore végétale algérienne, en particulier les deux espèces *Ammi visnaga* et *Marrubium vulgare* du nord-ouest algérien, qui restent toujours des plantes d'intérêt très important dans la médecine traditionnelle et dans le domaine alimentaire pour les populations locales.

L'étude du criblage phytochimique de ces deux espèces nous a permis de constater leur richesse en différentes famille de métabolites secondaires, il s'agit des flavonoïdes, des tanins, des coumarines, des anthocyanes, des composés réducteurs et des saponosides. Ce qui peut contribuer à l'utilisation de ces deux espèces comme remède en médecine traditionnelle.

L'extraction de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a donné un rendement de 1.78%, l'analyse de cette huile nous a permis d'identifier 26 composés volatiles représentant un total de 95.1% de cette dernière. Elle est principalement riche en limonène qui représente le composant majeur avec un taux de 27.8%, suivi du p-cymène (19.9%), carvacrol (18.7%), thymol (14.2%) et gamma-terpinène avec un taux de 10%. D'autres composants sont présents à des teneurs de 0.1, 0.2 et 0.3%, et les restes sont sous forme de traces (moins de 0.05%).

La macération des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* nous a permis d'obtenir un rendement de 16.60 et 13.99% respectivement en extraits bruts méthanoliques. Les résultats du dosage des extraits ont montré que les feuilles et les fleurs du marrube blanc sont très riches en tanins (79 et 135mg EC/g respectivement), suivi des polyphénols (29.19 et 28.56mg EAC/g respectivement), et en flavonoïdes (19.41 et 22.75 mg EQ/g respectivement).

L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et les extraits des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare* ont été testés pour leur activité antimicrobienne, par la méthode d'aromatogramme, les résultats ont montré que l'huile a exercé un pouvoir antimicrobien très important contre les souches testées. Les diamètres d'inhibition varient entre 17.73 et 36.1 mm, les souches les plus sensibles étaient *S. aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 10876 et *C. albicans* ATCC 10231. La méthode de macrodilution en milieu liquide a permis d'obtenir les concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) à des valeurs allant de 1.56 à 12.5 µl/mL pour la CMI et de 1.56 à 50 µl/mL pour la CMB et la CMF.

Concernant les extraits du marrube blanc, nous avons constaté que ces derniers ont un pouvoir antimicrobien faible à modéré contre les souches microbiennes testées. Pour l'extrait des feuilles, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 08.17 et 24.33 mm, la souche la plus sensible était *B. cereus*. Pour l'extrait des fleurs, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 8.77 et 23.34 mm, la souche la plus sensible était *P. aeruginosa*. Les résultats des concentrations minimales inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) ont montré que nos extraits ont une activité bactériostatique et/ou fongistatique sur la majorité des souches microbiennes testés. La susceptibilité a été importante le plus chez *E. coli* à l'extrait des feuilles, les valeurs de la CMI et CMB étaient de l'ordre de 125 et 250 mg/mL. La souche

la plus sensible vis-à-vis l'extrait des fleurs était *S. aureus* avec des valeurs de 125 et 500 mg/mL de CMI et CMB respectivement.

L'étude du pouvoir antioxydant de nos échantillons a montré que l'huile d'*A. visnaga* a présenté une activité antioxydante modérée par rapport à l'antioxydant standard (Acide ascorbique). Les valeurs de CE_{50} obtenues étaient de l'ordre de 269.74 et 158 mg/mL pour le DPPH et le FRAP respectivement.

Concernant les extraits du marrube blanc, les résultats de l'activité antioxydante nous ont permis de constater que les deux extraits possédaient un fort pouvoir antioxydant. Les valeurs de CE_{50} de l'extrait des feuilles obtenues étaient 625.53 et 225.66 $\mu\text{g/mL}$ par le test DPPH et le test de FRAP respectivement. Concernant l'extrait des fleurs, les CE_{50} obtenues étaient 591.73 et 376.7 $\mu\text{g/mL}$ par le DPPH et le FRAP respectivement. Ceci confirme l'importance du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques de l'espèce *Marrubium vulgare*.

L'étude de la toxicité aiguë de nos échantillons nous a permis de constater que l'huile essentielle d'*A. visnaga* était légèrement toxique, la DL_{50} était égale à 500mg/kg. Par contre, les extraits de *M. vulgare* étaient pratiquement non toxiques. Effectivement, aucune mort ni modifications dans les réponses autonomes ou comportementales n'a été observée chez les rats traités. Le test de l'œdème plantaire induit par la carragénine, a permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire des échantillon testés, nous avons constaté que l'huile essentielle possédait un pouvoir anti-inflammatoire considérable, en effet, au bout de 6 heures, elle a pu inhiber l'inflammation de façon significative ($p < 0.05$). Le pourcentage d'inhibition était de l'ordre de 32.28 et 56.35% à la dose de 50 et 100 mg/kg respectivement. Concernant les extraits de *M. vulgare*, les résultats ont permis de constater que ces derniers ont un très fort pouvoir anti-inflammatoire, qui était proche de celui du diclofénac. Les pourcentages d'inhibition obtenus pour les feuilles et les fleurs sont respectivement 76.18 et 62.96% à la dose de 400 mg/kg. Et 72.56 et 58.98 % à la dose de 200 mg/kg au bout de six heures.

L'étude de l'activité insecticide nous a permis de constater que l'huile essentielle d'*A. visnaga* a un très fort pouvoir sur les insectes, son taux de mortalité était de l'ordre de 85.18% à la dose de 100 $\mu\text{L/mL}$, et 74.07% à la dose de 50 $\mu\text{L/mL}$. En ce qui concerne *M. vulgare*, nous avons remarqué que l'extrait des feuilles était plus actif sur les insectes que celui des fleurs, son taux de mortalité était de l'ordre de 43.33 et 30% pour les doses de 30 et 15 mg/mL respectivement. Tandis que le taux de mortalité de l'extrait des fleurs était de l'ordre de 26.66 et 20% respectivement pour les doses de 30 et 15 mg/mL.

En fin, l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a montré une activité cytotoxique plus élevée pour les lignées cellulaires cancéreuses par rapport à celles des lignées cellulaires normales. La lignée cellulaire la plus sensible était D-17 avec une valeur CE_{50} de $36.3 \pm 9.0 \mu\text{g/mL}$, et la lignée cellulaire la plus résistante était 3T3 avec une CE_{50} de $137.31 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$.

Les résultats obtenus au cours de ce présent travail constituent une première étape dans la recherche des composés bioactifs d'origine végétale, pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Tester d'autres parties des plantes étudiées pour leurs activités biologiques ;
- Fractionner l'huile essentielle et les extraits étudiés, isoler et caractériser les composants responsables des différentes activités biologiques ;
- Etudier les mécanismes d'action et les facteurs influençant l'efficacité des échantillons testés.

Elargir le panel des activités biologiques de nos échantillons et étudier d'autres propriétés biologiques telles que les activités anticancéreuse et antivirale.

Références bibliographiques

- **Abacioglu, Y. H., Bacaksiz, F., Bahar, I. H., & Simmonds, P. (2000).** Molecular evidence of nosocomial transmission of hepatitis C virus in a haemodialysis unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(3), 182-186.
- **Abbott, W. S. (1925).** The value of the dry substitutes for liquid lime. *J Econ Entomol*, 18, 265-7.
- **Abdelli, W. (2017).** Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis) Algeria.
- **Abdelli, W., Bahri, F., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2018).** Chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activity of Algerian *Juniperus phoenicea* essential oils. *Natural Product Communications*, 13(2), 223-228.
- **Abderrazak M. et Joël R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. p 177.
- **Aćimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiproviski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020).** *Marrubium vulgare* L.: A phytochemical and pharmacological overview. *Molecules*, 25(12), 2898.
- **Adams, RP (2007).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, USA.
- **Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Koduru, S., Masika, P. J., & Afolayan, A. J. (2009).** Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 1-8.
- **Adossides A. (2003).** La filière plantes aromatiques & médicinales, FAO Projet. Assistance au recensement agricole, 70p
- **AFNOR (Association Française de Normalisation). (1986),** Recueil des normes françaises "huiles essentielles". AFNOR, Paris, 57p
- **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.

- **Aghraz, A., Wanner, J., Schmidt, E., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Abbas, A., Hassani, L., Markouk, M., Jirovetz, L., & Larhsini, M. (2016).** Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil from a Moroccan Endemic Plant : *Bubonium imbricatum*. *Natural Product Communications*, 11(11), 1717-1720.
- **Aghraz, A., Wanner, J., Schmidt, E., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Ali, A., Nafis, A., Hassani, L., Markouk, M., Jirovetz, L., & Larhsini, M. (2017).** Chemical Composition, *in vitro* Antioxidant, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil from *Cladanthus arabicus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3), 601-609.
- **Agyare C., Obiri D.D., Boakye Y.D., Osafo N. (2013).** Anti-inflammatory and analgesic activities of African medicinal plants. In: Medicinal plant research in Africa (edited by V Kuete), pp 725-752, 1st edition, Elsevier

- **Ahmad, M., Saeed, F., & Noor Jahan, M. (2013).** Evaluation of insecticidal and antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Photochemistry*, 2, 153-158.
- **Ahmed, M., & Azmat, A. (2014).** ACUTE TOXICITY (LETHAL DOSE 50 CALCULATION) AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF METHANOLIC EXTRACT OF BERBERIS VULGARIS IN MICE. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(9), 10.
- **Ahvazi, M., Balali, G. R., Jamzad, Z., & Saeidi, H. (2018).** A taxonomical, morphological and pharmacological review of *Marrubium vulgare* L., an old medicinal plant in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 17(65), 7-24.
- **Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009).** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1.
- **Albouchi, F., Ghazouani, N., Souissi, R., Abderrabba, M., & Boukhris-Bouhachem, S. (2018).** Aphidicidal activities of *Melaleuca styphelioides* Sm. essential oils on three citrus aphids: *Aphis gossypii* Glover; *Aphis spiraeicola* Patch and *Myzus persicae* (Sulzer). *South African Journal of Botany*, 117, 149-154.
- **Albuquerque-Junior, R. L. C., & Thomazzi, S. M. (2012).** Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656-663.
- **Allahverdizadeh, N. M., & Mohammadi, D. (2016).** Bioactivity of *Marrubium vulgare* and *Achillea millefolium* leaf extracts on potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller. *Munis Entomology and Zoology*, 11(1), 114-122.
- **Alqurashi, A. D., & Bakhshwain, A. A. (2010).** INSECTICIDAL AND REPELLENT EFFECT OF SOME INDIGENOUS PLANT extracts Against Saw-Toothed Grain Beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (L.)(Coleoptera: Sivanidae). *Journal of Plant Protection and Pathology*, 1(8), 665-672.
- **Al-Snafi, A. E. (2013).** Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga*. A review. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 3(3), 257-265.
- **Amatiste, S., Sagrafoli, D., Giacinti, G., Rosa, G., Carfora, V., Marri, N., Tammaro, A., Bovi, E., & Rosati, R. (2014).** Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. *Italian Journal of Food Safety*, 3(3).
- **Amin, J. N., Murad, A., Motasem, A. M., Ibrahim, S. R., Ass'ad, J. M., & Ayed, A. M. (2015).** Phytochemical screening and in-vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the entire *Khella* plant (*Ammi visnaga*. L.) a member of palestinian flora. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 7, 137-143.
- **Amoabeng, B. W., Johnson, A. C., & Gurr, G. M. (2019).** Natural enemy enhancement and botanical insecticide source: a review of dual use companion plants. *Applied entomology and zoology*, 54(1), 1-19.
- **Amri, B., Martino, E., Vitulo, F., Corana, F., Kaâb, L. B. B., Rui, M., Rossi, D., Michela Mori, M., Rossi, S & Collina, S. (2017).** *Marrubium vulgare* L. leave extract:

Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules*, 22(11), 1851.

- **Andreev, R., Rasheva, D., & Kutinkova, H. (2009)**. Development of *Aphis spiraeicola* patch (Hemiptera: Aphididae) on apple. *Journal of plant protection research*. 49(4)

- **Antonia Nostro & Teresa Papalia. (2012)**. Antimicrobial Activity of Carvacrol : Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28-35.

- **Aouati, A & BERCHI, S. (2015)**. Larvicidal effect of *Marrubium vulgare* on *Culex pipiens* in eastern Algeria. *Energy Procedia*, 74, 1026-1031.

- **Aourabi, S., Driouch, M., Ammor, K., Sfaira, M., Touhami, M. E., & Mahjoubi, F. (2018)**. Evaluation of anticorrosion and antioxidant activities of ethanolic extract of *Ammi visnaga*. *Anal Bioanal Electrochem*, 10, 912-929.

- **Arif T, Bhosale J D, Kumar N, Mandal T K, Bendre R S, Lavekar S, Dabur R. (2009)**. Natural products antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res* ; 11(7), 626 – 638.

- **Aroun, M. E. F. (2015)**. *Le complexe aphides et ennemis naturels en milieux cultivé et forestier en Algérie* (Doctoral dissertation).

- **Araújo-Filho, H. G. D., Dos Santos, J. F., Carvalho, M. T., Picot, L., Fruitier-Arnaudin, I., Groult, H., ... & Quintans, J. S. (2021)**. Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research*, 35(9), 4957-4970.

- **Atif, M. L., Bezzaoucha, A., Boubechou, N., & Beddek, M. (2009)**. E-01 Évolution sur 8 années de la prévalence des infections nosocomiales au centre hospitalier universitaire de Blida, Algérie. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 39, S31.

- **Atif, M., Boubechou, N., Beddek, M & Bezzaoucha, A. (2016)**. Evolution sur 3 années de la prévalence des traitements antibiotiques dans un centre hospitalier universitaire en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses*, 46(4), 36-37.

- **Bacanli, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2015)**. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and chemical Toxicology*, 81, 160-170.

- **Baghdadi, I., Bengriche, L., Immessaoudene, F., Djebbar, D., Mougari, I., Bensalem, A., ... & Djenouhatk, K. (2020)**. Rôle du CLIN lors d'une infection nosocomiale dans un hôpital d'Alger Est. In *Annales de Biologie Clinique*. 78(1), 74-78.

- **Baheti R, Gill H. (2011)**. Cyber-physical systems, In T. Samad and A.M. Annaswamy (eds.), *The Impact of Control Technology*, 161-166.

- **Bahorun, T., Gressier B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M. (1996)**. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, 46, 10861089.

- **Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M. (2008)**. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

- **Balahbib, A., El Omari, N., Hakkour, M., Sadak, A., & Bouyahya, A. (2019).** INSECTICIDE EFFECTS OF MOROCCAN MEDICINAL PLANTS. *Pharmacology online*, 3, 94-102.
- **Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- **Banerjee, S., Sur, T. K., Mandal, S., Das, P. C., & Sikdar, S. (2000).** ASSESSMENT OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SWERTIA CHIRATA IN ACUTE AND CHRONIC EXPERIMENTAL MODELS IN MALE ALBINO RATS. *Indian journal of pharmacology*, 32, 21-24.
- **Barnig C, (2016).** Médiateurs lipidiques pro-résolvant dans l'inflammation allergique. *Rev Fr Allergol*, 56, 38-42.
- **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- **Baser K.H.C., Buchbauer G. (2010),** Handbook of essential oils: Science, technology, and applications. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton. New York, 994p
- **Belkacem I., Rebai O., & Djibaoui R. (2016).** Antimicrobial and antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) phenolic extracts and their effects on planktonic and biofilm growth of food spoilage *Bacillus cereus*. *International journal of biosciences*, 2(4), 32-45.
- **Bellakhdar, J. (1997).** Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc: la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992) (Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz).
- **Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017).** Citrus lemon essential oil: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in health and disease*, 16(1), 1-11.
- **Bensakhria, A. (2018).** Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.
- **Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- **Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005).** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- **Bernadet M. (2000).** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Dictionnaire thérapeutique de 530 affections courantes. Dangles, Toulouse, France, 384p
- **Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M. (2007).** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.
- **Bezzaoucha, A., Makhoulouf, F., Dekkar, N., & Lamdjadani, N. (1994).** Prévalence des infections nosocomiales au centre hospitalo-universitaire de Bab El Oued-Alger. *Médecine et maladies Infectieuses*, 24(2), 96-101.

- **Bishr, M. M., Desoukey, S. Y., & Magdy, M. (2014).** The effect of soil on Ammi visnaga (L) Lam. plant grown in several localities of Egypt and Sudan. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9(3), 62-68.
- **Bismarck, D., Dusold, A., Heusinger, A., & Müller, E. (2020).** Antifungal in vitro Activity of Essential Oils against Clinical Isolates of *Malassezia pachydermatis* from Canine Ears: A Report from a Practice Laboratory. *Complementary Medicine Research*, 27(3), 143-154.
- **Bock B., (2011).** Base de données nomenclaturale de la flore de France, version 4.02. Tela Botanica, Montpellier (France).
- **Boelens, M. H., Valverde, F., Sequeiros, L., Jimenez, R., & SA, D. B. C. (1990).** Ten years of hydrodiffusion of oils. *Perfumers and Flayorist*, 15(5), 11-14.
- **Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiens, prairiaux et aquatiques, INRA, 79-82.
- **Bonnemain, J. L. (2010).** Aphids as biological models and agricultural pests. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6-7), 461-3.
- **Boualem, M., Mokhtar, M., Saiah, F., Benourad, F., Bouhadiba, R., & Berkani, A. (2017).** Identification of *Mentha piperita* L. and *Ricinus communis* L. polyphenols by HPLC-DAD-ESI-MS and evaluation of their insecticidal properties against *Aphis spiraeicola* P. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(1), 28-34.
- **BOUDJELAL, A. (2013).** *Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie* (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
- **Boulila, A., Sanaa, A., Salem, I. B., Rokbeni, N., M'rabet, Y., Hosni, K., & Fernandez, X. (2015).** Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 76, 616-622.
- **Bounihi A.(2016).** Criblage phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de doctorat, Université de Rabat, Maroc, 199p.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Aouad, L., Elaoufi, M. M., Khaled, M. B., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016).** La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*?. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(3), 201-211.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., & Aouad, L. (2014).** Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 12(1), 6-14.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latrèche, A., & Cherifi, K. (2013).** Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale). *ecologia mediterranea*, 39(2), 39-57.
- **Bové, J. M. (1967).** Maladies à virus des citrus dans les pays du Bassin Méditerranéen. *Fruits*, 22(3), 125-140.

- **Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C., Padurariu C. (2009).** Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 36-39p
- **Brada M., Mohamed B., Michel M., Annabelle C. (2007).** Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de L'Algérie. *Biothnol. Argon. Soc. Environ*, 11(1), 3-7.
- **Brahmi, F. & Kebbouche-Gana, S. (2014).** Antibacterial activity and chemical composition of *Ammi visnaga* L. essential oil collected from Boumerdes (Algeria) during three periods of the plant growth. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(6), 1317-1328.
- **Brahmi, F., Chahbar, N., & Kebbouche-Gana, S. (2016).** Insecticidal effect of *Ammi visnaga* L.(Apiaceae: Apial) methanolic extract against a citrus pest, *Toxoptera aurantii* (Aphididae: Homoptera) under controlled conditions. *Journal of entomology and zoology studies*. 4(2), 230-235.
- **Bruneton J. (1999),** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p
- **Buchman, A. L. (2001).** Side effects of corticosteroid therapy. *Journal of clinical gastroenterology*, 33(4), 289-294.
- **Buckley C.D, Gilroy D.W, Serhan C.N. (2014).** Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*, 40, 315-327.
- **Burbott A. et Loomis P. (1987)** Development, oil storage of dehiscence and peltate trichomes in *Thymus vulgaris*. *Nord J. Bot*, 3, 245-504.
- **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- **Bush, LM. (2020).** Développement d'une infection. *Le manuel MSD pour le grand public*. Disponible sur www.msmanuals.com
- **Capet C, Druesne L, Chassagne PH, Doucet J (2001).** Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *Revue Gériatr.* 26, 379-384.
- **Carette A.S. (2000).** La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, 100p
- **Cavé A. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2ème Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris, 274-285.
- **Chaieb, I. (2010).** Saponins as insecticides: a review. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5(1), 39-50.
- **Chao L.K., Hua K.-F., Hsu H.-Y., Cheng S.-S., Liu J.-Y., Chang S.-T. (2005).** Study of anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Agric. Food. Chem*, 53, 7274-7278p.
- **Chew, S. C. (2020).** Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: Chemistry and functionality. *Food Research International*, 131, 108997.
- **Cole, F. R. (1925).** The natural enemies of the citrus aphid, *Aphis spiraecola* (Patch). *Journal of Economic Entomology*, 18(1), 219-223.
- **Cornejo-Garcia, J. A., Blanca-López, N., Doña, I., Andreu, I., Agúndez, J. A., Carballo, M., ... & Canto, M. G. (2009).** Hypersensitivity reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Current drug metabolism*, 10(9), 971-980.

- **Couderc V, L. (2001).** *Toxicité des huiles essentielles* (Doctoral dissertation, Université Paul-Sabatier).
- **Cousins M.J. and Power I. (1999).** Acute and postoperative pain. In (P.D. Wall & R. Melzack Ed.). *Textbook of Pain*, 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 447-491.
- **Coutinho AE, Chapman KE. (2011).** The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 2-13.
- **Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev*, 12(4), 564-582.
- **Daels-rakotoarison D. (1999).** Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 (64).
- **Dar, R. A., Shahnawaz, M., & Qazi, P. H. (2017).** General overview of medicinal plants: A review. *The journal of phytopharmacology*, 6(6), 349-351.
- **Davies J.E. (1997).** Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp*, 207, 15-27.
- **De Oliveira, P. A., Santin, J. R., Lemos, M., Klein Júnior, L. C., Couto, A. G., Meyre da Silva Bittencourt, C., ... & Faloni de Andrade, S. (2011).** Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(9), 1230-1237.
- **Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. (1971).** Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).
- **Degryse A.C., Delpla I and Voinier M.A. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement-IGS-EHESP, 87p
- **Delamare G. (1999).** Dictionnaire des termes de médecine. 25ème édition, Maloine, Paris.
- **Demoré B., Grare M., Duval R.E. (2012).** Généralités sur les antibiotiques par voie systémique et principes d'utilisation. In : Pharmacie clinique et thérapeutique (coordonné par J Calop., S Limat., C Fernandez et G Aulagner), pp 801-844. 4ème édition, Elsevier Masson, Paris.
- **Denis F. (2002).** Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. John Libbey Eurotext, Paris, 484.
- **Dethier M. (1996).** Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 182p
- **Diallo, I. (2019).** *Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de Lentinula edodes (Shiitake) sous différentes conditions de culture* (Doctoral dissertation, Université Montpellier).
- **Dirar, A. I., Mohamed, M. A., Osman, W. J., Abdalgadir, H., & Khalid, H. S. (2014).** A Phytopharmacological review on four antitumor medicinal plants grown in sudan. *Am. J. PharmTech Res.* 4(5), 2249-3387.
- **Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2012).** Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 24, 29-37.

- **Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2013).** Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie*, 11(6), 348-352.
- **Dung, N. T., Kim, J. M., & Kang, S. C. (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3632-3639.
- **Ebrahimi, M., Safaralizade, M. H., Valizadegan, O., & Amin, B. H. H. (2013).** Efficacy of three plant essential oils, *Azadirachta indica* (Adr. Juss.), *Eucalyptus camaldulensis* (Dehn.) and *Laurus nobilis* (L.) on mortality cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Hem: Aphididae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(9), 1093-1101.
- **Edziri, H., Mastouri, M., Aouni, M., & Verschaeve, L. (2012).** Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*, 80, 104-109.
- **El Karkouri, J., Drioiche, A., Soro, A., Ailli, A., Benhlime, N., Bouzoubaa, A., ... & Zair, T. (2020).** Identification and antioxidant activity of *Ammi visnaga* L. polyphenols from the Middle Atlas in Morocco. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 10(7), 649-658.
- **Ellis V, Murphy G, (2001).** Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett*, 506, 1R5.
- **Engler, R. (1993).** Protéines de la réaction inflammatoire. *Veterinary Research*, 24(4), 337-343.
- **Eslahi, H., Fahimi, N., & Sardarian, A. R. (2017).** Chemical composition of essential oils. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*, 119-171.
- **Eyob, S., Martinsen, B. K., Tsegaye, A., Appelgren, M., & Skrede, G. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) PCM Jansen). *African Journal of Biotechnology*, 7(15), 2585-2592.
- **Ez Zoubi, Y., El-Akhal, F., Farah, A., & El Ouali Lalami, A. (2016).** Phytochemical screening and larvicidal activity of Moroccan *Ammi visnaga* against larvae West Nile vector mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(10), 1684-1688.
- **Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. de B., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2012).** Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-10.
- **Faleiro, M. L. (2011).** The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1143-1156.
- **Fankibe, N., Metowogo, K., Kantati, Y. T., Afanyibo, Y. G., Lawson-Evi, P., Mouzou, A., ... & Aklikokou, K. A. (2020).** Phytochemical screening and antimicrobial activities of hydroethanolic extracts from leaves and roots of *Cochlospermum planchonii* (Bixaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 12(4), 94-101.

- **Fantino N.S. (1990).** Etude du polymorphisme d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, France, 41-45.
- **Faria LRD, Lima CS, Perazzo FF, Carvalho JCT. (2011).** Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7, 1–8.
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 14, 108-115p
- **Ferioli, M., Cisternino, C., Leo, V., Pisani, L., Palange, P., & Nava, S. (2020).** Protecting healthcare workers from SARS-CoV-2 infection: practical indications. *European Respiratory Review*, 29(155).
- **Fillatre Y. (2011).** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multirésidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat. Université d'Angers. France, 288p
- **Franchi, G. G., Ferri, S., Bovalini, L., & Martelli, P. (1987).** *Ammi Visnaga* (L.) Lam. : Occurrence of Khellin and Visnagin in Primary Rib Channels and Endosperm, and Emptiness of Vittae, Revealed by U.V. Microscopy*. *International Journal of Crude Drug Research*, 25(3), 137-144.
- **Franchomme P., Pénoel D. (1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Edition Roger Jallois, Limoges, France, 445p
- **Fulke, J. W. B., Henderson, M. S., & McCrindle, R. (1968).** Some reactions of the diterpene marrubiin and its congeners. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 807-810.
- **Gattefossé, J. (1952).** L'*Ammi visnaga* et la Khelline. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 32(353), 116-123.
- **George, A., Rao, C. N., & Rahangadale, S. (2019).** Current status of insecticide resistance in *Aphis gossypii* and *Aphis spiraeicola* (Hemiptera: Aphididae) under central Indian conditions in citrus. *Cogent Biology*, 5(1), 1660494.
- **Gerlach JH, Kartner N, Bell DR, Ling V. (1986).** Multidrug resistance. *Cancer Surveys*. ;5(1), 25-46.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Oueld-Mokhtar, S. M., Fercha, N., & Bousselfela, H. (2014).** Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2), 64-74.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Bousselfela, H., Hachemi, M., Drid, A., Abd-Essmad, A., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2016).** Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of white horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 41, 252-259.
- **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

- **Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008).** Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 15(16), 1586-1605.
- **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- **Grenier D. (2009).** Les bioaérosols dentaire. Risques infectieux et mesures préventives. *Journal de l'ordre des dentistes du Québec*, 46,1.
- **GUETARNI, N., ZOUAGUI, S., & FOUATIH, Z. (2019).** Prescription des antibiotiques dans un Centre Hospitalier Universitaire de l'ouest Algérie.
- **Günaydin, K & Beyazit, N. (2004).** The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga* (Lam.) lamarck growing in turkey. *Natural Product Research*, 18(2), 169-175.
- **Habibou, H. H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., & Benjamin, O. (2019).** Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. *European Scientific Journal*. 15(12), 1857 – 7881
- **Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9.
- **Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- **Han, Y., Sun, Z., & Chen, W. (2019).** Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 25(1), 33.
- **Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994).** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- **Harmel, N., Francis, F., Haubruge, E., & Giordanengo, P. (2008).** La physiologie des interactions entre la pomme de terre et les pucerons: vers une nouvelle stratégie de lutte basée sur les systèmes de défense de la plante. *Cahiers Agricultures*, 17, 1-6.
- **Hashim, M. S., & Devi, K. S. (2003).** Insecticidal action of the polyphenolic rich fractions from the stem bark of *Streblus asper* on *Dysdercus cingulatus*. *Fitoterapia*, 74(7-8), 670-676.
- **Hayat, J., Akodad, M., Moumen, A., Baghour, M., Skalli, A., Ezrari, S., & Belmalha, S. (2020).** Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon*, 6(11), e05609.
- **Hebeish, A., Fouda, M. M., Hamdy, I. A., El-Sawy, S. M., & Abdel-Mohdy, F. A. (2008).** Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 268-273.
- **Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A. (2007).** Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, 44-50p
- **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. (2004)** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3–6.

- **Henzen, C. (2003).** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Forum Med. Suisse*, 19, 442-446.
- **Hernandez-Ochoa L.R, 2005,** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/Actif ». D'origine végétale. Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France
- **Herrero-Martínez, J. M., Sanmartin, M., Rosés, M., Bosch, E., & Ràfols, C. (2005).** Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26(10), 1886-1895.
- **Hewage, C. M., Bandara, K. A. N. P., Karunaratne, V., Bandara, B. M. R., & Wijesundara, D. S. A. (1997).** Insecticidal activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 25(3).
- **Hoffman L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 245p.
- **Homburger F., Boger E (1968).** The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review. *Cancer Res*, 28, 2372-2374.
- **Huang, H.C., Harper, C.A., Kokko, E.G & Howard, R.J. (1983).** Aphid transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 5(3), 141-147.
- **Ibrahim, A. Y., Hendawy, S. F., Elsayed, A. A., & Omer, E. A. (2016).** Evaluation of hypolipidemic *Marrubium vulgare* effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(5), 453-459.
- **Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., ... & Islam, S. (2022).** Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*.
- **Inweregbu, K., Dave, J., & Pittard, A. (2005).** Nosocomial infections. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 5(1), 14-17.
- **Iqbal, E., Salim, K. A., & Lim, L. B. (2015).** Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
- **Islam, M. T., Khalipha, A. B., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. Z., Uddin, S. J., ... & Rouf, R. (2019).** Anticancer activity of Thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB life*, 71(1), 9-19.
- **Jain P., Pandey R., Shukla S.S. (2014).** Inflammation: Natural resources and its applications. Springer, India, 156p
- **Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M. (1999)** Acute toxicity of 10 Moroccan plants reported to be hypoglycemic agents. *Phytothérapie*, 54, 701-6.
- **Johnson, J. A. (2002).** Nosocomial infections. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 32(5), 1101-1126.
- **Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2016).** Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 419-444.

- **Jouault, S. (2012).** *La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- **Kada, S. (2018).** Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques (Doctoral dissertation).
- **Kahlouche-Riachi, F. (2014).** évaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. (Doctoral dissertation).
- **Kalembe D., Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, 10, 813-829.
- **Kang, S. H., Kim, Y. S., Kim, E. K., Hwang, J. W., Jeong, J. H., Dong, X., ... & Park, P. J. (2016).** Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(1), 28-37.
- **Kanyonga, P. M., Faouzi, M. A., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E. M., & Cherrah, Y. (2011).** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *J Chem Pharm Res*, 3(1), 199-204.
- **Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- **Karlsen Anette, Retterstøl Lars, Laake Petter, Paur Ingvild, Kjølrsrud-Bøhn Siv, Sandvik Leiv, and Blomhoff Rune. (2007).** Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor-κB Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults. *J.Nutr*, 137, 1951-4.
- **KARR, L. L., & COATS, J. R. (1988).** Insecticidal properties of d-limonene. *Journal of Pesticide Science*, 13(2), 287-290.
- **Keddad, A., Baaliouamer, A & Hazzit, M. (2016).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Umbels of Algerian *Ammi visnaga* (L.), *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(5), 1243-1250.
- **Kernouf, N. (2019).** Effet des extraits de *Capparis spinosa* sur la production des médiateurs inflammatoires des neutrophiles et des monocytes (Doctoral dissertation).
- **Kessel L, Tendal B, Jorgensen K.J, Erngaard D, Flesner P, Andresen J.L, Hjortdal J. (2014).** Post cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and non steroidal anti-inflammatory eye drops. *Ophthalmol*, 121, 1915-1924.
- **Khadhri, A., Mokni, R. E., Mguis, K., Ouerfelli, I., & Araújo, M. E. M. (2011).** Variability of two essential oils of *Ammi visnaga* (L.) Lam. A traditional Tunisian medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5079-5082.
- **Khalfallah, A., Labeled, A., Semra, Z., Kaki, B. A., Kabouche, A., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 1(3), 302-305.
- **Khalil, N., Bishr, M., Desouky, S., & Salama, O. (2020).** *Ammi Visnaga* L., a Potential Medicinal Plant : A Review. *Molecules*, 25(2), 301.
- **Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015).** Nosocomial infections and their control strategies. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 509-514.

- **Kholkhal, F. (2014).** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* (doctoral dissertation, université abou bekr belkaid, Tlemcen) Algeria.
- **Kidd B.L. & Urban L.A. (2001).** Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87, (1), 3-11.
- **Kim, H. K., Namgoong, S. Y., & Kim, H. P. (1993).** Anti-inflammatory activity of flavonoids: Mouse ear edema inhibition. *Archives of Pharmacal Research*, 16(1), 18-24.
- **Kindlmann P., Jarošík V. & Dixon A. F. G., (2007).** Population dynamics. In: van Emden H. F.& Harrington R. (eds.), *Aphids as Crop Pests*, Ed. CAB International (UK), 311 - 329.
- **Knio, K.M., Usta, J., Dagher, S., Zournajian, H., Kreydiyyeh, S. (2008).** Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresour. Technol*, 99, 763–768.
- **Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of essential oil research*, 1(3), 119-128.
- **Koehlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- **Koné WM, Kamanzi Atindehou K, Kacou-n'douba A, Dosso M. (2007).** Evaluation of 17 medicinal plants from Northern Côte d'Ivoire for their in vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4, 17-22.
- **Koriem, K. M. M., Arbid, M. S., & El-Attar, M. A. (2019).** Acute and subacute toxicity of Ammi visnaga on rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(1), 26-35.
- **Koul, O. (2004).** *Insect antifeedants*. CRC Press.
- **Kozyra, M., Korga, A., Ostrowska, M., Humeniuk, E., Adamczuk, G., Gieroba, R., ... & Dudka, J. (2020).** Cytotoxic activity of methanolic fractions of different *Marrubium* spp. against melanoma cells is independent of antioxidant activity and total phenolic content. *FEBS Open bio*, 10(1), 86-95.
- **Krief, S. (2003).** *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées* (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- **Kwon, M. S., Lee, J. K., Park, S. H., Sim, Y. B., Jung, J. S., Won, M. H., ... & Suh, H. W. (2010).** Neuroprotective effect of visnagin on kainic acid-induced neuronal cell death in the mice hippocampus. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 14(5), 257-263.
- **Ladhari, A., Omezzine, F., Chaieb, I., & Haouala, R. (2013).** Antifeeding and insecticidal effects of *Capparis spinosa* L. on *Spodoptera littoralis* (Boisduval) larvae. *African Journal of Agricultural Research*, 8(42), 5232-5238.

- **Lagunez Rivera L. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE, 31-42.
- **Landucci, E. C. T., Antunes, E., Donato, J. L., Faro, R., Hyslop, S., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., & Nucci, G. (1995).** Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *British Journal of Pharmacology*, 114(3), 578-583.
- **Lebham. 2005.** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- **Lebri, M., Bahi, C., Fofie, N. B. Y., Gnahoue, G., Lagou, S. M., Achibat, H., ... & Khouili, M. (2015).** Analyse phytochimique et évaluation de la toxicité aiguë par voie orale chez des rats de l'extrait total aqueux des feuilles de *Abrus precatorius* Linn (Fabaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1470-1476.
- **Leffingwell J.C.** (Consulté le 24 Janvier 2011), Rose (*Rosa damascena*). Disponible sur <http://www.leffingwell.com/rose.htm>
- **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- **Liu, W. N., Shi, J., Fu, Y., & Zhao, X. H. (2019).** The stability and activity changes of apigenin and luteolin in human cervical cancer Hela cells in response to heat treatment and Fe²⁺/Cu²⁺ addition. *Foods*, 8(8), 346.
- **Lodhi, S., Vadnere, G. P., Sharma, V. K., & Usman, M. R. (2017).** *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *J. Intercult. Ethnopharmacol*, 6(4), 429-452.
- **Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Sciences, Université de la Réunion, France, 146p
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004).** Solvent-free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr A*, 1043(2), 323-327.
- **Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris, 211.
- **Mainardi J.L., Goldstein F.W., Gutmann L (1996).** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Encyl Méd Chir. Maladies infectieuses (Elsevier, Paris), 8-006-N-10, 8p
- **Malecky, M. (2008).** *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins* (Doctoral dissertation, Paris, AgroParisTech).
- **Males, Z., Medic-Saric, M. (2001).** Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. Kit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 353–359.

- **Marchese, A., Arciola, C., Barbieri, R., Silva, A., Nabavi, S., Tsetegho Sokeng, A., Izadi, M., Jafari, N., Suntar, I., Daglia, M., & Nabavi, S. (2017).** Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents : A Particular Focus on p-Cymene. *Materials*, 10(8), 947.
- **Marmonier A.A (1990).** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, techniques usuelles. DOIN édition, Paris, France, 227-236.
- **Masoodi, M. H., Ahmed, B., Zargar, I. M., Khan, S. A., Khan, S., & Singh, P. (2008).** Antibacterial activity of whole plant extract of Marrubium vulgare. *African journal of Biotechnology*, 7(2).
- **Meepagala, K. M., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2016).** Mosquitocidal activity of extracts from Ammi visnaga (Apiaceae) seeds. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 5(04), 170.
- **Mendki, P. S., Salunke, B. K., Kotkar, H., Maheshwari, V., Mahulikar, P., & Kothari, R. (2005).** Antimicrobial and insecticidal activities of flavonoid glycosides from Calotropis procera L. for post-harvest preservation of pulses. *Biopestic. Int*, 1(3), 4.
- **Meyre-Silva, C., & Cechinel-Filho, V. (2010).** A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus marrubium. *Current pharmaceutical design*, 16(31), 3503-3518.
- **Mlinarić-Galinović, G., & Varda-Brkić, D. (2000).** Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 37(4), 237-246.
- **MOHAMMEDI-BOUBEKKA, N. (2015).** *Les pucerons des Agrumes et leurs ennemis naturels en Mitidja orientale (Algérie)* (Doctoral dissertation, ENSA).
- **Moussouni, L., Benhanifia, M., & Ayad, A. (2018).** In-vitro anthelmintic effects of aqueous and ethanolic extracts of Marrubium vulgare leaves against bovine digestive strongyles. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 42(4), 262.
- **Muylaert, A., & Mainil, J. (2013).** Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur " contagiosité". In *Annales de Medecine vétérinaire*. 156, 109-123.
- **Muzamal I, Robert V, Korthout H, Mustafa N.R. (2013).** Phytochemicals as apotential source for TNF- α inhibitors. *Phytochem Rev*, 12, 65-93.
- **N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1), 1-15.
- **Nait Said, N. (2007).** *Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes* (Doctoral dissertation, Batna, Université El Hadj Lakhdar. Faculté des Sciences).
- **Nantz, Meri P, Rowe .Cheryl A., Carmelo Nieves Jr., and Percival Susan S. (2006).** Immunity and Antioxidant Capacity in Humans Is Enhanced by Consumption of a Dried, Encapsulated Fruit and Vegetable Juice Concentrate. *J Nutr*, 136, 2606-10.
- **Nawwar, M. A., El-Mousallamy, A. M., Barakat, H. H., Buddrus, J., & Linscheid, M. (1989).** Flavonoid lactates from leaves of Marrubium vulgare. *Phytochemistry*, 28(11), 3201-3206.
- **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA

- **Nikaido, H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78, 119-146.
- **Nostro, A & Papalia, T. (2012).** Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 7(1), 28-35.
- **OECD. (2002).** Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- **Okwu D.E, Okwu M.E. 2004.** Chemical composition of *Spondias mombin* Linn. Plant Parts. *J Sustain Agric Environ*, 6(2), 140-147.
- **Olajide, O. A., Makinde, J. M., & Awe, S. O. (1999).** Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 113-117.
- **OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (2009).** Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. ISBN 978 92 4 250609 9, Genève, Suisse, 72p
- **OUAFI, N., MOGHRANI, H., & MAACHI, R. (2015).** Influence du procédé de séchage des plantes aromatiques et médicinales sur le rendement en huile essentielle (cas de trois menthes). In *International Symposium on Materials chemistry* (1-8p).
- **Oussala M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-Meat Science, 73, 236-244.

- **Oussou, K. R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Dosso, M., N’Guessan, Y. T., Figueredo, G., Chalchat, J.-C., & Koukoua, G. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d’Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1081-1086.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- **Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., & Huang, F. (2008).** Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, 106(3), 1264-1270.
- **Pandey KB et Rizvi SI. 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (5), 270 – 278.
- **Panis, C., Matsuo, T., & Reiche, E. M. V. (2009).** Nosocomial infections in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected and AIDS patients: major microorganisms and immunological profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 155-162.
- **Paris R, Moysse H. (1969).** Précis de matière médicale. Paris: Masson.
- **PARLE, O. (1991).** Huiles essentielles. *Plantes et santé*. France
- **Parodi, A. J. (1993).** N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, 3(3), 193-199.
- **Pascual-Villalobos, M. J., & Robledo, A. (1999).** Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochemical systematics and ecology*, 27(1), 1-10.
- **Pavela, R. (2008).** Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 102(3), 555-559.

- **Pavela, R. (2015).** Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. *Industrial Crops and Products*, 67, 108-113.
- **Pavela, R., Vrchotová, N., & Tříška, J. (2016).** Larvicidal activity of extracts from *Ammi visnaga* Linn.(Apiaceae) seeds against *Culex quinquefasciatus* Say.(Diptera: Culicidae). *Experimental parasitology*, 165, 51-57.
- **Pengsook, A., Tharamak, S., Keosaeng, K., Koul, O., Bullangpoti, V., Kumrungsee, N., & Pluempanupat, W. (2022).** Insecticidal and growth inhibitory effects of some thymol derivatives on the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and their impact on detoxification enzymes. *Pest Management Science*, 78(2), 684-691.
- **Pérez-Jiménez J., Arranz S., Tabernero M., Diaz-Rubio M.E., Serrano J., Goñi I., SauraCalixto F. (2008).** Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285p
- **Peronny S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie, 151p.
- **Petrovska, B. B. (2012).** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.
- **Pfeiffer, D. G., Brown, M. W., & Varn, M. W. (1989).** Incidence of spirea aphid (Homoptera: Aphididae) in apple orchards in Virginia, West Virginia, and Maryland. *Journal of Entomological Science*, 24(1), 145-149.
- **Piccoli, P. N., & Bottini, R. (2008).** Accumulation of the labdane diterpene Marrubiin in glandular trichome cells along the ontogeny of *Marrubium vulgare* plants. *Plant Growth Regulation*, 56(1), 71-76.
- **Pierce, G. E. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and device-related nosocomial infections: implications, trends, and potential approaches for control. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 309-318.
- **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233-239.
- **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(4), 6-11.
- **Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire. Université du Québec à Chicoutimi. Canada, 200p
- **Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S. (2007).** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr A*, 1163(1-2), 2-24p.
- **Pozzatti, P., Loreto, E. S., Mario, D. N., Rossato, L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2010).** Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation. *Journal de mycologie médicale*, 20(3), 185-189.

- **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- **Qadir, M., Maurya, A. K., Waza, A. A., Agnihotri, V. K., & Shah, W. A. (2020).** Chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity of *Artemisia gmelinii* essential oil growing wild in Kashmir valley. *Natural Product Research*, 34(22), 3289-3294.
- **Rabi, B., Beshayee, A. (2009).** d-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *Journal of Carcinogenesis*, 8(9), 1-9.
- **Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002).** Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5459-5463.
- **Rasooli, I., Taghizadeh, M., Astaneh, S. D. A., Rezaei, M. B., & Jaimand, K. (2007).** Phytobiological properties of *Ammi visnaga* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. essential oils. *Int. J. Essent. Oil Ther*, 1, 72-78.
- **Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. (2009).** Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, 8(3), 229-235.
- **Revillard H. (2001).** «Immunologie»; De Boeck Université 4ème Edition; p : 600.
- **Rhallab, A., Chakira, S., Elbadaouia, K., & Imolek Alaouia, T. (2014).** Evaluation of acute and subacute toxicity of aqueous extracts from *Marrubium vulgare* L in rodents. *Journal of Pharmacy Research*, 8(5), 684-688.
- **Riella K.R., Marinho R.R., Santos J.S., Pereira-Filho R.N., Cardoso J.C., AlbuquerqueJunior R.L., Thomazzi S.M. (2012).** Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656-663p
- **Rizk A.M. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, 52 (2), 35-42.
- **Roberts C.K., Sindhu K.K. (2009).** Oxidative stress and letabolic syndrome. *Life Sciences*, 84(21-22), 705-712p.
- **Rolland, Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(6), 419-424.
- **Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019).** Saponins: properties, applications and as insecticides: a review. *Biosci. Trends*, 8, 1-14.
- **Rossiter, M., Schultz, J. C., & Baldwin, I. T. (1988).** Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction. *Ecology*, 69(1), 267-277.
- **Roux D. (2008).** Conseil en aromathérapie, 2ème édition, Pro-Officina, 187p.
- **Rúa, J., del Valle, P., de Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., & García-Armesto, M. R. (2019).** Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(9), 622-629.

- **Rutgen B.C., Hammer S.E., Gerner W., Christian M., de Arespacochaga A.G. (2010).** *Leukemia Res.* 34, 932.
 - **Saharaoui, L., & Hemptinne, J. L. (2009).** Dynamique des communautés des coccinelles (Coleoptera: Coccinellidae) sur agrumes et interactions avec leurs proies dans la région de Rouïba (Mitidja orientale) Algérie. In *Annales de la société entomologique de France*. Taylor & Francis Group, 45(2), 245-259.
 - **Salas-Salvadó, J., Fernández-Ballart, J., Ros, E., Martínez-Gonzalez, M. A., Fitó, M., Estruch, R., ... & PREDIMED Study Investigators. (2008).** Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Archives of internal medicine*, 168(22), 2449-2458.
 - **Saleh, M.; Clark, S; Woodard, B; Deolu-Sobogun, S-A. (2010).** ANTIOXIDANT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS. *Ethnicity & Disease*, 20, 78-82.
 - **Sany J, 2003,** Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : Conception actuelle. John Libbey Eurotext, 298p.
 - **Satrani, B., Farah, A., Fechtal, M., Talbi, M., & Bouamrani, M. L. (2004).** Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (L.) Lam. Du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 151(1), 65-71.
 - **Schorderet, S., Pearson, R. D., Vuocolo, T., Eisemann, C., Riding, G. A., & Tellam, R. L. (1998).** cDNA and deduced amino acid sequences of a peritrophic membrane glycoprotein, Peritrophin-48', from the larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 28(2), 99-111.
 - **Sefidkon, F., Jalili, A., & Mirhaji, T. (2002).** Essential oil composition of three *Artemisia* spp. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 150-152.
 - **Sekkat, A. (2015).** Aphids of Morocco: Abridged Bio-Ecology of Species Evolving on Crops. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*. N° 7: 1-23.
 - **Sellami, H. K., Flamini, G., Cioni, P. L., & Smiti, S. (2011).** Composition of the Essential Oils in Various Organs at Different Developmental Stages of *Ammi visnaga* (L.) Lam. From Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*, 8(11), 1990-2004.
 - **Sellami, H. K., Napolitano, A., Masullo, M., Smiti, S., Piacente, S., & Pizza, C. (2013).** Influence of growing conditions on metabolite profile of *Ammi visnaga* umbels with special reference to bioactive furanochromones and pyranocoumarins. *Phytochemistry*, 95, 197-206.
 - **Senatore F. (1996).** Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 1327-1332p.
 - **Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (2010).** Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press, New York, 473p.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.

- **Sharif S, Singh M, Kim SJ, Schaefer J. (2009).** *Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 spin diffusion. *J Am Chem Soc*, 131, 7023–30.
- **Shunying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y., & Guolin, Z. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 151-158.
- **Sikora, A., & Zahra, F. (2021).** Nosocomial infections. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- **Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. J. J. O. V. A. (2010).** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 16(3), 402-413.
- **Sim, J. X. F., Khazandi, M., Chan, W. Y., Trott, D. J., & Deo, P. (2019).** Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 30(6), 524.
- **Simonnet X., Gaudin M., Jacquemettaz P., Plantini U., Rey C. 2006.** Stade phénologique et qualité des hampes florales du genépi blanc. *Revue Suisse Vitic. Arboric*, 38 (3), 189-193.
- **Small, E ; Catling, PM. (2000).** Les cultures médicinales canadiennes. Canada : Ottawa (Ontario), NRC Research. Press.
- **Soro, K. N., Sabri, L., Amalich, S., Khabbal, Y., & Zair, T. (2015).** Composition chimique d'*Ammi visnaga* L.(Lam.) marocaine et activité antibactérienne de son huile essentielle vis-à-vis de bactéries productrices et non productrices de beta-lactamases à spectre élargi. *Phytothérapie*, 13(3), 168-175.
- **Stobo J., Traill T., Hellmann D., Ladenson P., Petty B (1996).** The principles and practice of medicine. *McGraw Hill Professional*, 1064p
- **Sullivan D. J. (2008).** Aphids (Hemiptera: Aphididae). In: Capinera J. L. (ed.), *Encyclopedia of Entomology*, Ed. Springer (Dordrecht), 191 – 215.
- **Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- **Svoboda K.P et Hampson J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement. SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- **Talbi, H., Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(4), 1111-1117.
- **Talukder, F. A., & Howse, P. E. (1994).** Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree, *Aphanamixis polystachya* Wall & Parker, against *Sitophilus oryzae* (L.). *International Journal of Pest Management*, 40(3), 274-279.

- **Tang, X., Chen, S., & Wang, L. (2011).** Purification and identification of carvacrol from the root of *Stellera chamaejasme* and research on its insecticidal activity. *Natural product research*, 25(3), 320-325.
- **Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., & Wang, W. (2019).** Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological research*, 139, 126-140.
- **TEHAMI, W. (2017).** *Caractérisation phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de Salvia argentea* (Doctoral dissertation).
- **Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., & Kostov, G. (2019).** Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 74(5-6), 105-111.
- **Trease E., Evans W.C. (1987).** Pharmacognosie. Billiare Tindall. London 13th Edition. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pommé). *Journal of Medicine and Scientific*, 4 (3), 179-182.
- **Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(6), 2474-2478.
- **Tsai, M.-L., Lin, C.-C., Lin, W.-C., & Yang, C.-H. (2011).** Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1977-1983.
- **Tsergouli, K., Karampatakis, T., Haidich, A. B., Metallidis, S., & Papa, A. (2020).** Nosocomial infections caused by Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Journal of Hospital Infection*, 105(1), 43-52.
- **Turpeau E., Hullé M. & Chaubet B., (2015).** La morphologie des pucerons et les critères d'identification. Disponible sur le site <https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons/Qu-est-cequ-un-puceron/Morphologie>. Consulté le 23 /07/ 2018.
- **Upasani, S. M., Kotkar, H. M., Mendki, P. S., & Maheshwari, V. L. (2003).** Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L foliage flavonoids. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 59(12), 1349-1354.
- **Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du pharmacologue (Boulogne)*, 18(1), 16-23.
- **Van den Dool H., Kratz D.P (1963).** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471.
- **Vasudevan, M., Gunnam, K. K., & Parle, M. (2006).** Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties of *Daucus carota* Seeds Extract. *Journal of Health Science*, 52(5), 598-606.
- **Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., & Vamvakias, M. (2002).** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves

and peel of a Cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 147-153.

- **Veras, H. N. H., Araruna, M. K. A., Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Kerntopf, M. R., Botelho, M. A., & Menezes, I. R. A. (2013).** Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham : Possible Mechanism of Action: LIPPIA SIDOIDES. *Phytotherapy Research*, 27(2), 179-185.
- **Verdan, M. H., & Stefanello, M. É. A. (2012).** Secondary metabolites and biological properties of Gesneriaceae species. *Chemistry & biodiversity*, 9(12), 2701-2731.
- **Vermerris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-40205163-8 (HB).
- **Verpoorte R. (2002).** La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^o congrès européen d'ethnopharmacologie. IRD Ed : Paris, 274p.
- **Wallace J.L., Vong L. (2008).** NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*, 9(11), 1151-1156.
- **Wallace, M. S., & Staats, P. S. (2004).** *Pain medicine and management: just the facts.* McGraw Hill. New York, 48.
- **Wang, J. J., & Tsai, J. H. (2000).** Effect of temperature on the biology of *Aphis spiraecola* (Homoptera: Aphididae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(4), 874-883.
- **WHO (World Health Organization), (2002),** Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. 2nd edition, Duceel G., Fabry J., Nicolle L editors, Geneva-LyonWinnipeg, 72p
- **WHO (World Health Organization), (2007).** *WHO monographs on selected medicinal plants* (Vol. 3). World Health Organization.
- **Williams I. S. & Dixon A. F. G., (2007).** Life cycles and polymorphism. In: van Emden H. F. & Harrington R. (eds.), *Aphids as Crop Pests*, Ed. CAB International (UK), 69 - 85.
- **Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962).** Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 111(3), 544-547.
- **Wong S.P., Leong L.P., Koh J.H.W. (2006).** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*; 99, 775-783.
- **Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018).** The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618.
- **Yala, D., Merad, A. S., Mohamedi, D., Ouar Korich, M. N. (2001).** Résistance microbienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
- **Yazici, A., Marinelli, L., Cacciatore, I., Emsen, B., Eusepi, P., Di Biase, G., ... & Türkez, H. (2021).** Potential anticancer effect of carvacrol codrugs on human glioblastoma cells. *Current Drug Delivery*, 18(3), 350-356.

- **Ying S, Feng M, Xu S, Ma Z. (2003).** Field efficacy of emulsifiable suspensions of *Beauveria bassiana* conidia for control of *Myzus persicae* population on cabbage. *Ying Yong Sheng tai xue bao. The Journal of Applied Ecology.* (4):545-548.
- **Yoon J.H, Baek S G. (2005).** Molecular targets of diary polyphenols with anti-inflammatory properties, *Yonsie Med J.* 46(5), 585-596.
- **Yousefi, K., Fathiazad, F., Soraya, H., Rameshrad, M., Maleki-Dizaji, N., & Garjani, A. (2014).** *Marrubium vulgare* L. methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *BioImpacts: BI*, 4(1), 21.
- **Youssefi, M. R., Tabari, M. A., Esfandiari, A., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A., Sut, S., ... & Maggi, F. (2019).** Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west Nile vector *Culex pipiens*. *Molecules*, 24(10), 1867.
- **Yu, X., Lin, H., Wang, Y., Lv, W., Zhang, S., Qian, Y., ... & Qian, B. (2018).** D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *OncoTargets and therapy*, 11, 1833.
- **Zaher, A., Boufellous, M., Ouhssine, M., & Bourkhiss, B. (2019).** Phytochemical screening of an Umbelliferae: *Ammi visnaga* L.(Lam.) in the region of sidi slimane-north-west of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*, 10, 995-1002.
- **Zahi, M. R., El Hattab, M., Liang, H., & Yuan, Q. (2017).** Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of ϵ -polylysine. *Food Chemistry*, 221, 18-23.
- **Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016).** Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.
- **Zhigzhitzhapova, S. V., Dylenova, E. P., Gulyaev, S. M., Randalova, T. E., Taraskin, V. V., Tykheev, Z. A., & Radnaeva, L. D. (2020).** Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. *Natural Product Research*, 34(18), 2668-2671.
- **Zhong, W., Chi, G., Jiang, L., Soromou, L. W., Chen, N., Huo, M., ... & Feng, H. (2013).** p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Inflammation*, 36(3), 529-537.
- **Ziegler J, Facchini PJ. (2008).** Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 735 – 769.
- **Zrira, S., Elamrani, A., Pellerin, P., Bessière, J. M., Menut, C., & Benjilali, B. (2008).** Isolation of Moroccan *Ammi visnaga* oil: Comparison between Hydrodistillation, Steam Distillation and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1), 30-35.

Annexes

Annexe n°1**Milieus de culture utilisés :****1. Bouillon nutritif (BN) (g/l)**

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7,3 ± 0,2	

2. Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar.....	18 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7,3 ± 0,2	

3. Gélose Mueller Hinton (M-H) (g/l)

Extrait de viande.....	3 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1.5 g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7, 3	

4. Potato Dextrose Agar (PDA) (g/l)

Filtrat de pomme de terre.....200 g

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 5,6

Sabouraud additionné de chloramphénicol gélosé (g/l)

Peptone.....10 g

Glucose20 g

Agar15 g

Chloramphénicol.....0.5 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 6

Annexe n°2**Tableau : Liste des antibiotiques utilisés**

Antibiotique	Sigle	Charge du disque
Amoxicilline	AML	30 µg
Tobramycine	TOB	10 µg
Norfloxacine	NOR	10 µg
Sulfaméthoxazole	SMX	25 µg
Chloramphénicol	C	30 µg
Acide Nalidixique	NA	30 µg
Erythromycine	E	15 µg
Néomycine	N	30 µg
Céfalexine	CN	30 µg
Doxycycline	DXT	30 µg
Pipéracilline	PRL	30 µg
Pristinamycine	PRI	15 µg

Annexe n°3

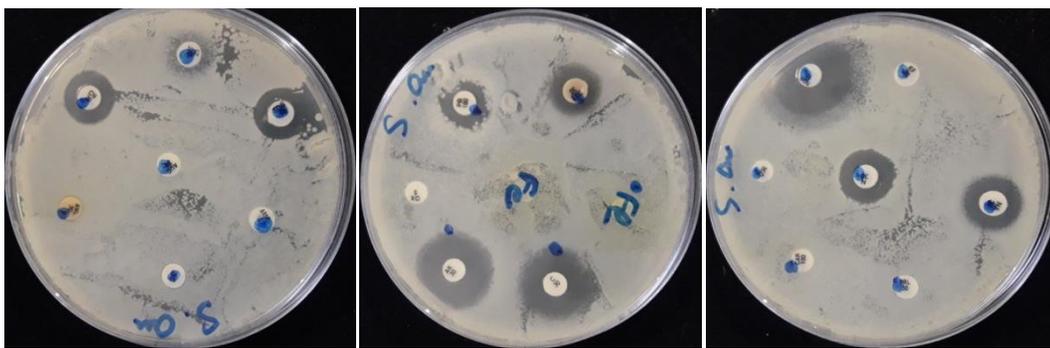


Figure n°1 : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Annexe n°4

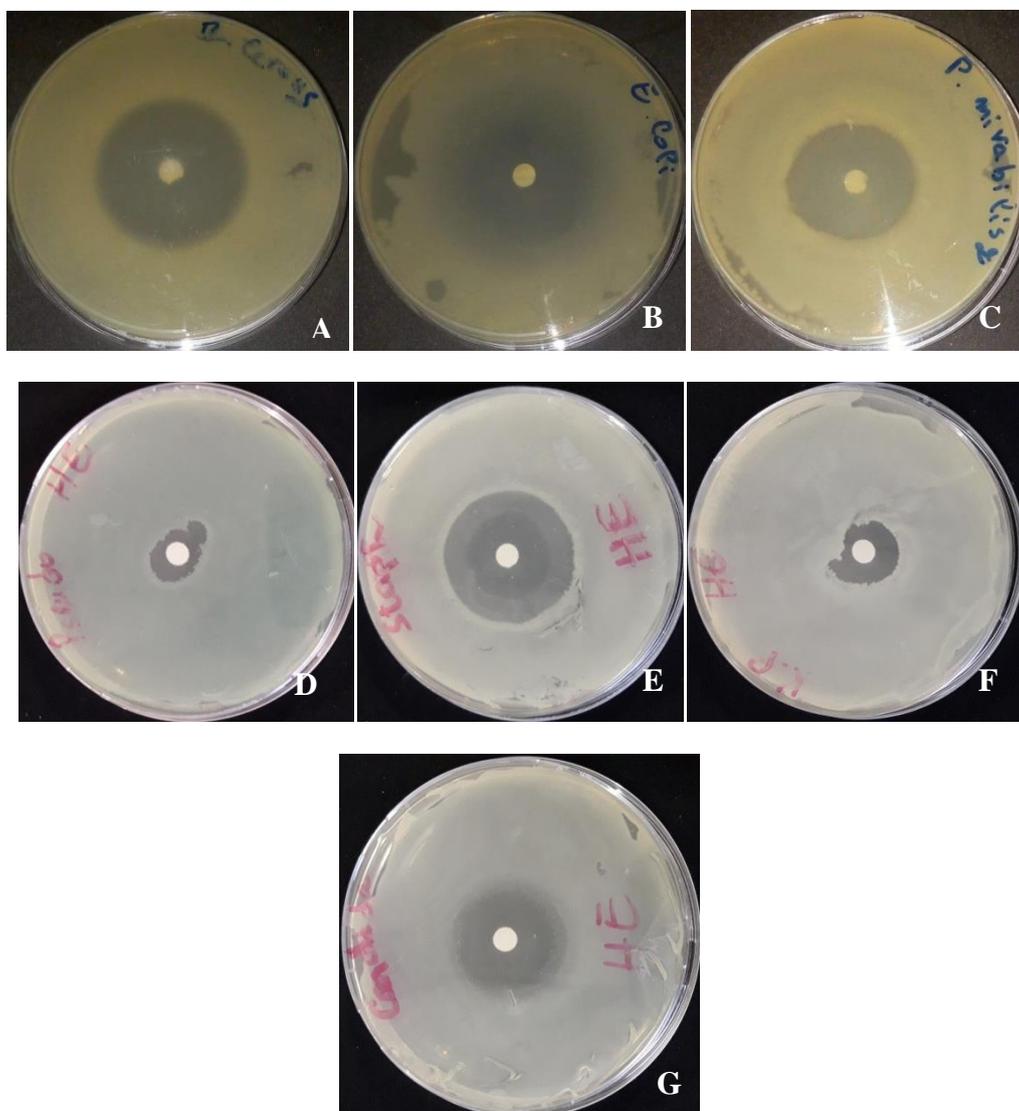


Figure n°2 : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*

A : *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; **B** : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; **C** : *Proteus mirabilis* ATCC 35659 ; **D** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; **E** : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ; **F** : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; **G** : *Candida albicans* ATCC 10231.

Annexe n°5

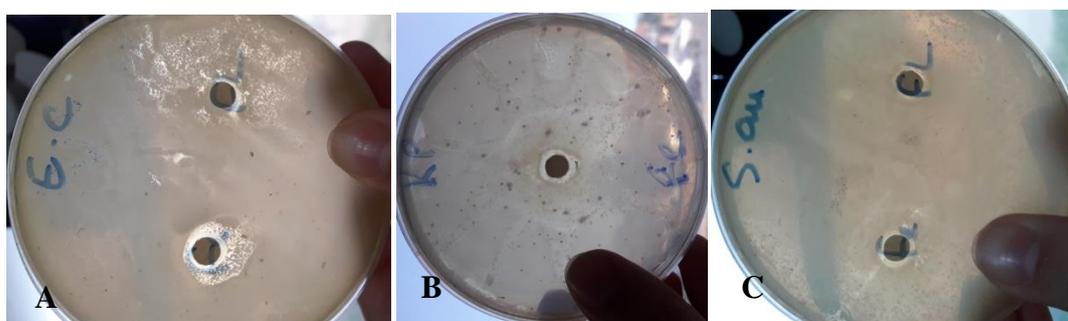


Figure n°3 : Résultats de l'aromatogramme des extraits de *Marrubium vulgare*.

A : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; **B** : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; **C** : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Annexe n°6



Figure n°4 : Effet de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez le rat.

A : Groupe I (Contrôle) ; **B** : Groupe II (Standard : Diclofénac à 10 mg/Kg de p.c) ; **C** : Groupe III (50 mg/Kg d'huile essentielle) ; **D** : Groupe IV (100 mg/Kg d'huile essentielle).

Annexe n°7

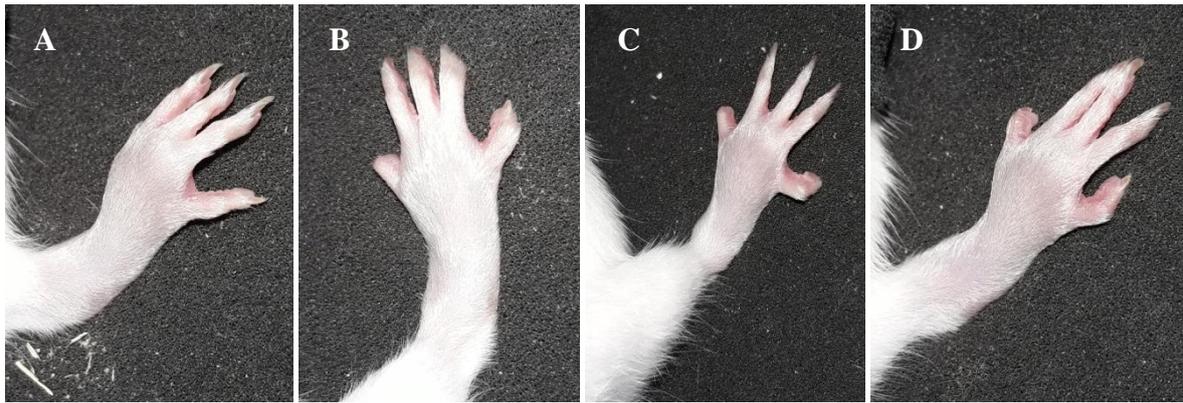


Figure n°5 : Effet des extraits de *Marrubium vulgare* L. sur l'œdème plantaire 6 heures après injection de la carragénine chez le rat.

A : Feuilles (200mg/mL) ; B : Feuilles (400mg/mL) ; C : Fleurs (200mg/mL) ; D : Fleurs (400mg/mL).

Publication



Plant Archives

Journal homepage: <http://www.plantarchives.org>
DOI Url : <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2022.v22.no1.039>

CHEMICAL COMPOSITION, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALGERIAN *AMMI VISNAGA* ESSENTIAL OIL

Amira Amraoui^{1*}, Fouad Bahri¹ and Juergen Wanner²

¹Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria

²KurtKitzing Co., HintermAltenSchloss, Wallerstein, Germany

Email*: amiraamraoui@yahoo.com

(Date of Receiving : 23-11-2021; Date of Acceptance : 25-02-2022)

ABSTRACT

The essential oil obtained by hydrodistillation from the aerial part of *Ammi visnaga* L., harvested in the northwest of Algeria was analyzed and its antimicrobial and anti-inflammatory activities were studied. 26 compounds were identified by GC-FID and GC-MS representing 95.1% of the total oil. The major components found were limonene (27.8%), p-cymene (19.9%), carvacrol (18.7%), thymol (14.2%) and gamma-terpinene (10%). The EO was slightly toxic with an LD₅₀ of 500 mg/kg. The antimicrobial activity showed that all strains tasted were sensitive to the EO, with diameter halos ranging from 17.73 to 36.1 mm in the disc diffusion method, the results of MIC and MBC-MFC showed that the activity was microbicidal against all the tasted strains. Concerning the anti-inflammatory activity, *Ammi visnaga* EO reduced the carrageenan induced paw edema in rats by 56.35% after 6 hours.

Keywords : *Ammi visnaga*, Essential oil, Chemical composition, acute toxicity, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory activity.

Introduction

Currently, antibiotics impact and chronic inflammatory diseases are considerable and become one of the main health problems of the world's population (Balouiri *et al.*, 2016; Olajide *et al.*, 1999). There is a need to develop new antimicrobial and anti-inflammatory agents with minimum side effects. Essential oils (EOs), aromatic oily liquids extracted from plants, are known especially for their antibacterial properties (Amatiste *et al.*, 2014) and for their significant anti-inflammatory activities (Riella *et al.*, 2012). *Ammi visnaga* L. also called the Khella or Noukha in the Maghreb is widely distributed in the North of Algeria (Brahmi *et al.*, 2014), is a short annual or biennial herb indigenous to the Mediterranean region of North Africa, Asia, and Europe (Khalil *et al.*, 2020). Since ancient times, preparations of *A. visnaga* were used in Middle East as a diuretic and to treat urinary tract pain (Günaydin and Beyazit 2004), they have been used in Egyptian folk-medicine against kidney and bladder stones, and in western medicine against asthma and angina pectoris (franchi *et al.*, 1987). Another important effect of this plant is relaxation of the smooth muscle, but this function is limited due to its side effect (Koriem *et al.*, 2019), and it's well known for its antispasmodic activity in the coronary vessels of the heart and bronchi (Sellami *et al.*, 2013). Our objective through this study is to determine the chemical composition of the essential oil obtained from the aerial part of *Ammi visnaga* L., widely growing in the Béni-saf region in the north-west of Algeria, and to evaluate its acute toxicity in vivo, its

antimicrobial activity against seven reference strains which are responsible for nosocomial infections and its anti-inflammatory activity.

Materials and Method

Plant Material

The aerial part of *A. visnaga* were collected in May 2019 from Béni-saf region in the north-west of Algeria (longitude 1°23'1''O, Latitude 35°18'8''N and altitude 25m). The samples were identified by Mr Hachemi Benhassaini, professor at Sidi Bel Abbess University, A voucher specimen was deposited (A.v-A.A 27. 2019) at the laboratory of Microbiology and Plant biology, Mostaganem.

Essential oil extraction

The aerial part of *A. visnaga* was subjected to hydrodistillation (200g) for 3h using a Clevenger-type apparatus (Khalfallah *et al.*, 2011). The essential oil was stored at freezing temperature until further analysis and bioassays.

GC-FID and GC-MS analyses

1 µl of EO sample was injected in the GC at a split ratio of 1/100. Enriched fiber was placed in the GC injector and the fiber desorbed for 1 minute at 250°C. GC-FID and GC-MS analyses were performed in one run and one GC with the help of a MS-FID-splitter consisting of a quartz Y-splitter and a short (ca. 20 cm) 0.1 mm ID fused silica restrictor column as an inlet to the GC-MS interface and a ca. 1 m x

0.25 mm deactivated fused silica column serving as a transfer line to the FID detector. The restriction column brakes the flow into the MS vacuum and prevents entering combustion gases from the FID which is operated at atmospheric pressure. The flow in the analytical column must be greater than the inflow to the MS detector which is restricted to about 1 ml/min by means of the restriction line. The GC column flow must be held constant otherwise the FID-MS split ratio changes with temperature. This configuration gives a FID and a MS chromatogram with similar retention times. A Thermo Fisher Scientific ISQ Mass Spectrometer was used for substance identification, with GC-MS interface warming at 250°C, ion source 230°C. The oven temperature program was 60°C for 1 Min, then warmed up to 230°C at a rate of 3°C/Min. Thermo Xcalibur 2.2 software was operated for identifying the compounds by matching up mass spectra to databases of NIST 08, Wiley 8th ed, Adams library (Adams 2007), MassFinder terpenoids library and our own library. Retention indices are determined according to the method of van den Dool and Kratz (Van den dool and Kratz 1963). Quantification was carried out by normalized peak area calculations of the FID chromatogram without relative FID-response factors.

Pharmacological tests

(i) Animals

Wistar rat (female) were obtained from Pasteur institute (Algeirs-Algeria). They were maintained at 22±3°C and on 12h light/dark cycle and they were acclimatized to laboratory conditions for one week (OECD, 2001).

(ii) Acute oral toxicity

The acute oral toxicity was tasted according to the OECD Guidelines N°423 (OECD, 2001). Rats were fasted for 18h with access to water, the EO was solubilized in tween 80 (1%) and then suspended to provide a 100 mg/ml solution in water (Faria *et al.*, 2011), to be administered orally to groups of rats (n=3) a doses of 50, 300 and 2000mg/kg. Animals were continuously observed during 2 hours to detect changes in autonomic or behavioral responses and monitored for any mortality for the following 48 hours and then for 7 days, if no death occurred, the test was repeated at higher doses until 5000mg/kg.

(iii) Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was studied by the inhibition of hind paw edema induced by a single sub-plantar injection of carrageenin (Landucci *et al.*, 1995). Rats were fasted for 18h with access to water; they were divided into four groups of five animals each (n=5). Group 1, control, received the vehicle (Tween 80, 10mL/kg), Group 2, standard received reference drug (diclofenac, 10 mg/kg). Groups 3 and 4 received EO of *Ammi visnaga* at doses of 50 and 100 mg/kg respectively. Edema was induced by injecting carrageenan (0.1mL) 30 min after oral drug administration into the sub-plantar region of the right hind paw. Using digital vernier calipers, paw volume was measured before injection and 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours after (Vesudevan *et al.*, 2006). Edema inhibition percentage was calculated as follows:

$$\% \text{inhibition} = [(V_t - V_0)_{\text{control}} - (V_t - V_0)_{\text{tasted}}] / V_t - V_0)_{\text{control}}$$

Statistical analysis

The results were statistically analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test, using R software. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Antimicrobial activity of essential oil

(i) Microbial strains

The EO of *A. Visnaga* was tasted against four gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), two gram positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 10876 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) and one fungal strain (*Candida albicans* ATCC 10231), we chose these strains because they are responsible for nosocomial infections, they were provided by the Institute Pasteur of Algiers (Algeria).

(ii) Disc diffusion method

The antimicrobial activity of *A. Visnaga* EO was rated by disc diffusion method (aromatogram); the aromatogram is a qualitative method to explore the antimicrobial activity of a substance (Amatiste *et al.*, 2014). Little sterilized disks of blotting paper (6mm) saturated with with 15 µL of crude EO were placed on the surface of a Müeller Hinton plate count agar previously spreaded with 100 µL of microbial suspensions prepared in sterile 0.9% NaCl solution and adjusted to McFarland 0.5. After a latency period at 37°C for 24 h, the diameter of the inhibition halo was measured with a caliber (Amatiste *et al.*, 2014; Bismarck *et al.*, 2019). Antibiotic and antifungal discs served as a positive antibacterial control to check the growth of different strains. The measurements of inhibition zones were carried out in triplicates.

(iii) Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC was determined by the broth macrodilution method. The EOs were prepared by emulsion then two fold serial dilutions in agar solution (0.2%) (Ousso *et al.*, 2004). Final concentrations ranging from 0.781 to 50µL/mL were tested against the selected microbial strains. 0.2 mL of oil dilution was added to 1.8 mL of bacterial culture in Mueller Hinton broth and 0.1 mL of each EO dilution was added to 0.9 ml of PDA broth inoculated with fungal culture, the tubes were incubated at 37°C/24 h for bacteria and at 25°C/48 h for yeast (Koné *et al.*, 2007). A tube containing nutrient broth and inocula but no EO was used as negative control, while tubes containing sterile broth and each EO concentration were used as positive control. Each oil concentration was assayed in triplicate. The lowest one, which did not show any visual growth, was determined as MIC.

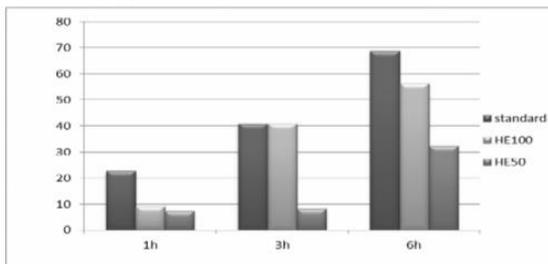
(iv) Determination of minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC- MFC)

The tubes which showed no visible growth during the determination of the MIC were subcultured on Muller Hinton agar plate and incubated at 37°C for 24h for bacteria and on PDA agar plate and incubated at 25°C for 48h for yeast. The low concentration of EO showing no growth on the agar surface is noted as MBC/MFC (Ousso *et al.*, 2004).The experiment was performed in triplicate.

Table 2: Anti-inflammatory activity of *Ammi visnaga* essential oil on paw edema induced by carrageenan in rats.

Treatment	Control	Standard	HE 50	HE 100	
Paw thickness (mm)	1H	6,08 ± 0,14	5,94 ± 0,19	6,15 ± 0,14	6,31 ± 0,08
	2H	6,17 ± 0,11	5,69 ± 0,21	5,93 ± 0,16	5,76 ± 0,24
	3H	6,05 ± 0,23	5,4 ± 0,13	6,10 ± 0,26	5,37 ± 0,15
	4H	6,42 ± 0,17	5,54 ± 0,15	6,43 ± 0,33	5,79 ± 0,09
	5H	6,41 ± 0,23	4,89 ± 0,25***	6,51 ± 0,29	5,83 ± 0,19
	6H	6,27 ± 0,07	4,66 ± 0,27***	5,56 ± 0,14	5,02 ± 0,15*

Control: vehicle (tween 80, 1%); Standard: Diclofenac.*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

**Fig. 1 :** Inhibition (in %) of paw edema by *Ammi visnaga* EO and diclofenac during 6 hours after carrageenan injection.

Antimicrobial activity of essential oil

The results of antimicrobial activity of *Ammi visnaga* essential oil using disc diffusion method are given in table 2. All strains tasted were sensitive to the EO with diameter halos ranging from 17.73 to 36.1 mm. the EO showed the best antimicrobial activity against *Bacillus cereus* ATCC10876, *Staphylococcus aureus* ATCC6538 and *Candida albicans* ATCC10231 with 33.97 mm, 36.1 mm and 32.57 mm inhibition zone diameters respectively. The antibacterial effect of *A. visnaga* EO was significantly greater than the antibacterial effect of antibiotics and the antifungal. We compared our results with those of Khalfallah *et al.*, 2011 who studied the antimicrobial activity of *Ammi visnaga* EO on several strains, the oil showed low activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (25mm) and better activity for *Escherichia coli* ATCC 25922 (29mm) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (25mm). On the other hand, Brahmi *et al.*, 2014 obtained a better result for *Escherichia coli* ATCC25922 (30mm) but low activity for *Staphylococcus aureus* ATCC43300 (15mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (16mm) and *Proteus mirabilis* ATCC49565 (15mm) and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 (14mm). Our essential oil showed better growth inhibition against Gram-positive strains than Gram-negative ones (Table 2), the observed difference in the sensitivity was due to the difference in the cell wall structure (Trombetta *et al.*, 2005), the presence of an outer membrane in Gram-negative bacteria hinders the diffusion of the essential oil through the membrane to the cytoplasm of the cell, making them more resistant to the action of the oil (Teneva *et al.*, 2019).

Table 3: Antimicrobial activity of *Ammi visnaga* essential oil and standard drugs using disc diffusion method (inhibition zone diameters in mm)

Strains	<i>A. visnaga</i> EO	Céfalexine	Doxycycline	Econazole
<i>B. cereus</i> ATCC10876	33.97 ± 0.34	24.5 ± 0.40	18.56 ± 0.41	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	22.53 ± 0.37	23.83 ± 0.84	0	–
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	24.93 ± 0.33	21.83 ± 0.23	08.66 ± 0.62	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	19.47 ± 0.50	22.4 ± 0.40	10.16 ± 0.23	–
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	36.1 ± 0.22	15.5 ± 0.40	14.06 ± 0.32	–
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	17.73 ± 0.54	14.16 ± 0.84	15.13 ± 0.18	–
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	32.57 ± 1.44	–	–	24.16 ± 0.62

The results of MIC and MBC-MFC of *A. visnaga* EO are showed in Table 3, based on these results we notice that the activity was microbicidal against all the tasted strains. MBC/MIC or MFC/MIC ratio of an antimicrobial substance inferior or equal to 4, can be considered as bactericidal or fungicidal, but if the ratio is superior to 4, then it is bacteriostatic or fungistatic (Marmonier, 1990). The lowest MIC and MBC values were determined to be 1.56 µl/ml. concerning *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, the antimicrobial activity was a little weak than the other strains. Several studies have focused on the antimicrobial effects of *Ammi visnaga* EO, showing their effectiveness against various microorganisms such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains (Khalil *et al.*, 2020).

Table 4: Antimicrobial parameters values of *Ammi visnaga* EO and standard drugs.

Strains	<i>Ammi visnaga</i> EO (µL/mL)	
	MIC	MBC-MFC
<i>B. cereus</i> ATCC10876	1.56	1.56
<i>E. coli</i> ATCC25922	3.12	6.25
<i>P. mirabilis</i> ATCC35659	3.12	3.12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	12.5	50
<i>S. aureus</i> ATCC6538	12.5	12.5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	12.5	25
<i>C. albicans</i> ATCC10231	3.12	3.12

The antimicrobial activity of *Ammi visnaga* EO could be attributed to its main components, the mechanism of action of terpenes is not fully understood but it is speculated to involve a damage of the plasma membrane stability with subsequent membrane disruption by the lipophilic compounds (Teneva *et al.*, 2019). Limonene could demolish the cell wall morphology, and cell membrane could lead to the leakage of some intracellular substances, such as extravasation of protoplasts, thusly leading to cell death. (Han *et al.*, 2019). Zahi *et al.*, 2017, found that the spherical structure of *Staphylococcus aureus* and *Saccarimycetes cerevisiae* and the bacilliform structure of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* show different forms of distortion and deformation after being treated with limonene. Carvacrol and Thymol, phenolic monoterpenoids structurally very similar (Rua *et al.*, 2019), their antimicrobial effect occurs when the

Results and Discussion

Essential oil extraction

The EO of *Ammi visnaga* was obtained by steam distillation with a yield of 1.78%. This yield is higher than those obtained from the same species in Algeria, collected in Constantine with 1.3% (Khalfallah *et al.*, 2011) and in boumerdes with 0.16, 0.32 and 0.48 % (mL/100 g of dried plant before flowering, flowering and after flowering respectively (Brahmi *et al.*, 2014). It's also higher than those obtained in morocco and Tunisia with 0.27% essential oil (mL/100g of dried material) (Satrani *et al.*, 2004), 0.4 to 1.5 % (mL/100 g of dried material (Zrira *et al.*, 2008), and 0.2% yields (V/W), based on dried weight of samples (Khadhri *et al.*, 2011).

Essential oil analyses (GC-FID and GC-MS)

The *Ammi visnaga* EO was analyzed by GC-FID and GC-MS methods. The compounds obtained, their concentrations and retention indices are given in Table 1. In total, 26 compounds were identified in the aerial part, accounting for 95.1% of the total oil. The major component found was limonene (27.8%), followed by p-cymene (19.9%), carvacrol (18.7%), thymol (14.2%) and gamma-terpinene (10%), the other components are present with small amounts (Table 1). There were considerable differences qualitatively and quantitatively in comparison to the results previously reported in the *Ammi visnaga* essential oils analyses, in Algeria Brahmi *et al.* (2014), have identified 49 components in essential oils obtained by hydrodistillation of *Ammi visnaga* from Boumerdes, the main one was 2-methylbutyl 2methyl butanouate (28.56%). Khadhri *et al.* (2011) studied the essential oil of *Ammi visnaga* from tunisia and identified 41 compounds. Moroccan *Ammi visnaga* essential oil is characterized by the presence of amyle isobutyrate, linalol, 2-methyl-butyrate, isoamyle and du amyl valerate (Satrani *et al.*, 2004; Zrira *et al.*, 2008). khalil *et al* (2020) state that Variation in the chemical composition of essential oils and their yields may be associated with variations in the environment, geographic origins and differences in biotypes.

Table 1 : chemical composition (%) of *Ammi visnaga* essential oil from Algeria.

Compound	IR	%Area
alpha-thujene	931	0,19
alpha-pinene	940	1,02
Sabinene	978	0,04
beta-pinene	984	0,07
Myrcene	990	0,33
Verbenene	1009	0,24
delta-3-carene	1016	0,06
alpha-terpinene	1021	0,23
p-cymene	1028	19,94
Limonene	1034	27,84
gamma-terpinene	1063	9,96
p-cymenene	1093	0,26
Linalool	1098	0,04
alpha-thujone	1111	0,15

beta-thujone	1122	0,02
trans-limonene oxide	1143	0,05
Camphre	1153	0,02
Menthol	1172	0,04
terpinene-4-ol	1185	0,97
alpha-terpineol	1196	0,08
dihydro carvone	1202	0,05
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1232	0,23
Carvone	1249	0,09
Thymoquinone	1253	0,28
Thymol	1283	14,23
Carvacrol	1290	18,71
Somme		95,14
tr. = trace ; RI=Retention index		

Acute oral toxicity

Concerning the acute toxicity study of *A.visnaga* EO, mortality was observed in all rats 18 hours after treatment at the dose of 2000 mg/kg. Sedentary and salivation were also noted during the first hours after treatment with this dose and with the dose of 300 mg/kg. According to the guidelines (OECD, 2002), the lethal dose 50 of *A.visnaga* EO is LD50=500mg/kg, and according to the Hodge and Sterner Toxicity Scale (Ahmed and Azmat, 2014), we conclude that the EO is slightly toxic.

Anti-inflammatory activity of essential oil

The results of the evaluation of anti-inflammatory activity by carrageenan-induced paw edema in rats are given in Table 4 and Figure 1. The paw volume increased progressively after carrageenan injection reaching its peak at four hours in the control group. In the standard group, treated with diclofenac, the inflammation started to decrease after 2 hours, and compared to the control group, it has very significantly reduced the paw volume ($p < 0.001$), with a percentage of inhibition of 68.80%. While, the *Ammi visnaga* EO have significantly reduced the paw volume ($P < 0.05$) at the highest dose tested (100mg/kg), with a percentage of inhibition of 56.35%. The development of carrageenin-induced oedema is bi-phasic, the first phase (1-2 hours) is attributed to the release of histamine, 5-HT and kinins, while, the second phase (3-6 hours) is sustained by the release of prostaglandins, leukotrienes, lysozymes, proteases, nitric oxide (NO) and also by local neutrophil infiltration (Banerjee *et al.*, 2000; Abdelli *et al.*, 2018). COX-2, is an inducible enzyme found in activated inflammatory cells, plays a crucial role in cytokine production and prostanoid mediator release (Fachini-queiroz *et al.*, 2012). Thymol has an important action on the COX enzymes (Veras *et al.*, 2013), and a study made by Riella and her collaborators, showed the important role of thymol on inflammatory response with an inhibition of 35.3% ($p < 0.001$) on the edema response (Riella *et al.*, 2012). Previous research has indicated that carvacrol suppresses the LPS-induced of COX-2, which can cause repression of inflammation (Tsai *et al.*, 2011). Thus, the *Ammi visnaga* EO (consist of 14.2% thymol and 18.7% carvacrol) exhibited a significant anti-inflammatory activity in this study.

hydrophobic moiety of these molecules interacts with the hydrophobic domain of the cytoplasmic membrane of bacterial cells, and the presence of free hydroxyl groups of these compounds disrupting the ion gradients of bacterial cells (Rua *et al.*, 2019; Sim *et al.*, 2019). Carvacrol interacts with the lipid bilayer of the cytoplasmic membrane and itself aligns between the fatty acid chains causing the expansion and destabilization of the membrane structure and increasing its fluidity and permeability (Nastro and Papalia, 2012). P-cymene improves the antimicrobial properties of other substances, such as carvacrol, through synergism, antagonism and additive effects (Marchese *et al.*, 2017). It's possible that the components in lower percentage might be involved in synergism with the other active compounds (Shunying *et al.*, 2005).

Conclusion

To conclude, the present work aims to enhance the value of the Algerian flora, and more particularly, *Ammi visnaga* L., growing spontaneously in the northwest of Algeria, by evaluating some of its biological properties, such as antimicrobial and anti-inflammatory activity. The extraction by hydrodistillation of the EO of *A. visnaga* gave a yield of 1.78%. This oil was analyzed by GC-FID and GC-MS methods, 26 compounds were identified in the aerial part, representing 95.1% of the total oil. The major component found was limonene (27.8%), p-cymene (19.9%), carvacrol (18.7%), thymol (14.2%) and gamma-terpinene (10%). According to the guidelines (OECD), our EO was slightly toxic and the lethal dose 50 was 500mg/kg. The evaluation of the antimicrobial activity, by the aromagram method, showed a great inhibitory effect of the essential oil on all the reference strains tested with diameter halos ranging from 17.73 to 36.1 mm, the results of the MIC and MBC/MFC showed that the activity was microbicidal. In regards to the anti-inflammatory activity, the EO reduced the carrageenan induced paw edema in rats by 56.35% ($p < 0.05$) after 6 hours.

Acknowledgment

This project was supported by directorate of scientific research and technical development of Algeria. We would like to thank Miss Ouguirti nawal, Miss Tahlaoui Amira and Miss Hamed djahira from the laboratory of microbiology and plant Biology, and Abdelhamid ibn Badis University for research facilities.

References

- Abdelli, W.; Bahri, F.; Höferl, M.; Wanner, J.; Schmidt, E. and Jirovetz, L. (2018). *Chemical Composition, Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity of Algerian Juniperus Phoenicea Essential Oils*. 6.
- Adams, R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed.; Allured Publishing Corp.; Carol Stream, Illinois, USA.
- Ahmed, M. and Azmat, A. (2014). Acute toxicity (Lethal Dose 50 calculation) and histopathological effects of methanolic extract of *Berberis vulgaris* in mice. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(9): 10.
- Amatiste, S.; Sagrafoli, D.; Giacinti, G.; Rosa, G.; Carfora, V.; Marri, N.; Tamaro, A.; Bovi, E. and Rosati, R. (2014). Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. *Italian Journal of Food Safety*, 3(3).
- Antonia, N. and Teresa, P. (2012). Antimicrobial Activity of Carvacrol : Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1): 28-35.
- Balouiri, M.; Sadiki, M. and Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79.
- Banerjee, S.; Sur, T.K.; Mandal, S.; Das, P.C. and Sikdar, S. (2000). Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. 5.
- Bismarck, D.; Dusold, A.; Heusinger, A. and Müller, E. (2020). Antifungal in vitro Activity of Essential Oils against Clinical Isolates of *Malassezia pachydermatis* from Canine Ears : A Report from a Practice Laboratory. *Complementary Medicine Research*, 27(3): 143-154.
- Fachini-Queiroz, F.C.; Kummer, R.; Estevão-Silva, C.F.; Carvalho, M.D. de B.; Cunha, J.M.; Grespan, R.; Bersani-Amado, C.A. and Cuman, R.K.N. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-10.
- Faria, L.R.D.; Lima, C.S.; Perazzo, F.F. and Carvalho, J.C.T. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7: 1-8.
- Feirouz, B. and Salima, K.G. (2014). Antibacterial Activity and Chemical Composition of *Ammi visnaga* L. Essential Oil Collected from Boumerdes (Algeria) During Three Periods of the Plant Growth. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(6): 1317-1328.
- Franchi, G.G.; Ferri, S.; Bovolini, L. and Martelli, P. (1987). *Ammi Visnaga* (L.) Lam. : Occurrence of Khellin and Visnagin in Primary Rib Channels and Endosperm, and Emptiness of Vittae, Revealed by U.V. Microscopy*. *International Journal of Crude Drug Research*, 25(3): 137-144.
- Günaydin *, K. and Beyazit, N. (2004). The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga* (Lam.) lamarck growing in turkey. *Natural Product Research*, 18(2): 169-175.
- Han, Y.; Sun, Z. and Chen, W. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 25(1): 33.
- Khadhri, A.; Mokni, R. E.; Mguis, K.; Ouerfelli, I. and Araújo, M. E. M. (2011). *Variability of two essential oils of Ammi visnaga* (L.) Lam. A traditional Tunisian Medicinal Plant. 4.
- Khalfallah, A.; Labeled, A.; Semra, Z.; Kaki, B. A.; Kabouche, A.; Touzani, R. and Kabouche, Z. (2011). *Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Ammi visnaga L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria*. 5.
- Khalil, N.; Bishr, M.; Desouky, S. and Salama, O. (2020). *Ammi Visnaga* L.; a Potential Medicinal Plant : A Review. *Molecules*, 25(2): 301.

- Koné, W.M.; Kamanzi Atindehou, K.; Kacou-n'douba, A. and Dosso, M. (2007). Evaluation of 17 medicinal plants from Northern Côte d'Ivoire for their in vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4: 17-22.
- Koriem, K.M.M.; Arbid, M.S. and El-Attar, M.A. (2019). Acute and subacute toxicity of *Ammi visnaga* on rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(1): 26-35.
- Landucci, E.C.T.; Antunes, E.; Donato, J.L.; Faro, R.; Hyslop, S.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G. and Nucci, G. (1995). Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *British Journal of Pharmacology*, 114(3): 578-583.
- Marchese, A.; Arciola, C.; Barbieri, R.; Silva, A.; Nabavi, S.; Tsetegho Sokeng, A.; Izadi, M.; Jafari, N.; Sutar, I.; Daglia, M. and Nabavi, S. (2017). Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents : A Particular Focus on p-Cymene. *Materials*, 10(8): 947.
- Marmonier A.A. (1990): Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, techniques usuelles. DOIN édition, Paris, France, 227-236p
- OECD. (2002) Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Olajide, O.A.; Makinde, J.M. and Awe, S.O. (1999). Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1): 113-117.
- Oussou, K.R.; Kanko, C.; Guessend, N.; Yolou, S.; Dosso, M.; N'Guessan, Y.T.; Figueredo, G.; Chalchat, J.-C. and Koukoua, G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11): 1081-1086.
- Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A.; Parente, L.; Sautebin, L. and Cirino, G. (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression: Inflammatory response is dependent on mouse age. *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 331-338.
- Riella, K.R.; Marinho, R.R.; Santos, J.S.; Pereira-Filho, R.N.; Cardoso, J.C.; Albuquerque-Junior, R.L.C. and Thomazzi, S.M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2): 656-663.
- Rúa, J.; del Valle, P.; de Arriaga, D.; Fernández-Álvarez, L. and García-Armesto, M.R. (2019). Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(9): 622-629.
- Satrani, B.; Farah, A.; Fechtal, M.; Talbi, M. and Bouamrani, M.L. (2004). Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (L.) Lam. Du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 151(1): 65-71.
- Saleh, M.; Clark, S.; Woodard, B.; Deolu-Sobogun, S-A. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity & Disease*, Volume 20.
- Sellami, H.K.; Flamini, G.; Cioni, P.L. and Smiti, S. (2011). Composition of the Essential Oils in Various Organs at Different Developmental Stages of *Ammi visnaga* (L.) Lam. From Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*, 8(11): 1990-2004.
- Sellami, H.K.; Napolitano, A.; Masullo, M.; Smiti, S.; Piacente, S. and Pizza, C. (2013). Influence of growing conditions on metabolite profile of *Ammi visnaga* umbels with special reference to bioactive furanochromones and pyranocoumarins. *Phytochemistry*, 95: 197-206.
- Shunying, Z.; Yang, Y.; Huaidong, Y.; Yue, Y. and Guolin, Z. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2): 151-158.
- Sim, J.X.F.; Khazandi, M.; Chan, W.Y.; Trott, D.J. and Deo, P. (2019). Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 30(6): 524.
- Teneva, D.; Denkova-Kostova, R.; Goranov, B.; Hristova-Ivanova, Y.; Slavchev, A.; Denkova, Z. and Kostov, G. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 74(5-6): 105-111.
- Tsai, M.-L.; Lin, C.-C.; Lin, W.-C. and Yang, C.-H. (2011). Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10): 1977-1983.
- Trombetta, D.; Castelli, 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: 2474-2478.
- van Den Dool, H. and Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11: 463-471.
- Vasudevan, M.; Gunnam, K.K. and Parle, M. (2006). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties of *Daucus carota* Seeds Extract. *Journal of Health Science*, 52(5): 598-606.
- Veras, H.N.H.; Araruna, M.K.A.; Costa, J.G.M.; Coutinho, H.D.M.; Kerntopf, M.R.; Botelho, M.A. and Menezes, I.R.A. (2013). Topical Anti-inflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action: LIPPIA SIDOIDES. *Phytotherapy Research*, 27(2): 179-185.
- Zrira, S.; Elamrani, A.; Pellerin, P.; Bessière, J. M.; Menut, C. and Benjilali, B. (2008). Isolation of Moroccan *Ammi visnaga* oil: Comparison between Hydrodistillation, Steam Distillation and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1): 30-35. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643593>