

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



THESE

Présentée à

L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Filière : **Sciences Agronomiques**

Option : **Nutrition et Santé**

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

De l'université de Mostaganem

Par

Choukri Tefiani

Sous le thème

Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*.

Soutenu le 15 Juin 2015 devant le jury d'examen composé de :

Président : Mr Lotmani Brahim, Professeur à l'Univ. Mostaganem
Directeur de thèse : Mr Riazi Ali, Professeur à l'Univ. Mostaganem
Examineurs : Mr Krouf Djamil, Professeur à l'Univ. Es-Sénia Oran
Mme Merzouk Hafida, Professeur à l'Univ. Tlemcen
Mr Boualga Ahmed, Professeur à l'Univ. Es-Sénia Oran
Mr Benali Mohamed, Professeur à l'Univ. Sidi-Bel-Abbes

Année universitaire : 2014/2015

DEDICACES

Je dédie mon travail à la lune de mes nuits et le soleil de mes jours, à celle qui m'a toujours soutenu ; ma chère mère, ainsi qu'à l'âme de mon père qui me manque énormément.

A mon grand et unique amour, ma chère épouse.

A mes adorable fillettes Hiba et alae.

A toutes mes sœurs et mon frère Yassine ainsi qu'à mes beaux-frères et à toutes les familles : TEFIANI, MANSOURI, HASNAOUI, YAHIA MAMOUNE, BOUZIANI et NEGACHE.

Mes dédicaces sont également adressées à tous mes amis avec lesquels j'ai partagé de beaux moments et dont je garde d'excellents souvenirs.

Choukri

Avant-propos

La présente thèse a été réalisée conjointement au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, du Laboratoire pédagogique de la faculté SNV/STU de l'université de Tlemcen, du Centre de biotechnologie végétale de l'université d'Algarve (Portugal) , de l'Institut de biotechnologie et de bio-ingénierie de l'université de Lisbonne (Portugal) ; ainsi qu'à l'institut de Grasa à Seville (Espagne).

J'adresse ma reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr A. Riazi, Professeur à l'université de Mostaganem, pour l'encadrement qu'il m'a assuré de l'ingénieurat jusqu'au doctorat en passant par le magister, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité exceptionnelle et la liberté d'action qu'il m'a laissé tout au long de ce projet. Je le remercie également, pour son intérêt porté à mon sujet, son aide morale et la mise à disposition inconditionnelle de tous ses moyens.

Je remercie également Mr. B. Lotmani, professeur à l'université de Mostaganem, pour m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance, en dépit de la grande responsabilité administrative qu'il assure.

Ma gratitude s'adresse à Mr M. Benali, Professeur à l'université Djillali Liabbes de Sidi Bel-Abbès, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes vifs remerciements sont également adressés Mr Krouf Jamil, Professeur à l'université d'Oran 1 (Es-Sénia) pour avoir accepté de siéger dans mon jury

Je remercie , également, Mr Boualga Ahmed, Professeur à l'université d'Oran 1 (Es-Sénia) pour sa participation à mon jury de thèse.

Je suis très honoré par la participation de Mme Merzouk, Professeur à l'université Abbou Bakr Belcaid de Tlemcen, qui a aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Mes remerciements les plus forts sont adressés à Maria Graça Miguel, Professeur à l'université d'Algarve, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je la remercie également pour sa grande gentillesse, son aide morale et la mise à ma disposition de tous les moyens dont elle dispose, tout ce que je dirai n'exprimerai pas ma gratitude pour elle.

J'adresse mes vifs remerciements à M. Bouazza, professeur à l'université de Tlemcen pour m'avoir aidé dans l'identification des différentes espèces végétales étudiées.

Je ne dois pas oublier Mr S. Aazza et Mr T. Chaouche qui n'ont pas hésité à m'apporter de l'aide et du soutien durant la réalisation de cette thèse

Mes remerciements sont dirigés aussi à mes collègues du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) (Mr Bouzouina, Mr et Mme Chaallel, Mr Benbouziane, Melle Boufadi, Melle Zerrouki et Mme Keddari), ainsi qu'à mes collègues du département d'Agronomie (Amrani, Elhaitoum, N. Azzi, Barka, Benyoub, Ghezlaoui, Youcefi et Elaffifi) et de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers de l'Université de Tlemcen.

Je remercie le Pr Bensalah, Pr Lahfa ainsi que Mr A. Merzouk pour m'avoir facilité la tâche dans mon travail, pour leurs aide, soutien et compréhension.

Je tiens à remercier infiniment tous les membres des laboratoires où j'ai pu réaliser mes recherches et à leur tête C. Gago, M.L. Faleiro, L.G. Pedro, J.G. Barroso, A.C. Figueiredo, C. Megías, I. Cortés-Giraldo, J. Vioque pour leurs aides durant toute mon expérimentation.

Enfin, ce travail est le fruit de longues années d'études, auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille ont largement contribué.

Choukri TEFIANI

Résumé

Ce travail a pour but la détermination de la composition chimique et des propriétés biologiques *in vitro* (pouvoir antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire et anti-diabétiques) des huiles essentielles de deux plantes originaires de l'extrême Nord-ouest d'Algérie (région de Tlemcen), *Ammoides* (ou *Ptychotis*) *verticillata* (Desf.) Briq. et *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet, ainsi que celles des rhizomes de *Curcuma longa* commercialisés en Algérie.

La composition chimique a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les activités antioxydantes *in vitro* ont été déterminées à travers une panoplie de tests d'évaluation. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et par la détermination des concentrations minimales inhibitrices par dilutions en milieu liquide. Par ailleurs, l'effet des huiles essentielles sur la lipoxygénase, l'acétylcholinestérase et l'alpha amylase a, également, été exploré.

L'analyse chimique des huiles essentielles a révélé la prédominance du carvacrol (71.4%), *p*-Cymene (8.3%) et du γ -Terpinene (5.9%) chez *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*; de l'alcool cumine (44.3%), du γ -Terpinene (18.1%), du Limonène (14.2%) et du thymol (10.8%) chez *A. verticillata* et du tumérone aromatique (35%), du Curhone (14.2%) et du tumérone (11.8%) chez *C. longa*.

L'huile essentielle de *T. ciliatus* a révélé une bonne activité antimicrobienne (exprimée par le diamètre en mm des zones d'inhibition) vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* (12.5 à 13.83 mm), de *Listeria monocytogenes* (13.83 à 22.5 mm), d'*Escherichia coli* (13.79 à 14.67 mm) et d'une souche de *Salmonella Thyphimurium* (15.67 mm). Cette huile essentielle exerce une forte activité sur le radical hydroxyl ($IC_{50}=0,00221$ mg/mL), sur l'Oxygen Radical Antioxidant Capacity ou ORAC (fifty percent inhibitory concentration ou $IC_{50}=1.19$ mM Trolox/g); ainsi qu'une inhibition notable sur les enzymes comme l'acétylcholinestérase et l'alpha amylase. En revanche, l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle extraite d'*A. verticillata* a été bonne sur le 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine ou DPPH ($IC_{50}=0,0422$ mg/mL), le sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique ou ABTS ($IC_{50}=0,0013$ mg/mL), et sur les substances réactives à l'acide thiobarbiturique ou TBARS ($IC_{50}=0,02794$ mg/mL); mais, plus forte sur l' H_2O_2 ($IC_{50}=0,522$ mg/ml); elle a un bon pouvoir réducteur et une bonne préservation des liposomes contre la peroxydation ($IC_{50}=0,299$ mg/mL). La particularité de *C. longa* a été son efficacité à inhiber la lipoxygénase ($IC_{50}=0,0134$ mg/mL). L'activité anti-proliférative de l'huile essentielle de *T. ciliatus* vis-à-vis des cellules cancéreuses THP-1 est supérieure à celle d'*A. verticillata*. Ces résultats montrent que ces huiles essentielles possèdent des activités biologiques intéressantes et constituent un prélude à des investigations *in vivo* visant à les habilitier comme sources naturelles d'antioxydants, d'antimicrobiens et d'anti-inflammatoires.

Mots clefs : Huiles essentielles –*Ammoides verticillata* –*Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* –*Curcuma longa* – Activités biologiques.

Abstract

The aim of this study is to determine the chemical composition and the *in vitro* biological properties (antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-diabetic) of two plants essential oils originated from the north-west of Algeria (Tlemcen) (*Ammoides* (or *Ptychotis*) *verticillata* (Desf.) Briq. and *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet); and also commercial *Curcuma longa*. The chemical composition was determined using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Different tests were used to evaluate *in vitro* the antioxidant activity. The antimicrobial activity was evaluated by the disc diffusion method and the minimal inhibition concentration was determined by the microdilution method. The effect of these essential oils was also studied on lipoxygenase, acetylcholinesterase and alpha-amylase. According to the chemical analysis results, carvacrol is the major compound of *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (71.4%), followed by *p*-cymene (8.3%) and γ -terpinene (5.9%). *Cumin alcohol* represents 44.3% of the essential oils of *A. verticillata*, γ -terpinene (18,1%), limonene (14,2%) and thymol (10,8%). The major compound of *C. longa* was aromatic tumerone (35%), Curlone (14,2%) and tumerone (11,8%). The essential oils of *T. ciliatus* exhibit a good antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (12.5 to 13.83 mm), *Listeria monocytogenes* (13.83 to 22.5 mm), *Escherichia coli* (13.79 to 14.67 mm) and *Salmonella Thyphimurium* (15.67 mm). These essential oils had also a good activity against the hydroxyl radical (IC₅₀=0,00221mg/ mL), Oxygen Radical Antioxidant Capacity or ORAC (IC₅₀=1,19 mM Trolox/g), and also inhibited the activity of both enzymes acetylcholinesterase and alpha-amylase. On the other hand the anti-radical activity of the essential oils of *A. verticillata* were effective against DPPH (IC₅₀=0,0422mg/mL), ABTS (IC₅₀=0,0013 mg/mL), TBARS (IC₅₀=0,0279 mg/mL). But the most powerful effect was on H₂O₂ (IC₅₀=0,522mg/ml). It has a good reducing property and ability to protect the liposomal membranes against lipid peroxidation (IC₅₀=0,299 mg/mL). The essential oils of *C. longa* had a good capacity of lipoxygenase inhibition (IC₅₀=0,013 mg/mL). The anti-tumor activity of *T. ciliatus* against cancer cells THP-1 was higher than *A. verticillata*. These essential oils showed an interesting biological properties that should be investigated *in vivo*.

Keywords : Essential oils – *Ammoides verticillata* – *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* – *Curcuma longa* – biological properties.

Liste des abréviations

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Molybdate d'Ammonium
°C	Degré Celsius
μA	Micro-Ampère
μg	Microgramme
μg/mL	Microgramme par millilitre
μL	Microlitre
μL/mL	Microlitre par millilitre
μm	Micromètre
μM	Micromolaire
ABTS	acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHI	Bouillon cœur cerveau
BHT	Hydroxytoluène butylé
C ₅ H ₁₀ O ₄	Désoxyribose
CAT	Capacité Antioxydante Totale
cm	Centimètre
cm/s	Centimètre par seconde
cm ²	Centimètre au carré
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CO ₂	Gaz carbonique
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG/SM	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
D.O	Densité optique
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	diméthyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis-2- nitrobenzoïque
ECL	Laboratoire de référence pour <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
eV	electron Volts
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	ions Ferriques
FeCl ₃	chlorure de fer
FeSO ₄	Sulfate ferreux
FIDs	détecteurs à ionisation de flamme
g	Gramme
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
HCl	Acide Chlorhydrique
HE	Huile Essentielle

IC ₅₀	la concentration qui correspond à 50% d'inhibition
IK	indice de Kováts
Ir	indices de rétention
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfate de potassium
K ₃ Fe(CN) ₆	ferricyanure de potassium
KCl	Chlorure de potassium
Kg	Kilogramme
m	Mètre
MDA	Malondialdéhyde
mg EA.g ⁻¹ HE	milligramme équivalent d'Acarbose par gramme d'huile essentielle
mg/mL	Milligramme par millilitre
mm	Millimètre
mM	millimolaire
mn	minute
Mo	molybdène
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
mV	millivolts
Na ₂ SO ₄	Sulfate de Sodium
Na ₃ PO ₄	Phosphate de Sodium
nm	nanomètre
OH [•]	Hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAC	capacité d'absorbance du radical d'oxygène « <i>Oxygen Radical Antioxidant Capacity</i> »
O ^{•2-}	Anion superoxyde
p/p	poids sur poids
p/v	poids sur Volume
pH	potentiel d'Hydrogène
RMCD	randomly methylated β-cyclodextrin
rpm	rotation par minute
SDS	dodecyl sulphate de sodium
ssp.	sous espèce
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TSB	Bouillon triptic de soja
U/mL	Unité par millilitre
UFC/mL	Unité formant colonie par millilitre
v/v	Volume sur Volume

Liste des tableaux

Tableau 01	: Récolte, séchage et conservation des plantes (Valnet, 2001).....	7
Tableau 02	: Les différentes appellations de <i>Thymus ciliatus</i>	8
Tableau 03	: Les différentes appellations d' <i>Ammoides verticillata</i>	11
Tableau 04	: Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur <i>Ammoides verticillata</i> (Bekhechi, 2009)	14
Tableau 05	: Les différentes appellations de <i>Curcuma longa</i>	15
Tableau 06	: Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations d'études ..	25
Tableau 07	: Nature et origine des souches testées.....	31
Tableau 08	: Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.....	49
Tableau 09	: Composition des huiles essentielles isolées de la partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i>	56
Tableau 10	: Composition en pourcentage des huiles essentielles isolées de la partie aérienne de <i>Thymus ciliatus</i>	61
Tableau 11	: Composition en pourcentage des huiles essentielles isolées des rhizomes de <i>Curcuma longa</i>	65
Tableau 12	: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i>	69
Tableau 13	: Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i>	69
Tableau 14	: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	73
Tableau 15	: Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	73
Tableau 16	: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles de <i>Curcuma longa</i>	76
Tableau 17	: Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles de <i>Curcuma longa</i> ..	76

Liste des figures

Figure 1	: <i>Thymus ciliatus</i> (Desf.) Benth. de la région de Tlemcen (photo originale)	9
Figure 2	: <i>Ammoides verticillata</i> « photo originale »	12
Figure 3	: Dessin représentant la plante entière (A) et les différentes parties (B) de <i>Curcuma longa</i> (Hombourger, 2010).....	16
Figure 4	: Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de <i>Mentha pulegium</i> , (B) : trichome glandulaire de <i>Mentha pulegium</i> , (C) : trichome glandulaire de <i>Lippia scaberrima</i> et (D) : structure de trichome glandulaire de <i>Thymus vulgaris</i> (Combrinck et al., 2007 ; Karray-Bouraoui et al., 2009).....	19
Figure 5	: Montage d'hydrodistillation (photo originale).....	27
Figure 6	: Réaction entre le radical DPPH [•] et l'antioxydant pour former le DPPH stable (Moon & Shibamoto, 2009).....	35
Figure 7	: Génération de l'ABTS ^{•+} par un oxydant persulfate de potassium (Moon & Shibamoto, 2009).....	36
Figure 8	: Structure chimique de la ferrozine (Gulcin, 2012)	39
Figure 9	: Formation du chromophore Acide thiobarbiturique-Malondialdéhyde (Moon & Shibamoto, 2009).....	41
Figure 10	: Rendements des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	55
Figure 11	: Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle de <i>Ammoides verticillata</i> (9 = p-cymene, 11 = limonene, 12 = γ-terpinene, 21 = cuminalcool and 22 = thymol).....	55
Figure 12	: Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> (10 = p-cymene, 14 = γ-terpinene, 26 = carvacrol)..	60
Figure 13	: Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle de <i>Curcuma longa</i>	64
Figure 14	: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [•] en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	79
Figure 15	: Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS ^{•+} en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	83
Figure 16	: Absorbances indiquant la capacité antioxydante totale en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et de <i>Curcuma longa</i> (■).....	86
Figure 17	: Pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■), <i>Curcuma longa</i> (■) et de l'acide ascorbique (■).....	88
Figure 18	: Pourcentages de piégeage du radical hydroxyle en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma</i>	

	<i>longa</i> (■).....	92
Figure 19 :	Pourcentages d'inhibition de la substance réactive à l'acide Thio-barbiturique en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	94
Figure 20 :	Pourcentages de préservation des liposomes en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles (en A) d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), (en B) de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	98
Figure 21 :	Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	100
Figure 22 :	Pouvoir inhibiteur de la lipoxygénase par les huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	105
Figure 23 :	Pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase par les huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> (■), <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (■) et <i>Curcuma longa</i> (■).....	109
Figure 24 :	Courbe d'étalonnage de l'acarbose pour la détermination de la capacité antidiabétique par l'alpha amylase.....	112
Figure 25 :	Capacité antidiabétique des huiles essentielles par le test alpha amylase	112
Figure 26 :	Viabilité des cellules THP-1 (en % par rapport au control) confronté à l'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i> après 01 jour (■), 04 jours (■) et 07 jours (■) de contact.....	114
Figure 27 :	Viabilité des cellules THP-1 (en % par rapport au control) confronté à l'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> après 01 jour (■), 04 jours (■) et 07 jours (■) de contact.....	114

Table des matières

« Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* »

Dédicace
Avant propos
Résumé
Abstract
Liste des abréviations
Liste des tableaux et des figures
Table des matières

Partie bibliographique

	Page
Introduction	1
Chapitre I : Plantes médicinales et huiles essentielles	
I.1. Les plantes médicinales	3
I.1.1. Les métabolites secondaires des plantes	4
I.1.2. Mode d'utilisation des plantes médicinales	5
I.1.3. Récolte et conservation des plantes médicinales	5
I.1.4. Plantes étudiées	7
I.1.4.1. <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> Maire	7
I.1.4.1.1. Présentation de la plante	7
Noms vernaculaire	7
I.1.4.1.2. Description botanique	8
a. Caractères botaniques	8
b. Systématique de <i>Thymus ciliatus</i>	9
I.1.4.1.3. Utilisations médicinales	9
I.1.4.2. <i>Ammoides verticillata</i>	10
I.1.4.2.1. Présentation de la plante	10
Noms vernaculaire	10
I.1.4.2.2. Description botanique	11
a. Caractères botaniques	11
b. Systématique d' <i>Ammoides verticillata</i>	11
I.1.4.2.3. Utilisations médicinales d' <i>Ammoides verticillata</i>	12
I.1.4.3. <i>Curcuma longa</i>	13
I.1.4.3.1. Présentation de la plante	13
Noms vernaculaire	13
I.1.4.3.2. Description botanique	15
a. Caractères botaniques	15
b. Systématique de <i>Curcuma longa</i>	16
I.1.4.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle	17
I.2. Les huiles essentielles	18
I.2.1. Localisation des huiles essentielles	18
I.2.2. Facteurs de variabilité des huiles essentielles	19
I.2.3. Rôles des huiles essentielles dans la plante	20
I.2.4. Activités biologiques des huiles essentielles	21

I.2.4.1. Activité antimicrobienne	21
I.2.4.1. Activité antioxydante	23
I.2.4.1. Autres activités biologiques	24

Partie expérimentale

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal	26
II.1.1. Choix des plantes	26
II.1.2. Collecte du matériel végétal	26
II.1.3. Procédés d'extraction et conservation des huiles essentielles	26
II.1.4. Détermination du rendement en huiles essentielles	28
II.1.5. Conservation des huiles essentielles	28
II.2. Analyse des huiles essentielles	29
II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	29
II.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	30
II.2.3. Identification des constituants	30
II.3. Détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	31
II.3.1. Nature, origine et conservation des souches	31
II.3.2. Mise en évidence du pouvoir antibactérien des huiles essentielles	32
II.3.2.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé	32
II.3.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	33
II.4. Mesure du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites	33
II.4.1. Piégeage du radical DPPH [*]	34
II.4.2. Piégeage du radical ABTS ⁺	35
II.4.3. Détermination de la capacité antioxydante totale	36
II.4.4. Pouvoir réducteur du fer	37
II.4.5. Pouvoir chélateur du fer	38
II.4.6. Piégeage du radical hydroxyle	39
II.4.7. Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)	40
II.4.8. Liposomes	42
II.4.9. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	42
II.4.10. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)	43
II.5. Mesure du pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles extraites	45
II.5.1. Mesure du pouvoir d'inhibition de la lipoxygénase	45
II.5.2. Mesure du pouvoir anti-acétylcholinestérase	45
II.6. Mesure du pouvoir antidiabétique	46
II.6.1. Test de l'inhibition de l' α amylase	46
II.7. Détermination de l'activité antiproliférative des huiles essentielles vis-à-vis des cellules cancéreuses THP-1	46
II.7.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire THP-1	46
II.7.2. Technique de culture des cellules THP-1	47
II.7.3. Mesure de l'activité antiproliférative	47
II.8. Analyse statistique	48

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites	49
III.2. Rendement d'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées	50
III.2.1. Rendement en huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	50

III.2.2. Rendement en huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	50
III.2.3. Rendement en huile essentielle de <i>Curcuma longa</i>	52
III.3. Composition des huiles essentielles extraites	53
III.3.1. L'huile essentielle d' <i>Ammoides verticillata</i>	54
III.3.2. L'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	58
III.3.3. L'huile essentielle de <i>Curcuma longa</i>	63
III.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites	66
III.4.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i>	66
III.4.1.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	66
III.4.1.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)	67
III.4.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	70
III.4.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	70
III.4.2.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)	70
III.4.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles <i>Curcuma longa</i>	74
III.4.3.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	74
III.4.3.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)	74
III.5. Mesure du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites	77
III.5.1. Piégeage du radical DPPH [•]	78
III.5.2. Piégeage du radical ABTS [•]	82
III.5.3. Capacité antioxydante totale	84
III.5.4. Pouvoir réducteur du fer	87
III.5.5. Pouvoir chélateur du fer	89
III.5.6. Piégeage du radical hydroxyle	90
III.5.7. Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)	93
III.5.8. Liposomes	96
III.5.9. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène	99
III.5.10. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)	102
III.6. Pouvoir antiinflammatoire des huiles essentielles extraites	103
III.6.1. Pouvoir d'inhibition de la lipoxygénase	103
III.6.2. Pouvoir anti-acétylcholinestérase des huiles essentielles extraites	106
III.7. Pouvoir anti-diabétique des huiles essentielles extraites	110
III.7.1. Test de l'inhibition de l' α amylase	111
III.8. Observation sur l'activité antiproliférative des huiles essentielles de <i>T. ciliatus</i> et <i>A. verticillata</i> vis-à-vis de la lignée cellulaire THP-1	113
III.8.1. Activité Antiproliférative des huiles essentielles d' <i>Ammoides verticillata</i> .	113
III.8.2. Activité antiproliférative des huiles essentielles <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	113
Conclusion et perspectives	117
Références bibliographiques	120
Publication	146

Partie Bibliographique

Introduction

Introduction

Les aliments frais et/ou transformés peuvent être exposés à la contamination microbienne au cours de leur production, manipulation et leur distribution (Deak et Beuchat, 1996). Cette vulnérabilité des aliments vis-à-vis des altérations microbiennes a conduit les acteurs du secteur agro-alimentaire à faire usage, d'une manière quasi systématique, de produits chimiques de synthèse dont le grand public se méfie de plus en plus.

Cette méfiance est amplifiée chaque fois que l'on ne dispose pas d'assez d'informations ou de recul vis-à-vis d'un additif ou d'une substance chimique utilisé à cette fin. L'innocuité et l'efficacité absolues de telles substances sont une vérité relative.

Par ailleurs, le développement de l'antibiorésistance des microorganismes est un autre défi permanent qui préoccupe les spécialistes du secteur de la santé.

Depuis les crises subies par les filières bovines et avicoles, le consommateur a acquis une maturité et une prise de conscience sur la force de la liaison entre la qualité de son alimentation et sa santé, et il exige de plus en plus un produit d'une qualité sanitaire irréprochable.

Le stress oxydatif généré par l'activité radicalaire des produits de peroxydation lipidique constitue un facteur de risque important dans le développement des maladies dégénératives.

Le développement de nouveaux agents de lutte contre les germes d'altération des aliments, le stress oxydatif, ainsi que contre l'antibiorésistance des microorganismes responsables de toxico-infections revêt une importance capitale.

L'utilisation des plantes aromatiques remonte à des temps très lointains de l'histoire de l'humanité est une pratique antique. De nos jours, le recours à ce type de remède, qui est déjà très répandu en Afrique et chez certaines populations d'Amérique du Sud, est en nette recrudescence un peu partout dans le monde.

Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Krishnaiah *et al.*, 2011 ; Bakchiche *et al.*, 2013).

La biodiversité de la flore végétale est un argument majeur justifiant l'exploration de la composition des plantes et l'exploitation des propriétés biologiques des substances d'intérêt pharmaceutique, médicinal, agro-alimentaire, voire cosmétique, également, qu'elles recèlent.

L'utilisation accrue des huiles essentielles est liée à leur large spectre d'activités biologiques reconnues (Cimanga, 2002). Ainsi, les huiles essentielles et leurs composantes, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobienne, anti-fongique, anti-parasitaire et insecticide (Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008 ; Miguel, 2010) et pourraient donc servir d'agents de conservation des denrées alimentaires (Oussalah et al., 2007 ; Djenane et al., 2012).

La flore algérienne d'intérêt médicinal, pharmaceutique ou autre n'est pas très bien connue et inventoriée sur le plan botanique et, surtout, sur le plan de la composition chimique. Les propriétés biologiques de ses constituants ne sont, généralement, pas toutes bien élucidées.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de quelques espèces aromatiques et médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen ou encore pouvant y être introduites dans un objectif de développement durable, nous nous sommes proposés d'explorer les activités biologiques des huiles essentielles extraites de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*, *Ammoides verticillata* et des rhizomes de *Curcuma longa* commercialisées en Algérie.

Ce manuscrit comporte trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur les plantes médicinales, la classification des plantes étudiées et l'intérêt des huiles essentielles;
- Le second chapitre décrit la méthodologie utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, les dosages spectrophotométriques, les tests d'activité antioxydante, antimicrobienne, antiproliférative, anti-inflammatoire ; ainsi que pour l'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS);
- Le troisième chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats.

Chapitre I

Plantes médicinales et huiles essentielles

Chapitre I : Plantes médicinales et huiles essentielles

I.1. Les plantes médicinales

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit la médecine traditionnelle comme une médecine comprenant « diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie » (Robard, 2004).

L'utilisation par l'homme des plantes médicinales pour se soigner date de plusieurs millénaires. Elles représentent un aspect très important dans l'histoire de la médecine et ont énormément contribué à l'évolution de la médecine moderne (Telefo et al., 2012).

Les plantes médicinales sont donc les plantes qui auraient une activité pharmaceutique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain (Naghibi et al., 2005). Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection de boissons, soit nature ou en préparation galénique, soit encore sous forme de principes actifs, le tout pour l'obtention d'effets curatifs (Babulka, 2007).

Cependant, le potentiel des plantes comme sources pour la production de nouveaux médicaments est largement inexploité (Hamburger & Hostettmann, 1991) eu égard au nombre d'espèces de plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) sur la planète estimé à 250000 (Kong et al., 2003). En effet, sur ce nombre, seulement 6% ont été testés pour leur activité biologique et 15 % ont été évalués sur le plan phytochimique (Verpoorte, 2000).

Pour cette raison, l'intérêt pour la médecine traditionnelle est toujours croissant. Il en est de même pour l'expérimentation scientifique qui a pris un essor vertigineux et qui a permis d'isoler plusieurs substances d'origines naturelles et de leur trouver des vertus thérapeutiques. C'est le cas de l'Aspirine (acide acétyl salicylique) isolé initialement des feuilles et des écorces de *Salix alba* L. (Salicaceae) (Colegate & Molyneux, 1993), de la Galegine (agent antihyperglycémiant) isolé de *Galega officinalis* L. (Fabaceae). La Galegine a servi de modèle de synthèse de la Metmorfin et d'autres médicaments antidiabétiques (Sneider, 1985).

A l'heure actuelle, plusieurs chercheurs ont obtenu à partir des plantes médicinales, des substances nécessaires à la création de nouveaux médicaments. Parmi ces plantes, nous pouvons citer *Mansonia altissima* (Sterculaceae), dont la mansonine demeure le principal composé purifié pouvant être utilisé dans le traitement des affections cardiovasculaires (Guédé-Guina et al, 1992).

I.1.1. Les métabolites secondaires des plantes

Nous connaissons actuellement plus de 250000 espèces végétales. Celles-ci produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées comme les métabolites primaires et secondaires.

Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photoassimilats, qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base (Hopkins, 2003). Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Par opposition, les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures (Lucienne, 2010).

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple et sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique (Chaouche, 2014).

Ces métabolites sont retrouvés dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes sont:

- Les alcaloïdes, des molécules renferment un atome d'azote dans la structure. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine et la lupinine.

-Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C_5H_8) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci $(C_5H_8)_n$. En fonction du nombre n, on peut distinguer les monoterpènes (n = 2), les sesquiterpènes (n = 3), les diterpènes (n = 4), les sesterpènes (n = 5), les triterpènes (n = 6) et

les tétraterpènes ($n = 8$). Parmi les terpènes les plus importants, on trouve: l' α -pinène, le β -pinène, le δ -3-carène, le limonène, le carotène (Bruneton, 2009).

- Les composés phénoliques regroupent plusieurs classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Il existe de nombreuses classes de ces composés : acides phénols, flavonoïdes, coumarines et tanins. Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures.

D'un point de vue biosynthèse, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Bruneton, 2009).

I.1.2. Mode d'utilisation des plantes médicinales

Pour assurer l'action du médicament, il est nécessaire de traiter la plante, de la transformer pour en tirer la substance ayant une action spécifique. Etant donné la multiplicité des composants constituant les principes actifs de chaque plante et la spécificité d'action de chacun d'entre eux, il a été nécessaire d'élaborer des méthodologies diverses, qui permettent, selon le but recherché, leur extraction. Ces manipulations sont au nombre de quatre : la décoction, la macération, l'infusion et l'extraction des sucs (Chiej, 1982).

I.1.3. Récolte et conservation des plantes médicinales

Les propriétés pharmacologiques des plantes médicinales dépendent essentiellement de la région de production, de la période de récolte, des techniques de cueillette et des modalités de conservation (Tableau 1). La connaissance de ces conditions doit toujours être présente à l'esprit afin de garantir la qualité des produits et de protéger leur source de production. Par contre la négligence de ces données a contribué, pour beaucoup à faire tomber les plantes à plusieurs reprises, dans le discrédit (Valnet, 2001).

Tableau 1 : Récolte, séchage et conservation des plantes (Valnet, 2001).

Partie de la plante	Cueillette	Séchage	Conservation
Racines		à l'air sec	A l'abri de l'humidité
Racines charnues		à l'étuve	
Racines mucilagineuses		au four	
Racines vivaces	Au printemps		
Racines des plantes annuelles et bisannuelles	En automne		
Ecorce des plantes annuelles et bisannuelles	Quand il a acquis une certaine épaisseur et se sépare facilement du corps	Au soleil ou à l'étuve	
Ecorce d'arbre	En hiver		
Ecorce d'arbrisseau	En automne		
Ecorce de résineux	En printemps		
Bois			
Fleurs	Au début de leur épanouissement Les fleurs de rose se cueillent en boutons	A l'ombre et à atmosphère sèche	
Feuilles	Avant la floraison		
Semences	Quand la plante se dessèche		
Tiges	En même temps que les feuilles	Au soleil ou dans une serre à 30-35°C	
Feuilles épaisses			
Bourgeons	Au début du printemps		
Fruits	Un peu avant complète maturité		

I.1.4. Plantes étudiées

Dans le but de la recherche de plantes dotées de propriétés biologiques intéressantes, il est préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de les circonscrire selon divers critères fiables. Parmi ces derniers, le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones. Pour cela, trois plantes, à savoir *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus*, *Ammoides verticillata* et *Curcuma longa*, ont été choisies.

I.1.4.1. *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* Maire

I.1.4.1.1. Présentation de la plante

Le mot «thym» provient du terme grec «Thymos» qui signifie «odeur». Son parfum est agréable, fort, frais et balsamique. Les philosophes de la Rome Antique avaient coutume de boire une infusion de thym avant de commencer à travailler car en tant que stimulant, il agit à la fois au niveau de la psyché, éveillant l'intelligence, et améliorant la mémoire et la capacité de concentration, en cas de fatigue mentale, de stress, de surmenage et au niveau physique, activant la circulation artérielle, augmentant la tension, tonifiant le foie, améliorant la digestion, renforçant les défenses immunitaires (Padrini & Lucheroni, 1996).

Le thym est largement utilisé en qualité de plante aromatique dans les préparations culinaires tels que les soupes, les sauces et les viandes (Reddy et al., 1998) et en particulier dans la cuisine méditerranéenne (Richard et al., 1985).

Noms vernaculaire

Plusieurs appellations de *Thymus ciliatus* ont été reportées dans la littérature (Tableau 2).

Tableau 2: Les différentes appellations de *Thymus ciliatus*.

Nom Français	Thym (Trabut, 1935).
Nom arabe	Zaitra (Quezel & Santa, 1963). Zaateur (Trabut, 1935).
Nom berbère	Djertil (Trabut, 1935 ; Quezel & Santa, 1963).

I.1.4.1.2. Description botanique

Habituellement, les plantes de la famille des Lamiacées sont annuelles ou vivaces quoique les arbrisseaux et les plants à troncs soient aussi représentés. Elles possèdent des tiges quadrangulaires et des feuilles généralement opposées (Quezel et Santa, 1963). On estime aux alentours de 200 genres et 5600 espèces. L'odeur aromatique est généralement présente et caractéristique à la famille (Glimn-Lacy & Kaufman, 2006).

Le genre *Thymus* regroupe aux alentours de 215 espèces entre herbacées et sub-arbrisseaux (De Lisi et al., 2011), La région de la Méditerranée peut être décrite comme le centre de ce genre (El Ajjouri et al., 2008 ; Amarti et al., 2011). Ce genre est représenté par onze espèces dans la flore d'Algérie (Hazzit et al., 2009).

a. Caractères botaniques

Selon Amarti et al. (2010), *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol (Fig. 1) ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocaillieux et bien drainés. Cette espèce est endémique au nord d'Afrique (Bousmaha-Marroki et al., 2007) comme elle est adaptée aux périodes chaudes et sèches (Stahl-Biskup & Saez, 2002).

Quezel & Santa (1963) ont mentionné que cette espèce regroupe trois sous espèces : *eu-ciliatus* Maire, *coloratus* (Boiss. et Reut) Batt. et *mumbyanus* (Boiss. et Reut) Batt.



Figure 1: *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. de la région de Tlemcen (photo originale).

b. Systématique de *Thymus ciliatus*

Selon [Quezel & Santa \(1963\)](#), la classification qu'occupe *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* dans la systématique est la suivante:

Embranchement.....	Phanérogames
Sous Embranchement.....	Angiospermes
Classe.....	Eudicots
Sous Classe.....	Astéridées
Ordre.....	Lamiales
Famille.....	Lamiacées
Genre.....	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus ciliatus</i>
Sous espèce.....	<i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Bois et Reut.) Batt.

Une légère modification a été enregistrée dans la nouvelle classification mentionnée par [Dobignard & Chatelain \(2012\)](#) :

Embranchement	Tracheophyte
Sous Embranchement	Spermatophyte
Classe	Magnoliopside
Sous classe	Asteridées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i> L.
Espèce	<i>Thymus munbyanus</i> Boiss. & Reut.
Sous-espèce	<i>Thymus munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i> (Desf.) Greuter & Burdet

I.1.4.1.3. Utilisations médicinales

Le genre *Thymus* englobe de nombreuses espèces et variétés et la composition chimique des huiles essentielles de plusieurs espèces de ce genre a été fortement étudiée ([Zouari et al., 2011](#) ; [Albayrak et Aksoy, 2013](#) ; [El Abed et al., 2014](#)). Les huiles essentielles de plusieurs espèces de thym ont déjà prouvé leurs efficacités biologiques ([Tepe et al., 2011](#) ; [Costa et al., 2012](#) ; [Giweli et al., 2013](#) ; [Hyun et al., 2014](#)) A part quelques rare études ([Hazzit, et al., 2006](#) ; [Bousmaha-Marroki et al., 2007](#) ; [Giordani et al., 2008](#) ; [Amarti et al., 2010](#) ; [Khadir et](#)

al., 2013), les informations scientifiques sur le potentiel de *Thymus ciliatus* comme agent antimicrobien sont rares et beaucoup plus rares sont celles des activités antioxydant et antiprolifératif comparé aux autres espèces de thym. Selon Bousmaha-Marroki *et al.* (2007) cette plante est largement utilisée traditionnellement pour ses effets anti-spasmodiques, diaphorétiques et stimulants.

I.1.4.2. *Ammoïdes verticillata*

I.1.4.2.1. Présentation de la plante

L'appellation d'*Ammoïdes verticillata* dans notre pays est Nounkha ou Nûnkha tirée du nom Perse «Nankhah». En perse, «Nan» et « Khah » signifient respectivement pain et goût parce qu'en Iran cette plante est utilisée, comme aromate dans le pain (Baytop & Siltlipinar, 1986).

La saveur de cette plante est fortement aromatique et piquante. Son odeur agréable, diffusible, intense et balsamique est persistante même après dessiccation. Les graines de cette plante sont très utilisées dans les préparations culinaires (pain, rôti, légumes, soupes) grâce à leurs arômes forts (Abdelouahid & bekhechi 2002). Par ailleurs, elles rendent plus digestes les légumineuses, les haricots secs et les lentilles. Elles sont souvent mélangées à d'autres épices pour atténuer leur saveur amère (Boulos, 1983). En Algérie, cette plante jouit d'une grande faveur populaire. En effet, elle est particulièrement très utilisée dans la préparation de la soupe d'escargot (Kambouche & E1-Abed 2003). Cette plante a également un pouvoir antioxydant et est recommandée comme une source potentielle d'antioxydant naturel (Mehta *et al.*, 1994 ; Mehta & Zayas, 1995).

Noms vernaculaire

Cette espèce est surtout connue dans le monde sous les noms mentionnés dans le [tableau 3](#).

Tableau 3: Les différentes appellations d'*Ammoïdes verticillata*.

Nom Français	Ajowan (Bekhechi <i>et al.</i> , 2010)
Nom arabe	Taleb El Koubs (Narayana <i>et al.</i> , 1967) Nounkha, Nûnkha (Trabut, 1935 ; Abdelouahid <i>et bekhechi</i> 2002)

I.1.4.2.2. Description botanique

a. Caractères botaniques

Le genre *Ammoïdes* appartient à la famille des Apiacées. Elle pousse spontanément en Egypte et en Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Iran et Pakistan). Cependant, les principaux pays cultivateurs sont l'Egypte, l'Iran et surtout l'Inde (Khajeh et al., 2004 ; Bekhechi et al., 2010).

Ce genre regroupe 2 espèces qui sont: *Ammoïdes verticillata* (Desf.) Briq. et *Ammoïdes atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf.

Selon Quezel & Santa (1963), cette espèce végétale qui pousse spontanément est annuelle, à souche filiforme, à tiges ramifiées de 10 – 40 cm, sans rosette de feuilles basales. Feuilles inférieures pétiolées sont à nombreux segments multifides verticillés, les supérieures pennatifides sont à segments linéaires. Les ombelles principales sont à 8 - 15 rayons. Fruit ovoïde est de moins de 1 mm de long (Fig. 2). On la trouve généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes et les forêts.

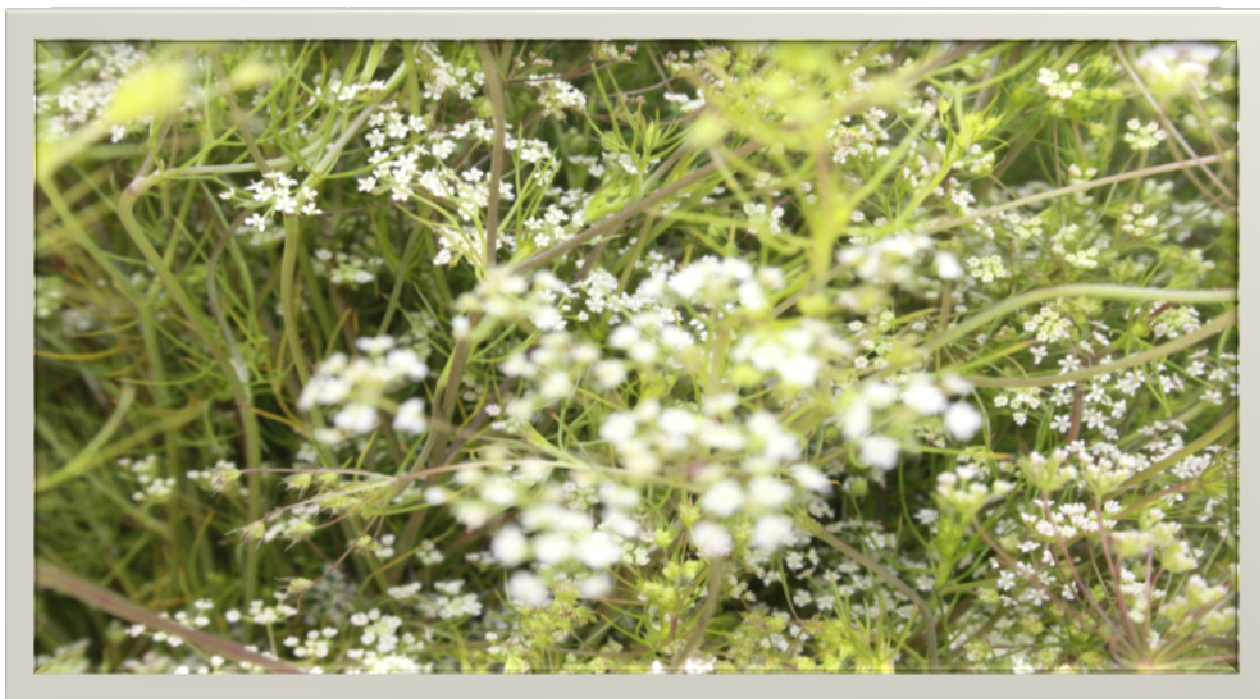


Figure 2: *Ammoïdes verticillata* « photo originale »

b. Systématique d'*Ammoïdes verticillata*

Selon Bekhechi et al., (2010) *A. verticillata* (Desf.) Briq. est botaniquement connu sous plusieurs synonymes : *A. pusilla* (Brot.) Breistr.; *Carum ammoïdes* (L.) Ball; *C. copticum* (L.) Benth.

& Hook.; *Petroselinum ammoïdes* (W. D. J. Koch) Rchb.f.; *Ptychotis ammoïdes* (L.) Koch; *Ptychotis verticillata* Desf. ex. Duby; *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex. Turrill.; et *T. copticum* (L.) Link.

Selon la clé de détermination botanique de [Quezel & Santa \(1963\)](#), *Ammoïdes* (ou *Ptychotis*) *verticillata* est classée comme suit :

Embranchement Phanérogames ou Spermaphytes
 Sous-embranchement Angiospermes
 Classe Eudicots
 Sous-classe Astéridées
 Ordre Apiales
 Famille Apiacées
 Genre Ammoïdes Adanson (ou Ptychotis Koch)
 Espèce *Ammoïdes* (ou *Ptychotis*) *verticillata* (Desf.) Briq.

Dans la systématique portée par [Dobignard & Chatelain \(2011\)](#) la modification a été enregistrée uniquement au niveau de l'espèce comme elle apparait comme suit :

Embranchement Tracheophyte
 Sous Embranchement Spermatophyte
 Classe Magnoliopside
 Sous classe Asteridées
 Ordre Apiales
 Famille Apiaceae Lindl.
 Genre Ammoides Adans.
 Espèce *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr.

I.1.4.2.3. Utilisations médicinales d'*Ammoides verticillata*

Ammoides verticillata est une plante qui possède de nombreuses et précieuses propriétés médicinales ([Ambasta et al., 1986](#)). Elle est considérée surtout comme une panacée ([Kambouche et al., 2003](#)). En effet, c'est une espèce aromatique utilisée comme fébrifuge ([Ziyyat et al. 1997](#)), conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension ([Aftab et al., 1995](#) ; [Ziyyat et al., 1997](#)), le diabète ([Ziyyat et al., 1997](#) ; [Bnouham et al., 2007](#) ; [Bnouham et al., 2010](#)). Cette plante possède également des propriétés antiallergique, anthelminthique, antivirale ([Grosjean, 2004](#)), antibactérienne, antifongique

(Abdelouahid & Bekhechi, 2002 ; Laouer et al., 2003 ; Laouer et al., 2008) et hypocholestérolémiante (Agrawala & Pant, 1986).

Elle a également un effet expectorant (Ambasta et al., 1986), antalgique (Grosjean, 2004), carminatif, digestif (Baba Aissa, 1999; Schirner, 2004) et diurétique (Boskabady & Shaikhi, 2000 ; Felidj et al., 2010). Elle est utilisée comme apéritif, emménagogue (Baba Aissa, 1999) et dans le traitement du vitiligo en Egypte (Belekhdar, 1997). En outre, Les graines d'*Ammoïdes verticillata* sont utilisées communément comme remède en cas de colique, de diarrhée, de dyspepsie, de complications hépato-biliaires de choléra, d'asthme et de troubles intestinaux (Schirner, 2004) de vomissements, de troubles du tractus urinaire, dans la dilatation des bronches et conseillée comme analgésique (Boskabady & Shaikhi, 2000).

Cette plante est utilisée comme compresse soit seule soit imbibée d'alcool ou d'acide acétique et mélangée avec le henné pour guérir les enfants débiles mentales (Laouer et al., 2003).

Une enquête thérapeutique a été réalisée par Bekhechi (2009), auprès des herboristes et des gens de la campagne de la région de Tlemcen. Les informations recueillis ont montré que cette plante est utilisée dans un cadre culinaires et surtout thérapeutiques (Tableau 4).

I.1.4.3. *Curcuma longa*

I.1.4.3.1. Présentation de la plante

Originaire d'Inde et d'Asie du Sud, le curcuma est cultivé dans toute l'Asie du Sud-Est. On le multiplie par bouturage de la racine sur des sols bien drainés et sous un climat humide (Iserin, 2001).

Ces plantes portent de larges feuilles lancéolées ressemblant aux cannas, pouvant former de grosses touffes d'environ 1 m de hauteur, qui dépérissent généralement pendant la saison sèche tropicale et exhibent de courts épis dressés de petites fleurs aux couleurs souvent éclatantes, ou jaune pâle (Loap, 2008).

Noms vernaculaire

Le tableau 5 indique les différentes appellations dans le monde de *Curcuma longa*.

Tableau 4 : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur *Ammoides verticillata* (Bekhechi, 2009)

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
Plante entière	Fièvre Rhumes grippes Maladies broncho-pulmonaires	Bouillir de l'eau avec la plante, mettre une serviette sur la tête, et inhaler les vapeurs dégagées. Ensuite, boire une tasse de cette décoction filtrée avant de se coucher.
	Fièvre typhoïde Antipyrétique Dépuratif Antispasmodique Affections rénales	Décoction ou infusion
	Règles douloureuses	Infusion
	Régulateur dermique	Décoction
	Asthme Douleurs gastriques Parasites intestinaux	Mélanger la plante lavée, séchée et broyée avec du miel. Prendre 1 à 2 cuillerées par jour.
	Céphalée migraines	Décoction ou infusion avec un citron. Boire une tasse le soir avant de se coucher.
	Sinusite	Mettre la plante dans de l'eau bouillante, laisser infuser, ensuite mélanger avec du henné et mettre sur les endroits atteints (Sinus osseux de la face).
	Rafraîchissante	Faire une décoction avec une tranche de citron, laisser refroidie puis mettre au réfrigérateur (boire comme une boisson rafraîchissante).
Feuilles et fleurs	Condiment culinaire	Ajouter ces parties de la plante broyées dans des soupes ex: soupe d'escargot. Conserve plus longtemps les aliments et empêche la formation des moisissures, ex : les olives.
Feuilles	Irritations dermiques Abscesses --furoncle	Faire bouillir dans très peu d'eau, une poignée de feuilles fraîches. Lorsque le liquide est presque complètement évaporé, mettre les feuilles cuites sur une serviette et les écraser pour en supprimer le suc. Laisser refroidir le cataplasme, puis l'appliquer sur la partie atteinte.
Racines	Diarrhée	Faire bouillir pendant 20 minutes dans un litre d'eau des racines séchées au soleil. Filtrer la décoction, la sucrer avec un peu de miel et la boire en trois fois au cours de la journée.
	Diurétique	Mettre dans un litre d'eau bouillante des racines. Filtrer, quand l'infusion est devenue tiède, sucrer avec un peu de miel. Consommer le tout dans la journée.

Tableau 5 : Les différentes appellations de *Curcuma longa*

Nom Français	Curcuma, Safran des Indes, (Loap, 2008 ; Iserin, 2001) souchet de Babylone, terre-mérite (Loap, 2008)
Nom Anglais	Turmeric (Sharma et al., 2005 ; Ravindran et al., 2007)
Nom arabe	Kurkum (Loap, 2008)
Nom berbère	Zarounbad (Trabut, 1935)

I.1.4.3.2. Description botanique

a. Caractères botaniques

Curcuma longa est une plante vivace atteignant un mètre, pérenne par son rhizome (fig. 3A). Les rhizomes principaux de forme ovoïde fournissent le *Curcuma* rond et les secondaires le *Curcuma* long. Épais, écailleux, se ridant par dessiccation, ces rhizomes sont d'une couleur jaune orangé en section, gris brunâtre en surface. Une odeur aromatique se dégage après section du rhizome (Delaveau, 1987).

Ses feuilles, très longues, oblongues à elliptique, engainantes, possèdent une puissante nervure axiale et des nervures secondaires parallèles (Boullard, 2001). Les gaines des feuilles forment une pseudo-tige courte, les limbes sont vert foncé au-dessus, vert très clair en dessous, criblés de points translucides (fig. 3B).

Au sein des feuilles s'élève l'inflorescence constituée d'un épi cylindrique atteignant 20 cm de long. Celui-ci est formé de bractées imbriquées vert foncé et stériles, à l'aisselle desquelles naissent les fleurs blanches ou jaunâtre, une pour chaque bractée. Seules les bractées sommitales, roses, sont de plus bel effet (fig. 3A) (Boullard, 2001).

Les fleurs possèdent :

- un calice tubulaire, court, présentant 3 dents inégales ;
- une corolle tubulaire à sa base, puis divisée en 3 lobes jaunes inégaux ;
- des étamines dont une seule fertile, bifide, l'anthère présentant un large éperon courbé à la base ;
- un ovaire infère, triloculaire, surmonté d'un style terminé par un stigmate simple et en crochet (fig. 3B) (Hombourger, 2010).

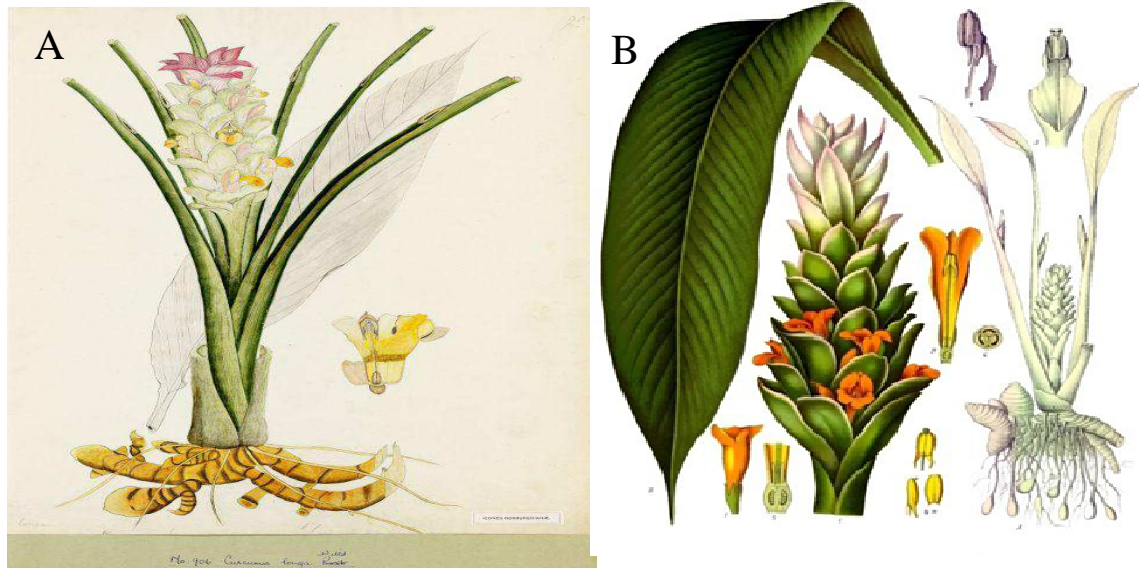


Figure 3 : Dessin représentant la plante entière (A) et les différentes parties (B) de *Curcuma longa* (Hombourger, 2010).

b. Systématique de *Curcuma longa*

Selon l’Euro+Med (2006), *Curcuma longa* peut être classé comme suit :

- Règne Planta.
- Embranchement Magnoliophyta.
- Classe Liliopsida
- Ordre Zingibérales.
- Famille Zingibéracée.
- Genre Curcuma.
- Espèce *Curcuma longa*

I.1.4.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Le *Curcuma* était très estimé des anciens indo-européens pour la teinture d'un beau jaune doré qu'on en tirait. Toutefois, son importance pour l'être humain s'est vraiment révélée lorsqu'on a découvert, il y a longtemps, qu'ajouté aux aliments le rhizome réduit en poudre permettait d'en conserver la fraîcheur, la sapidité et la valeur nutritive et comme un bon additif alimentaire. C'est précisément ce pouvoir, qu'on lui attribuait jadis de préserver la fraîcheur des aliments, qui sert aujourd'hui de modèle pour l'étude de ses applications possibles dans le domaine des soins de santé (Loap, 2008).

La médecine traditionnelle représente un terrain fertile et une source d'exploration de nouveaux médicaments. La curcumine est, de cette catégorie, un colorant naturel jaune obtenu du rhizome du safran des Indes «*Curcuma longa* Linn» (Bharat et al., 2008 ; Song et al., 2009). Elle a été longtemps considérée, dans le monde entier, comme une substance alimentaire fonctionnelle en raison de ses propriétés sanitaires (Almedia et al., 2005).

Outre son utilisation dans la cuisine Indienne en tant qu'un colorant alimentaire et conservateur, le *Curcuma* est utilisé en médecine ayurvédique pour traiter de nombreuses affections (Bharat et al., 2008), vu sa richesse en composés phénoliques à savoir les monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et les curcuminoïdes (Tang & Eisenbrand, 1992), le *Curcuma* peut être utilisé aussi pour le traitement des otites chroniques, contre les manifestations allergiques et contre les manifestations inflammatoires (Portes, 2008) ; les troubles digestifs et les flatulences (Singh, 2007) : antiémétiques, antiulcéreux, antispasmodiques et antidispeptiques (Hurtel, 2007) ; les affections broncho-pulmonaires : antiasthmatiques, antitussifs et expectorants (Hurtel, 2007) ; les troubles génitaux féminins, comme «régulateur» : antiabortif, emménagogue et régulateur de la menstruation (Hurtel, 2007) ; les maux de tête et rhumes (Wichtl & Anton, 2003) ; les infections des yeux, de la peau, l'arthrite, acnés, entorses, blessures, jaunisse et autres (Singh, 2007) ; en tant que cicatrisant dont il accélère significativement la guérison des blessures et renforce la cicatrisation des plaies chez les diabétiques (Ghanbari et al., 2008).

De plus, il a été démontré que les composants de *Curcuma longa* Linn ont des activités fongicides (Kim et al., 2003), insecticides (Chander et al., 1991; 1992), répulsives et antiseptiques (Jilani & saxena, 1990) ainsi qu'un insecticide (Chowdhury et al., 2000).

I.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles, exemple : Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, etc. (Bruneton, 1999).

I.2.1. Localisation des huiles essentielles

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles dans l'organisme végétal (Guignard *et al.*, 1985). Par contre, la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (Garneau, 2004). On les trouve dans les écorces (Cannelier), les racines (Vétiver), les rhizomes (Gingembre, Curcuma), les fruits (Anis, Fenouil, Badiane), le bois (Camphrier), les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus), les graines (Muscade) et les boutons floraux (clou de Girofle) (Belaiche, 1979; Paris & Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999).

Les structures anatomiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des huiles essentielles sont très diverses: poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou poches sécrétrices schizolyziques (Aurantiacées), des canaux sécréteurs (Conifères et Apiacées), poils sécréteurs (Lamiacées et Astéracées), et cellules sécrétrices isolées (Lauracées, Magnoliacées et Pipéracées) (Bruneton, 1999; Ghestem *et al.*, 2001 ; Combrinck *et al.*, 2007 ; Karray-Bouraoui *et al.*, 2009) (Fig. 4). Cette huile essentielle doit être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue dont la quantité et la qualité diffèrent, pour cela il est nécessaire de spécifier le nom de la partie utilisée (Bruneton, 1999 ; Perry *et al.*, 1999 ; Barry, 2001).

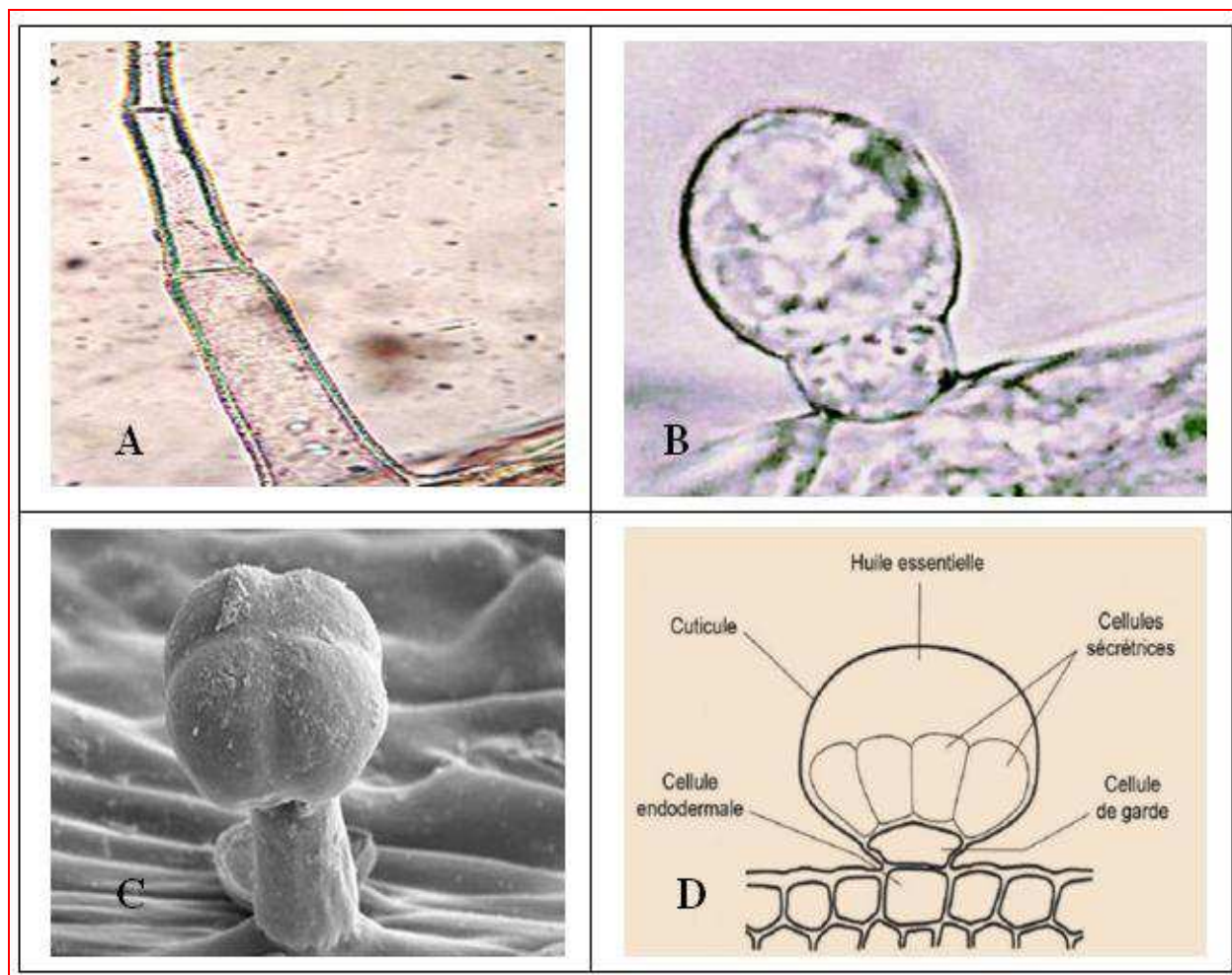


Figure 4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* (Combrinck et al., 2007 ; Karray-Bouraoui et al., 2009).

I.2.2. Facteurs de variabilités des huiles essentielles

Une huile essentielle reste modulable en fonction des besoins particuliers de la plante. Sa composition donc n'est pas statique (Bruneton, 1987 ; Perry et al., 1999).

L'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité (Boira et Blanquer, 1998; Palà-paul et al., 2001), la durée totale d'insolation, le régime de vents (Bruneton, 1999), l'altitude, latitude (Azevedo et al., 2001; Oliveira et al., 2005) et la nature du sol (Oliveira et al., 2005; Peng & Yang, 2005; Zheljaskov et al., 2005) sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles a été décrite.

Certains auteurs ont étudiés d'autres facteurs tels que le cycle végétatif (Juteau et al., 2002; Schwob et al., 2004; Yayi et al., 2004; Jordan et al., 2006; Sefidkon et al., 2007), l'âge

et l'organe végétal (Skoula *et al.*, 1996; Silvestre *et al.*, 1997; Mockute & Judzentiene, 2003; Laouer, 2004), la période de récolte (Angelopoulou *et al.*, 2002; Cavaleiro *et al.*, 2003; Madeira *et al.*, 2005; Randrianalijaona *et al.*, 2005), les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Smallfield, 2001) et ont trouvés qu'ils ont une influence sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.

La composition chimique des huiles essentielles de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera ; ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes, types biogénétiques, races chimiques ou races biologiques. Biochimiquement différent, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes mais aussi des toxicités très variables (Baudoux, 1997). La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles (Laouer, 2004).

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (khajeh *et al.*, 2004 et 2005; Viljoen *et al.*, 2006; Sefidkon *et al.*, 2007). D'un autre côté, la durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition (Yayi *et al.*, 2004).

Les conditions principales requises pour une production rentable en huile essentielle sont : un bon matériel végétal, la variété de la plante, le sol, l'équipement de distillation et le climat (Smallfield, 2001).

I.2.3. Rôles des huiles essentielles dans la plante

Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation ou bien pour repousser d'autres nuisibles. Ils affirment aussi que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement (Bruneton, 1999; Guignard, 2000 ; Miguel, 2010).

Belaiche (1979) signale que l'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques est liée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. Les vapeurs aromatiques permettent de saturer l'air autour de la plante empêchant, le jour, la température

de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive.

D'un autre côté, les essences pourraient constituer un important support dans la communication allélopatique avec les autres plantes et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de messages biologiques sélectifs (Bruneton, 1999 ; Ibrahim & al., 2001 ; Bakkali et al., 2008).

En plus, les huiles essentielles agissent comme agents antibactériens, antiviraux, antifongiques, herbicides en plus elles peuvent moduler le comportement alimentaire des herbivores en réduisant leurs appétits vis-à-vis de ces plantes (Bakkali et al., 2008).

Tandis que Guignard et al. (1985) considèrent les huiles essentielles comme une source énergétique par une mise en réserve durant le jour pour être dégradés durant la nuit en Acétyl-coenzyme A.

I.2.4. Activités biologiques des huiles essentielles

La détection des propriétés biologiques nécessaire pour la survie des plantes est la base dans la recherche de propriétés biologiques similaires pour faire face aux différents dérèglements de l'organisme humain et animale (Miguel, 2010).

I.2.4.1. Activité antimicrobienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Guinoiseau, 2010). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba & Kunicka, 2003).

Plusieurs théories sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel les huiles essentielles exercent leur activité antimicrobienne. La composition complexe des huiles essentielles tend à prouver que cette activité serait due à plusieurs mécanismes d'action différents, liés à la nature chimique de ces composés (Skandamis et al., 2001; Carson et al., 2002 ; Burt, 2004).

La plupart des mécanismes d'action sont attribués à l'interaction des composants des huiles essentielles avec la membrane cellulaire (Benchaar *et al.*, 2008). Les huiles essentielles sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaires des substances nutritives (Sikkema *et al.*, 1994 ; Ultee *et al.*, 1999). Les huiles essentielles peuvent aussi perturber le gradient ionique de la membrane cytoplasmique ce qui diminue la stabilité membranaire et perturbe aussi le transport membranaire. Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance peut être ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe (Griffin *et al.*, 1999 ; Ultee *et al.*, 1999 ; Cox *et al.*, 2001). Un mécanisme d'action proposé par Ultee *et al.*, (2002) implique le groupement hydroxyle des phénols, comme le carvacrol, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes.

D'autres mécanismes d'action sont liés à la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines (Gustafson & Bowen, 1997). Les huiles essentielles extraites de cannelle et de l'ail peuvent inhiber l'activité enzymatique des bactéries du rumen telle l'espèce *Enterobacter aerogenes*. D'autres huiles essentielles inhibent la croissance microbienne par l'inactivation des acides nucléiques (Calsamiglia *et al.*, 2007).

L'action des huiles essentielles dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des huiles essentielles, par rapport aux bactéries à Gram négatif (Burt, 2004). Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes (Calsamiglia *et al.*, 2007). Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière (Ultee *et al.*, 2002). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan *et al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman & Deans, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de

genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (May *et al.*, 2000 ;Tohidpour *et al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (Fisher et Phillips, 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* (Shin & Kim, 2005).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé ont été décrites par Burt (2004). L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (Barel *et al.*, 1991), *A. setacea*, *A. teretifolia* (Unlu *et al.*, 2002) et *A. millefolium* (Candan *et al.*, 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

I.2.4.1. Activité antioxydante

Un antioxydant est un réducteur, mais un réducteur n'est pas nécessairement un antioxydant. Les antioxydants peuvent être définis comme étant des substances qui, présentes à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat par la libération d'un ou plusieurs électrons (Prior *et al.*, 1999 ; Moon & Shibamoto 2009).

Les antioxydants exercent leur protection à différents stades d'oxydation et par l'intermédiaire de mécanismes différents. Une distinction doit être prévue entre une courte et une longue protection de l'antioxydant par rapport à la cinétique de réaction (Antolovich *et al.*, 2002).

L'activité des antioxydants dépend non seulement de leurs caractéristiques structurales, comme leurs réactivités chimiques envers les peroxyils et autres composés actifs, mais aussi par plusieurs autres facteurs, comme leurs concentrations, la température, l'obscurité, type de substrat, l'état physique du système et également sur les micro-composés agissant comme pro-oxydant ou synergétique (Gulcin, 2012).

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation. C'est le cas par exemple de la cystéine et la Coenzyme Q10 (Pokorny *et al.*, 2001).

Dans le cadre des aliments, les antioxydants peuvent être définis comme étant toutes substances capables de retarder ou prévenir le développement du rancissement ou autres détériorations de la flaveur dans les aliments dues à l'oxydation. L'addition des antioxydants retarde la dégradation de la flaveur par prorogatif de la période d'induction. Pour cette raison l'addition de ces antioxydants après la fin de cette période d'altération est inefficace pour retarder le développement de dégradation (Gulcin *et al.*, 2008).

Il y a actuellement, un regain d'intérêt pour les composés phytochimiques comme sources d'antioxydants naturels. L'objectif est de les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques afin de remplacer les antioxydants de synthèse, qui sont la cause de risques potentiels pour la santé vu leurs effets carcinogènes ou mutagènes (Le Cren, 2004). De plus, ils sont moins bien absorbés par notre corps que ceux de sources naturelles (Pelli *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont prouvé que de nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir antioxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006).

I.2.4.1. Autres activités biologiques

En plus de l'activité antimicrobienne et antioxydante les huiles essentielles peuvent exercer d'autres effets bénéfiques.

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), en 2007, Dordevic *et al.* ont prouvé l'efficacité de l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat.

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek *et al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa *et al.*, 2004). Dans une étude faite en 2007, Legault & Pichette ont trouvé une augmentation d'efficacité de α -humulène, isocaryophyllène et paclitaxel associées à la β -caryophyllène (un sesquiterpène retrouvé dans les huiles essentielles de plusieurs plantes) vis-à-vis de cellules cancéreuse humaines.

En étudiant l'effet des huiles essentielles de *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud) sur 12 lignées de cellules cancéreuses humaines, [Sharma et al. \(2009\)](#) ont obtenu des résultats intéressants quelque soit *In vitro* ou sur des souris.

D'autres applications médicales sont étudiées dont parmi celle de [Jafri et al., \(2001\)](#) qui ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol ([Monti et al., 2002](#)). Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement ([Umezu, 1999](#)) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine ([Zhao et al., 2005](#)).

Partie Expérimentale

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Choix des plantes

Les plantes étudiées ont été choisies essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi grâce à l'enquête ethno-pharmacologique effectuée au cours de cette étude auprès des tradi-thérapeutes, des herboristes et des personnes utilisant ou vendant les plantes médicinales.

II.1.2. Collecte du matériel végétal

A part *Curcuma longa*, les plantes de différentes provenances ont été collectées dans leurs habitats naturels, durant les mois de Mai-Juin de l'année 2010. Les parties des plantes étudiées et les sites de récolte sont représentés dans le [tableau 6](#).

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

Tableau 6 : Paramètres géographiques et bioclimatiques des sites de collecte des plantes

Plantes	Sites de Collecte	Période de récolte	Parties étudiées	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>A. verticillata</i>	Zedigua (Tlemcen)	Mai - Juin 2010	- Parties aériennes*	1°10'46" O	34°57'59" N	690	Subhumide froid
<i>T. ciliatus</i>	Henaya (Tlemcen)	Mai - Juin 2010	- Parties aériennes*	1°24'31" O	33°54'35" N	539	Subhumide froid
<i>C. longa</i>	commerce (Tlemcen)	Mai 2010	Rhizome	-	-	-	-

Parties aériennes* : Tige, feuille et fleur. N: Nord, O: Ouest, E: Est

II.1.3. Procédés d'extraction et conservation des huiles essentielles.

La distillation reste la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés aromatiques très volatils qui sont facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse. (Bendjilali, 2004). Plusieurs paramètres tels que l'état et la quantité du matériel végétal, la nature du solvant et la quantité d'eau utilisés, la durée de l'extraction, influent sur le

rendement. Il a été vérifié que le rendement diminue fortement d'une part, quand la charge du matériel végétal augmente, et d'autre part, quand une quantité d'eau trop importante est utilisée. La quantité d'eau optimale a été estimée au 1/10^{ème} (p/v) de la quantité de la plante par rapport à l'eau (Boutedjiret, 1990).

- Principe de l'hydro-distillation

Selon les recommandations de Bagard (2008), le principe de l'hydro-distillation est le suivant :

- La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition.
- La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne de distillation, passe dans le réfrigérant pour se condenser et donner le distillat qui comporte deux phases liquides séparables par décantation.

Technique

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger conformément à la méthode recommandée par la pharmacopée européenne (Council of Europe, 1996). La distillation a consisté à porter à ébullition l'extrait de plantes, pendant 3h jusqu'à l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur. Par la suite, les vapeurs chargées d'huile; en traversant un réfrigérant se condensent dans une burette graduée (Fig. 5). Afin d'éliminer toute trace d'eau, nous avons utilisé du sulfate de sodium (Na₂SO₄).



Figure 5 : Montage d'hydrodistillation (photo originale)

II.1.4. Détermination du rendement en huiles essentielles

Après chaque extraction, nous avons déterminé le rendement (R^{mt}) en huile essentielle qui est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse végétale sèche traitée (Carré, 1953) :

$$R^{mt} = P_1 \cdot 100 / P_0$$

R^{mt} : rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage (% p/p) ;

P_1 : poids en (g) d'HE ;

P_0 : poids en (g) de la matière végétale sèche traitée ;

II.1.5. Conservation des huiles essentielles

Pour éviter tout risque de dégradation de l'huile essentielle due à l'action de l'air et de la lumière, nos échantillons étaient conservés au réfrigérateur (4-6°C) dans des flacons bruns bien fermés.

II.2. Analyse des huiles essentielles

II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

- Principe

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino *et al.*, 1995). C'est la technique de séparation la plus utilisée car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. La séparation a lieu dans des colonnes capillaires qui possèdent un fort pouvoir résolutif parfaitement adaptée aux mélanges complexes volatils.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts IK) ou en programmation de température (indices de rétention, Ir). Cependant, la comparaison des indices de rétention avec ceux de la littérature ne suffit pas à identifier formellement un composé. Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés de séparation et d'identification des composés volatils (Arpino *et al.*, 1995). Actuellement, la CPG est la technique la plus adaptée pour l'analyse des huiles essentielles compte tenu de la volatilité de leurs constituants (Bruneton, 1999).

- Conditions opératoires

L'analyse chromatographique a été effectuée suivant le protocole décrit par Dandlen *et al.* (2010).

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer, Autosystem XL (Shelton, CT, USA), système de manipulation des données équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FIDs), d'un injecteur vaporisateur, de deux colonnes capillaires de dimensions 30m x 0.25 mm :

- Une colonne DB-1 silice fondue (épaisseur du film: 0.25 μm ; J&W Scientific, Rancho Cordova, CA, USA)

- Une colonne DB-17HT silice fondue (épaisseur du film: 0.15 μm ; J&W Scientific, Rancho Cordova, CA, USA) ;

- Le gaz vecteur est l'hydrogène ajusté à une vitesse linéaire de 30cm/s.

- La température de l'injecteur est de 280°C, celle du détecteur est de 300°C.

- La température linéaire est programmée depuis 45°C jusqu'à 175°C, à raison de 3°C/min, ensuite de 15°C/min jusqu'à 300°C, suivie d'un palier de 10 min à 300°C.

- Injection automatique : 0.1µL de la solution huile-pentane en mode Split (avec un rapport de 1/50).

II.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Pour l'analyse des huiles essentielles, le spectromètre de masse fonctionne selon deux méthodes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, deux modes sont distingués : L'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN) (De Hoffman *et al.*, 1999).

- Conditions opératoires

Les huiles essentielles sont analysées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL (Shelton, CT, USA), doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue, BP-1 (polydiméthyl-siloxane, de dimension 30 m x 0.25 mm, épaisseur du film 0.25 µm) couplé à un détecteur de masse turbomass (logiciel v. 4.1, Perkin-Elmer).

Le gaz vecteur est l'hélium ajusté à une vitesse linéaire de 30cm/s et avec un rapport de 1 : 40.

- La température linéaire est programmée depuis 45°C jusqu'à 175°C, à raison de 3°C/min, ensuite de 15°C/min jusqu'à 300°C, suivie d'un palier de 10 min à 300°C.

- Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 60 µA par un faisceau électronique de 70eV, un champ de balayage de l'ordre de 40-300 u et le temps de balayage est de l'ordre de 1 seconde.

II.2.3. Identification des constituants

L'identification des composés a été faite par comparaison de leur indice de rétention relatif aux indices des n-alkanes (C₉-C₁₆) et aux spectres de la banque du laboratoire constituée par l'analyse des huiles de référence, des standards commerciaux et des composés synthétisés au laboratoire. Le pourcentage des composés d'huiles essentielles a été calculé par

une méthode normalisée des différentes aires de pics et une moyenne de deux injections pour chaque huile essentielle a été effectuée suivant la méthode décrite par Figueiredo *et al.*, (2010).

II.3. Détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

La détection des propriétés biologiques nécessaires pour la survie des plantes est également la base dans la recherche de propriétés biologiques similaires pour combattre différents micro-organismes responsables de plusieurs maladies infectieuses chez l'homme et l'animal. Ces recherches ont tendance à faire face à la résistance aux antibiotiques des micro-organismes pathogènes (Miguel, 2010).

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* : une méthode de diffusion de disque dans un milieu gélosé et la méthode de la concentration minimale inhibitrice. Tous les tests ont été répétés trois fois.

II.3.1. Nature, origine et conservation des souches

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été testée sur 12 souches pathogènes (Tableau 7).

Tableau 7 : Nature et origine des souches testées.

Bacteria	Type de la bactérie	Origine
<i>Escherichia coli</i> DSM 1077	Bacille Gram –	Laboratoire de microbiologie, Institut de biotechnologie et bio-ingénieur, Université d'Algarve, Portugal.
<i>Salmonella Thyphimurium</i> ATCC 14028	Bacille Gram –	
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Bacille Gram +	
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	Bacille Gram +	
<i>Listeria monocytogenes</i> A9	Bacille Gram +	
<i>Listeria monocytogenes</i> T8	Bacille Gram +	
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline 5	Cocci Gram +	Laboratoire de microbiologie appliquée aux aliments, biomédecine et l'environnement (LAMAABE) université de Tlemcen Algérie
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci Gram +	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Cocci Gram +	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bacille Gram –	
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	Bacille Gram –	
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	Bacille Gram –	

Les cellules bactériennes d'*E. coli*, *S. Typhimurium* et *L. monocytogenes* ont été maintenues à -80°C dans du bouillon triptique de soja (TSB) additionné de 25% (v/v) de glycérol. Les différentes souches de *S. aureus* ont à leur tour été maintenues à -80°C mais dans du bouillon Cœur cervelle (BHI) additionné de 25% (v/v) de glycérol.

Avant le test, les souches ont été revivifiées dans les bouillons adéquats (le TSB pour *E. coli*, *S. Typhimurium* et *L. monocytogenes* et le BHI pour les différentes souches de *S. aureus*) durant 24h à 37°C pour atteindre la phase exponentielle.

La turbidité a été ajustée à 0.5 McFarland, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (D.O = 0.08 à 0.13 / $\lambda = 625\text{nm}$). Les cultures ont été diluées avec les différents bouillons afin d'atteindre des densités optiques (D.O) correspondantes pour chaque test (CLSI, 2006a).

II.3.2. Mise en évidence du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

II.3.2.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé

- Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. Cela consiste à placer un disque de papier imprégné de substance inhibitrice sur la gélose inoculée par la souche cible au préalable.

La substance inhibitrice diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque. Ainsi, la bactérie se développera si la concentration en antibiotique est inférieure à la concentration minimale inhibitrice ; ce qui se matérialisera par l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque, et, en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky et al., 1976 ; Nicolas & Daniel, 1998).

- Procédure

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par diffusion sur milieu gélosé, suivant le protocole décrit par Hazzit et al., (2009) qui utilise 100 μL d'une suspension contenant 2×10^8 UFC/mL de microorganismes à tester pour inoculer des boîtes de Petri coulées avec 15 mL de milieu Mueller-Hinton gélosé stérile. Les disques de papier

filtre (6 mm de diamètre) ont été individuellement imprégnés avec 3 µL d'huiles essentielles et ensuite placés sur la surface du milieu gélosé déjà inoculé avec les microorganismes à tester. Un disque imprégné avec du tampon phosphate (control négatif) et un disque imprégné avec 30µg de chloramphénicol (control positif) ont été ajoutés. Les boîtes de pétri ont été conservées à 4°C pendant 2h et ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés, y compris le diamètre des disques.

II.3.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- Principe

Selon [Laouer et al., \(2003\)](#) cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, un milieu gélosé contenant une gamme de concentrations décroissantes en huiles essentielles. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles capable d'inhiber la croissance bactérienne visible.

Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier. Il convient de noter que lorsqu'une bactérie se montre sensible à un antibactérien, ce dernier est susceptible d'être utilisé comme traitement de ce type d'infections ([Bergogne-Bérézin & Brogard, 1999](#)).

- Procédure

Suivant les recommandations du Comité Américain des Normes du Laboratoire Clinique ([CLSI, 2006b](#)) tous les tests ont été effectués dans le milieu gélosé de Mueller Hinton.

100µL d'une suspension bactérienne dont la concentration finale a été ajustée à 5×10^5 UFC/mL sont inoculés sur des boîtes de Pétri contenant des concentrations bien déterminées en huiles essentielles (1/250, 1/400, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/5000, 1/10000, v/v) émulsionnées dans le milieu gélosé. Ensuite les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C.

II.4. Mesure du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites

La capacité antioxydante des huiles essentielles extraites a été évaluée dans ce travail par une série de 10 tests visant la détermination de l'activité antioxydante totale (CAT), du pouvoir réducteur du fer, du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH*), du

piégeage du radical de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS^{•+}), du piégeage du radical hydroxyle (OH[•]), du niveau des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de la capacité d'absorbance du radical d'oxygène (ORAC), du pouvoir chélateur des ions ferriques, pouvoir réducteur du fer et de l'effet antioxydant sur les liposomes.

II.4.1. Piégeage du radical DPPH[•]

La méthode de piégeage du radical de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH[•]) a été décrite pour la première fois par Blois (1958).

- Principe

A température ambiante, le radical DPPH[•] présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (fig. 6). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Moon & Shibamoto, 2009).

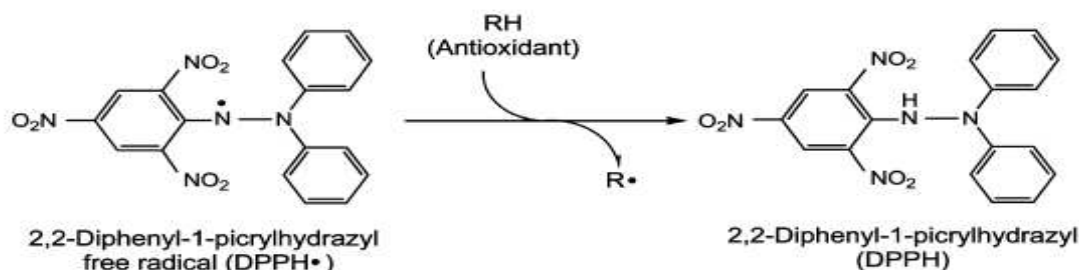


Figure 6 : Réaction entre le radical DPPH[•] et l'antioxydant pour former le DPPH stable (Moon & Shibamoto, 2009).

- Procédure

La méthode utilisée pour l'évaluation du piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles des différentes plantes étudiées (*Ammoides verticillata*, *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* et *Curcuma longa*) est celle décrite par Dandlen *et al.* (2010).

Après la préparation des dilutions d'huiles essentielles dans de l'éthanol à 96% (v/v), on prend 25µL de chaque qu'on met dans un tube Eppendorf et on additionne 975 µl de la

solution de DPPH (à 60 μ M). Le mélange réactionnel est immédiatement agité avant d'être placé pendant 60 min à l'obscurité et à la température ambiante du laboratoire. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 160-UV (Tokyo, Japan) contre un control négatif (contenant de l'éthanol au lieu de l'huile essentielle). Chaque test est répété trois fois.

Le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH a été calculé suivant la formule :

$$PI = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

avec :

PI: pourcentage d'inhibition.

A₀ : absorbance du control (sans échantillon)

A₁ : absorbance de l'échantillon après 60 min

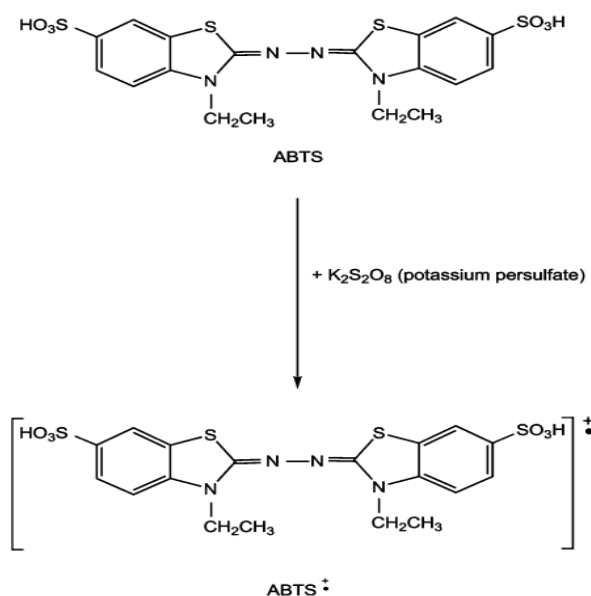
L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC₅₀). Une faible valeur d'IC₅₀ correspondant à une grande efficacité de l'huile essentielle.

II.4.2. Piégeage du radical ABTS^{•+}

- Principe

Dans la méthode ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}. L'obtention du radical cation ABTS^{•+} résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation qui est la peroxydase metmyoglobine (Miller & Rice Evans, 1997) en présence de H₂O₂ ou d'un oxydant, le dioxyde de manganèse (Benavente-Garcia et al., 2000 ; Miller et al, 1996) ou le persulfate de potassium (fig. 7) (Moon & Shibamoto, 2009).

Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration verte bleue intense. En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm (Lien et al, 1999 ; Re et al., 1999).



Figures 7 : Formation de l'ABTS^{•+} par un oxydant persulfate de potassium (Moon & Shibamoto, 2009).

- Procédure

Suivant le protocole de [Aazza et al. \(2011a\)](#) le radical ABTS^{•+} est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium (K₂S₂O₈, 2.45mM), utilisé comme oxydant. Ce mélange est agité pendant 16 h à l'obscurité puis dilué par l'éthanol jusqu'à obtenir une absorbance de 0.700 à 734 nm.

Un volume de 990 µl de cette solution d'ABTS^{•+} est ensuite mélangé avec 10 µl d'huiles essentielles à différentes concentrations. Après 6 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 160-UV (Tokyo, Japan) contre un blanc (témoin négatif). Le calcul du pourcentage d'inhibition permet d'exprimer cette activité antiradicalaire en IC₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[•].

II.4.3. Détermination de la capacité antioxydante totale

- Principe

Ce test a été présenté pour la première fois par [Fiske & Subbarow \(1925\)](#) qui l'ont développé pour déterminer le phosphate inorganique par la formation de complexe de phosphate-molybdène V de couleur verte mesurable par spectrophotomètre. Depuis, cette

méthode a été révisée et modifiée par [Chen et al.](#) en 1956, puis par [1999, Prieto et al.](#) en 1999 qui l'ont adapté pour la détermination de tous genres d'agents réducteurs.

Ce test est basé sur la réduction du molybdène VI (Mo^{6+}) en molybdène V (Mo^{5+}) par un échantillon extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation d'un complexe phosphate/ Mo^{5+} de couleur verte ([Alam et al., 2013](#)).

- Procédure

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par [Prieto et al. \(1999\)](#). Un volume de 0.1 mL d'huiles essentielles convenablement dilué est combinée dans un tube avec 1mL de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (Na_3PO_4 , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min. Après un repos de 6 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

II.4.4. Pouvoir réducteur du fer

- Principe

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fournit des ions Ferriques (Fe^{3+}) qui seront réduits en Ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants présents dans l'extrait végétal, après cette réduction, l'extrait forme un complexe $(\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3)$ coloré en bleu qui absorbe à 700nm ([Miguel, 2010](#) ; [Alam et al., 2013](#)). La diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde indique la diminution de l'effet réducteur de l'extrait étudié.

- Procédure

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par [Aazza et al. \(2011b\)](#). Cette méthode consiste à mélanger 1 mL d'huiles essentielles à différentes concentrations avec 2.5mL de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 mL d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (p/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 min à 50°C, puis 2.5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% (p/v) sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 x g pendant 10 min à température ambiante et 2.5 mL du surnageant sont additionnés de 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1% (p/v). La

lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc où l'extrait est remplacé par le tampon phosphate.

II.4.5. Pouvoir chélateur du fer

Le fer est un élément essentiel pour le bon fonctionnement physiologique, mais l'excès de cet élément peut causer des dommages à la cellule. En raison de sa forte réactivité, le fer est connu pour son grand rôle pro-oxydant vis-à-vis de l'oxydation des lipides (Gulcin, 2012).

- Principe

Un des mécanismes de l'action anti-oxydative est la chélation de la transition des ions métalliques. Cette transition stimule la peroxydation des lipides par la participation à l'accélération de cette peroxydation, en l'hydro-péroxyde lipidique en d'autres composés aptes à enlever l'hydrogène et aussi par la perpétuation de la peroxydation des lipides (Miguel, 2010).

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine (fig. 8) (Gulcin, 2012). En effet, la ferrozine forme avec le fer libre, présent dans un milieu réactionnel, un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélatée et donc sur la capacité des extraits à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important (Zhao et al., 2006).

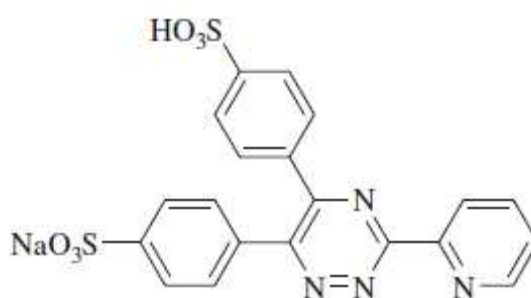


Figure 8 : Structure chimique de la ferrozine (Gulcin, 2012)

- Procédure

Suivant le protocole décrit par Wang *et al.* (2004), un volume de 100 μl d'huiles essentielles à différentes concentrations est ajouté à 50 μl de Chlorure de fer ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mM). Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 100 μl de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, suivis de 2.75 mL d'eau distillée. Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans ferrozine). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité en CI_{50} comme décrit précédemment pour le DPPH \cdot .

II.4.6. Piégeage du radical hydroxyle

- Principe

L'hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (Castro & Freeman, 2001). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2310 mV) qui lui permet de réagir avec les lipides, les phospholipides des membranes cellulaires, les protéines les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine ce qui cause des dégâts à la cellule (Siddhuraju & Becker, 2007 ; Alam *et al.*, 2013).

In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la formation du radical $\text{OH}\cdot$ et son effet sur l'oxydation et la dégradation de molécules biologiques telles que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique le système implique l'autoxydation du complexe Fe^{2+} -EDTA dans un milieu aqueux pour former $\text{O}\cdot^{-2}$, qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7.4. Après, ce dernier interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $\text{OH}\cdot$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur.



Les $\text{OH}\cdot$ générés, qui ne sont pas piégés, attaquent et dégradent le désoxyribose et les produits de dégradation sont révélés par l'acide thiobarbiturique en formant un chromogène rose lors du chauffage dans un milieu acide. Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fenton (Halliwell *et al.*, 1987).

- Procédure

Cette activité est étudiée en mesurant leurs capacités à prévenir la dégradation oxydative du désoxyribose, selon un test développé par [Lopes et al. \(1999\)](#). Une prise d'essai de 25 µL d'huiles essentielles à différentes concentrations est mise en présence d'un mélange réactionnel contenant les réactifs suivants: 100 µL de sulfate ferreux (FeSO₄, 7H₂O, 10 mM), 100 µL d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, 10 mM), 500 µL de désoxyribose (C₅H₁₀O₄, 10 mM), 900 µL de solution tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 200 µL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 10 mM) à 37°C pendant 60 min. La réaction est arrêtée par addition de 1 mL de 2.8% (p/v) d'acide trichloracétique (TCA) et de 1mL de 1% (p/v) d'acide thiobarbiturique (TBA), suivi d'un chauffage dans un bain d'eau bouillante pendant 15 min. Après refroidissement de l'échantillon, l'absorbance est mesurée à 532 nm. Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antiradicalaire en IC₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH•.

II.4.7. Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)

- Principe

L'efficacité des huiles essentielles à inhiber la formation de malondialdéhyde ainsi que la peroxydation des lipides a été déterminé par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric Acid Reactive Species, TBARS). Cette méthode mesure le Malondialdéhyde (MDA) formé après la décomposition de l'hydro peroxyde lipidique (produit secondaire de l'oxydation), qui forme un complexe avec l'acide thiobarbiturique ([fig. 9](#)) ([Moon & Shibamoto, 2009](#)), un chromophore de couleur rose dans un environnement acide possédant un maximum d'absorbance à 532nm. Ce dosage n'est pas vraiment spécifique, parce que les 4-hydroxyalkenals, 2,4-alkadienals et 2-alkenals, les produits de dégradation des protéines et des sucres, les acides aminés, les acides nucléiques et les anthocyanines sont aussi capables de réagir avec le TBA et former un chromophore qui absorbe dans la même longueur d'onde ([Miguel, 2010](#)). La concentration en TBARS est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible des TBARS extraites des échantillons par l'acide trichloroacétique (TCA).

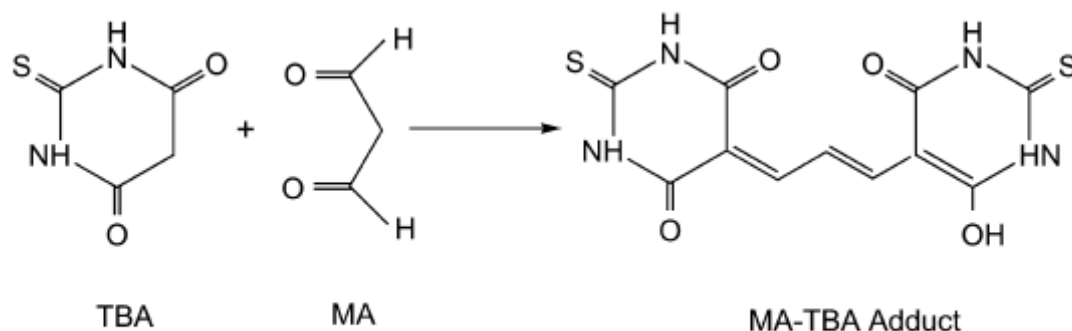


Figure 9 : Formation du chromophore Acide thiobarbiturique - Malondialdéhyde (Moon & Shibamoto, 2009).

- Procédure

Une solution de jaune d'œuf à 10% (v/v) (dissoute dans une solution de KCl à 1.15% (p/v)) a été utilisée comme milieu riche en lipides suivant le protocole de [Aazza et al. \(2011b\)](#).

Un volume de 100 µL des différentes dilutions d'huiles essentielles a été ajouté à 0.5 mL de la solution de 10% (p/v) de la solution de jaune d'œuf et ajusté au volume de 1 mL avec l'eau distillé. Après, 1.5 mL d'acide acétique à 20% (v/v) (pH 3.5) a été ajouté en plus de 1.5 mL de 0.8% (p/v) de TBA dissout dans 1.1% (p/v) de dodecyl sulphate de sodium (SDS).

Après une bonne homogénéisation, les tubes sont incubés 60 min à 95°C. Après refroidissement à température ambiante 5 mL de butan-1-ol a été additionné à chaque tube puis l'ensemble a été bien mélangé pour être centrifuger à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du mélange est mesurée à 532 nm en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 160-UV (Tokyo, Japan) contre un blanc (témoin négatif). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antioxydante en IC50 comme décrit précédemment pour le DPPH[·].

II.4.8. Liposomes

- Principe

Le principe de ce test suit le même principe que celui du TBARS car l'objectif est de voir l'efficacité des huiles essentielles à protéger les liposomes (qui sont de nature lipidique) contre la décomposition de l'hydro peroxyde lipidique (produit secondaire de l'oxydation).

- Procédure

Suivant le protocole décrit par [Bakchiche et al., \(2013\)](#), les liposomes sont obtenus par addition de 0.4g de lécithine à 80mL de chloroforme. Cette solution séchée puis soumise à un flux d'azote pendant 30 secondes. Les liposomes sont soumis ensuite sous vide pendant 2 h pour un séchage entier. Puis on ajoute 80 mL de tampon phosphate salin (0.01M, pH 7.0) et mis à la température de 4°C jusqu'au moment de l'expérimentation.

250µL de la suspension de liposome mélangée avec 25µL des différentes dilutions, 400µL d'eau distillée, 1.5mL d'acide acétique à 20% (p/v), 1.5 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.8M dissout dans une solution de SDS à 1.1% (p/v). L'ensemble a été incubé à 95°C pendant 1 heure. Après refroidissement à température ambiante 5 mL de butan-1-ol a été additionné à chaque tube puis l'ensemble a été bien mélangé pour être centrifuger à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du mélange est mesurée à 532 nm en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 160-UV (Tokyo, Japan) contre un blanc (témoin négatif). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antioxydante en IC₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH'.

II.4.9. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

- Principe

L'une des méthodes les plus communes dans l'évaluation de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption directe de cette molécule dans la zone ultra-violet à 230nm ([Santocono et al. 2006](#) ; [Berges et al. 2007](#)). Ce qui fait si la concentration d'H₂O₂ diminue par piégeage l'absorbance à cette longueur d'onde diminue aussi. Cependant, il est possible que l'échantillon absorbe dans cette longueur d'onde, ce qui nécessite son introduction dans la mesure du blanc (la mise de l'auto-zéro du spectrophotomètre).

- Procédure

L'habilité des huiles essentielles à piéger le peroxyde d'hydrogène a été estimé suivant le protocole de [Ruch et al. \(1989\)](#). Cette méthode consiste à une prise d'échantillon d'huiles essentielles (10-62.5µL) qu'on mélange à 300µL de la solution de peroxyde d'hydrogène (40mM mélangé dans du tampon phosphate), le tout est ajusté à 1 mL par du tampon phosphate (50 mM à pH 7.4). On laisse 40 min d'incubation à une température de 30°C, puis on fait la lecture à 230nm contre un blanc témoin négatif.

Il faut souligner qu'il faut à chaque fois éliminer l'absorbance de l'huile essentielle par une mise d'auto-zéro du spectrophotomètre avec une solution contenant les mêmes volumes de tampon et d'huile essentielle. Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité antioxydante en IC₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH•.

II.4.10. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)

- Principe

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée à l'aide du test chimique ORAC ([Ou et al., 2001](#)). Ce test, réalisé avec un spectrofluorimètre, consiste en une mesure de la dégradation (oxydation) de la fluorescéine induite par un stress oxydatif (décomposition thermique à 37°C de l'AAPH dihydrochloride en deux radicaux libres) ([Alam et al., 2013](#)). L'éventuelle présence de composés antioxydants dont l'huile essentielle en retarde la dégradation. La réaction est standardisée par rapport à des concentrations connues de Trolox, un composé reconnu pour son activité antioxydante. Ce composé est la section hydrophile de la vitamine E.

- Procédure

La méthode ORAC utilisée dans cette étude a été décrite par [Ou et al. \(2001\)](#) et adaptées pour les échantillons lipophile comme les huiles essentielles a été reporté par [Huang et al. \(2002\)](#).

La sensibilité du protocole ORAC nécessite une précision dans la préparation des solutions :

L'**AAPH** est dilué à 1.28×10^{-2} M en utilisant du tampon phosphate. Cette solution doit être gardée dans un bain glacé sans dépasser les 8h, sinon il faut s'en débarrasser.

La solution stock de Fluorescéine (1 mM) a été préparé dans du tampon phosphate (75mM, pH 7.4) cette solution peut être stockée plusieurs mois en obscurité à 4°C. La solution de travail doit être fraîche et préparée extemporanément à base de la solution stock de Fluorescéine et dilué avec du tampon phosphate pour une concentration de 6.3×10^{-8} mM.

Le Trolox est préparé comme standard dans du tampon phosphate (75mM, pH 7.4) pour obtenir les concentrations de 100µM, 50µM, 25 µM, 12.5µM et 6.25µM.

0.5g d'huiles essentielles ont été dissout dans 20 mL d'acétone. Un aliquote de cette dilution est ensuite dilué dans le solvant RMCD (randomly methylated β -cyclodextrin) à 7% (p/v) préparé dans un mélange eau-acétone à 50% (v/v), bien homogénéiser le tout.

Puisque la technique ORAC est extrêmement sensible, les huiles essentielles doivent être rigoureusement diluées juste avant l'analyse pour éviter toutes interférences.

Dans chaque puits, on va mettre :

150 µl Fluorescéine + 40 µl tampon + 10 µl ciclodext	(control)
150 µl Fluorescéine + 15 µl tampon + 10 µl ciclodext + 25 µl AAPH	(blanc)
150 µl Fluorescéine + 15 µl tampon + 10 µl dilution + 25 µl AAPH	(essai)

Le volume final par puits est de 200µL.

Une fois à l'intérieur du lecteur, la plaque va subir une agitation pendant 10 secondes, puis il va y avoir une lecture de la fluorescence chaque min pendant 90 min à une longueur d'excitation de l'ordre de 485 nm et d'émission de l'ordre de 527 nm.

Le calcul des valeurs d'ORAC suivant la méthode décrite par (Cao & Prior, 1999) et les résultats sont exprimés en équivalent de Trolox par milligramme d'huile essentielle (µ.mol Trolox/mg).

II.5. Mesure du pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles extraites

II.5.1. Mesure du pouvoir d'inhibition de la lipoxygénase

- Principe

L'enzyme lipoxygénase catalyse l'oxydation des acides gras insaturés contenant la structure 1-4 diène. Donc la conversion de l'acide linoléique en 13-hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoate (caractérisé par l'absorbance du diène conjugué à la longueur d'onde de 234 nm) est suivi par une mesure spectrophotométrique (Békir *et al.*, 2013 ; Miguel *et al.*, 2014).

- Procédure

La méthode suivie dans ce protocole est celle décrite par Frum & Viljoen (2006). La réaction est initiée par l'addition de 3µL de la solution de lipoxygénase (0.054g dans 1mL de tampon borate additionné de 0.1 M de tween, pH 9) avec 937 µL tampon borate, 10µL de la dilution d'huiles essentielles et en dernier lieu 50 µL d'acide linoléique (0.001 M). La lecture de l'absorbance se fait, à la longueur d'onde de 234 nm, à chaque min durant 5 min. Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est calculé suivant le protocole décrit dans la méthode de DPPH.

II.5.2. Mesure du pouvoir anti-acétylcholinestérase

- Principe

L'Acétylcholinestérase dégrade le substrat acétylcholine en acide acétique et le thiocholine, qui interagit avec l'acide 5,5'-dithiobis-2- nitrobenzoïque (DTNB). L'accumulation de l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque est mesurée à une longueur d'onde de 405 nm (Miguel *et al.*, 2014).

- Procédure

Suivant le protocole décrit par Mata *et al.* (2007), un volume de 25µL de la dilution d'huiles essentielles, 425 µL du tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 8) et 25 µL de l'enzyme acétylcholinestérase (0.28 U/mL dissout dans le tampon) ont été mises dans un tube. Après une agitation et une incubation pendant 15 à la température ambiante, 75 µL de substrat (l'acétylcholine iodine à 15 mM dissout dans du tampon) et 475 µL de DTNB (3 mM dissout dans du tampon) ont été ajouté aux tubes. Après 30 min d'incubation la lecture se fait à la

longueur d'onde de 405 nm contre un témoin (sans l'huile essentielle). Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est calculé suivant le protocole décrit dans la méthode de DPPH.

II.6. Mesure du pouvoir antidiabétique

II.6.1. Test de l'inhibition de l' α amylase

L'inhibition de l' α -amylase a été mesurée suivant le protocole décrit par [Dong et al. \(2012\)](#) avec quelques petites modifications. 40 μ L de l'huile essentielle a été mixée avec 500 μ L de tampon sodium phosphate à 20mM pH 6.9 additionné à 0.006M de chlorure de sodium) et 200 μ L de la solution d'enzyme α -amylase (1.0 U/mL dans le tampon préparé), le tout a été pré-incubé à 25°C pendant 10 min. Après, 400 μ L de la solution d'amidon à 0.25% (p/v) dilué dans le tampon a été additionnée à chaque tube puis une incubation à 37°C pendant 10 min a été nécessaire pour la réaction. Après la fin de l'incubation 1.0 mL de la solution d'acide dinitrosalicyclique (1% (p/v) d'acide 3,5-dinitrosalicyclique plus 12% (p/v) de tartrate de sodium potassium le tous de la solution de soude NaOH à 0.4M. Après les tubes sont mis dans une eau bouillante pendant 5 min et refroidis à température ambiante. 10 mL d'eau distillée a été ajouté avant la lecture à 540 nm contre un control 200 μ L de tampon à la place de l'enzyme.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acarbose à des concentrations de 0 à 25 μ g.mL⁻¹ de la solution finale.

L'activité d'inhibition de l' α amylase est exprimée en mg d'équivalent acarbose par gramme d'huile essentielle (mg EA.g⁻¹ HE).

II.7. Détermination de l'activité anti-proliférative des huiles essentielles vis-à-vis des cellules cancéreuses THP-1

II.7.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire THP-1

Les cellules utilisées appartiennent à la lignée monocyttaire humaine THP-1. Elles sont issues du sang, d'un enfant âgé de 1 an atteint d'une leucémie aiguë. Ces cellules capables de se diviser *in vitro* au stade indifférencié pendant au moins 14 mois sont souvent qualifiées de « macrophage like cells » ([Abrink et al., 1994](#)). Les cellules THP-1 possèdent à leur surface des récepteurs Fc et C3b, des immunoglobulines cytoplasmiques, sont capables de produire de l'IL-1 et peuvent être différenciées en macrophage (avec des esters de phorbol). Dans cette étude, les THP-1 sont utilisées, après différenciation, comme modèle de macrophage

(Auwerx, 1991; Hiura *et al.*, 1999). En effet, les THP-1 possèdent de nombreuses caractéristiques communes aux monocytes et aux macrophages notamment la capacité de phagocytose. Ces cellules sont également capables de sécréter des cytokines et exprimer des récepteurs membranaires comme les CD-4 et CD-14, communs aux macrophages et aux monocytes (Tsuchiya *et al.*, 1980; Auwerx, 1991).

II.7.2. Techniques de culture des cellules THP-1

Les cellules THP-1 sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum fœtal bovin, 1% (v/v) d'acides aminés non essentiel, 100U/mL de péniciline et 100µg/mL de stréptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Pour le maintien de routine, les cellules de THP-1 sont repiquées chaque deux ou trois jours par une remise en suspension dans milieu neuf.

II.7.3. Mesure de l'activité antiproliférative

L'effet inhibiteur de croissance des huiles essentielles a été mesuré en utilisant un protocole standard de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) 2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) adapté par Mosmann (1983).

Les cellules de THP-1 ont étéensemencées dans une plaque de 96 puis à raison de 5x10³ cellules/puis et exposé à différentes concentrations d'huiles essentielles (1-50µg/mL) pour une durée de un (1), trois (3) et sept (7) jours à la température de 37°C en une atmosphère de 5% de CO₂/95% d'air en complément de milieu contenant du sérum. Les huiles essentielles sont diluées dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) sans que son taux dépasse 0.5% (v/v) du volume total. Les contrôles doivent contenir une concentration équivalente de DMSO.

Après traitement, les cellules sont incubées 1 heure dans les conditions de cultures habituelles après addition d'un volume du même volume du milieu contenant le MTT (2mg/mL)

Après cette incubation, 150µL d'HCl (0.1 M) dissout dans l'isopropanol a été ajouté pour dissoudre les cristaux bleu formés par la réduction du MTT.

La lecture se fait à une longueur d'onde de 570 nm et en utilisant la longueur d'onde de 630nm comme arrière plant et cela en utilisant un lecteur de plaque double faisceaux.

La valeur moyenne de l'absorbance du control négatif (DMSO-cellules traité) est considéré comme 100% d'absorbance (pas d'inhibition de croissance) et le résultat a été déployé comme l'absorbance (% du control) vs. la concentration d'huiles essentielles.

II.8. Analyse statistique

Le logiciel IBM SPSS statistics (version 21.0) a été utilisé l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm écart type et une analyse de variance (ANOVA) avec une analyse par le test de Tukey's.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites

L'examen organoleptique des différentes huiles essentielles a consisté en des tests olfactif et gustatif complétés par une description de l'aspect et de la couleur de ces huiles (tableau 8).

Tableau 8 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées.

Huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur	Saveur
<i>Ammoides verticillata</i>	Jaune	Liquide (huileuse)	Aromatique	Forte et piquante
<i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	Jaune foncé	Liquide (huileuse)	Aromatique	Forte et piquante
<i>Curcuma longa</i>	Jaune pale	Liquide (huileuse)	Aromatique acre	Forte et piquante

L'odeur d'une huile essentielle est un caractère organoleptique déterminant de sa qualité. L'essai olfactif apporté à l'analyse des huiles essentielles est un élément de très grande valeur puisqu'il permet d'en étudier la première caractéristique qu'offre la plante.

Généralement les huiles essentielles sont des liquides huileux, volatils, caractérisés par une forte odeur, rarement colorés et généralement moins denses que l'eau (Miguel, 2010).

L'arôme de chaque huile essentielle est le résultat de la combinaison de tous les constituants, car même les composés minoritaires peuvent jouer un important rôle dans la définition de l'odeur (Sangwan et al., 2001).

Les changements organoleptiques d'un aliment additionné de grandes concentrations d'huiles essentielles, capables d'éliminer la croissance bactérienne, ne sont pas généralement acceptés par le consommateur (Solomakos et al., 2008). Ce constat limite l'utilisation de ces huiles à de faibles concentrations et auxquelles il faudrait associer un autre moyen de conservation comme le froid pour la préservation des denrées alimentaires de l'altération microbienne (Lang & Buchbauer, 2012).

III.2. Rendement d'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées

III.2.1. Rendement en huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*

Dans la présente expérience, le rendement d'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* est de l'ordre de 2.91% (P/P) (fig. 10) et représente 8.08 fois celui rapporté par Laouer (2003) (0.36% : P/P) chez la même plante, endémique de la région de Sétif.

D'autres rendements (exprimés en % : P/P) ont été rapportés pour la même plante : 2.51 par Bnouham et al. (2012) dans la région d'Oujda (Maroc), 2 par El Ouariachi et al. (2011 ; 2015) à Ihfir (Maroc), 2.8 par Khajeh et al. (2004), 2.7 par Bendahou (2007), 3.5 par Chialva et al. (1993), 3.5 à 5.2 par Ashraf & Batty (1975), 4.97 par Kambouche et E1-Abed (2003), 2.1 par Hashemi et al. (2014) (Iran) et 2.5 par Nickavar et al., (2014) (Iran).

Les travaux de Bekhechi et al. (2010) sur la même plante récoltée dans les régions de Tlemcen et d'Ain-Temouchent rapportent des rendements d'extraction en huiles essentielles qui varient de 2.1 à 5.4%.

Les observations faites, ont servi comme base pour dire que les différences des teneurs en huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* sont étroitement liées aux conditions culturelles, tant climatiques ; dispersion géographique, altitude et nature du sol.

Cette interprétation fut avancée par Bendahou et al. (1997) qui préconisent que l'étude complète des huiles essentielles doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques et pour l'obtention d'un meilleur rendement, il est nécessaire de :

- Choisir un étage bioclimatique semi-aride, tempéré doux.
- Le sol doit être limoneux-argileux-sableux à texture équilibrée ou argilo-siliceux.
- Procéder à l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation.

III.2.2. Rendement en huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*

L'extraction des huiles essentielles de nos échantillons de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* par hydrodistillation a fourni un taux de l'ordre de 3% (P/P) (fig.10), ce rendement moyen a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Le résultat obtenu révèle un bon rendement en huile essentielle de l'échantillon récolté de la même station.

Ce rendement en huiles essentielles est beaucoup plus élevé que celui rapporté par [Amarti et al. \(2010\)](#) pour la partie aérienne de *T. ciliatus* (1.2% : P/P) et identique à celui trouvé par le même auteur chez *T. algeriensis* (3% : P/P).

Les rendements obtenus par [Bousmaha-Marroki et al. \(2007\)](#), à partir de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* récoltés dans différentes régions de Tlemcen, sont compris entre 3.0 et 5.1% (P/P).

[Giordani et al. \(2008\)](#) rapportent que le rendement en huiles essentielles des différentes espèces de thym d'Algérie y compris l'espèce *Thymus ciliatus* originaire de Djebel Ansel (Guelma), sont compris entre 2 et 3% (P/P).

Le rendement en huiles essentielles varie essentiellement selon la nature et l'origine géographique la plante utilisée, ainsi que le matériel et la méthode d'extraction ([Garnero, 1975](#)).

Selon [Bounatirou et al. \(2007\)](#), la différence de rendement en huiles essentielles peut être due à deux facteurs : la région et la période de collecte, car ces auteurs ont enregistré, en étudiant les huiles essentielles de *Thymus capitatus* Hoffm. et Link, une différence de rendement allant de 1.2 % à 5.6% (P/P) et ceci selon la région et le stade de collecte (végétatif, floraison ou post-floraison).

De même, [Kholkhal \(2014\)](#) a constaté qu'il y a des différences de rendement en huiles essentielles selon le stade de collecte de la plante, et on enregistré des teneurs de l'ordre de 2% (P/P) avant floraison, 3.40% (P/P) en pleine floraison et de 1.50% à 1.72% (P/P) en post-floraison.

C'est pour cette raison que les connaissances traditionnelles inclues des détails comme la saison durant laquelle des espèces particulières produisent des composés à effets biologiques actifs, quelle parties de la plante renferment ces principes actifs et la région (surtout l'altitude) dans laquelle cette espèce la plus riche en ces composés ([Okunda, 2002](#) ; [Chandra, 2004](#) ; [Jagetia & Baliga, 2005](#)).

Dans une autre étude sur le même genre, [Elajjouri et al. \(2008\)](#) ont constaté que le rendement moyen en huiles essentielles des échantillons de *T. capitatus* et de *T. bleicherianus* était d'environ 2.05 et 1.75% (P/P).

Haddouchi et al. (2009) dans une étude sur *Thymus fontanesii* Boiss & Reut ont enregistré un rendement en huiles essentielles de 2 % (P/P) ; par contre Dob et al (2006) ont obtenu à partir des tiges et des feuilles de la même espèce végétale un rendement plus faible de l'ordre de 0.9% (P/P).

Dans une étude faite sur différents espèces du genre *Thymus* existant en Algérie, Hazzit et al., (2006) ont obtenu des rendements en huiles essentielles de *T. munbyanus*, *T. numidicus*, *T. guyonii*, et *T. pallescens*, respectivement de l'ordre de 1.8, 2.4, 1.5 et 3.7% (P/P).

Dans le même cadre, Houmani et al. (2002) ont obtenu des rendements allant de 2.2 à 4.0 % (P/P) pour *T. willdenowii* et de 1.4 à 4.2 % (P/P) pour *T. algeriensis*.

D'après une étude faite par Burbott & Loomis (1987), il apparait qu'une longue journée associée à une forte intensité lumineuse et une température élevée favorise la production d'huiles essentielles. De leur côté, El-Keltawi & Croteau (1986a ; 1986b) ont montré que les régulateurs génétiques sont responsables de la formation d'huile essentielles par un effet direct sur le métabolisme des mono-terpènes et sur les niveaux d'activité des enzymes biosynthétiques.

III.2.3. Rendement en huile essentielle de *Curcuma longa*

Un faible rendement en huiles essentielles a été trouvé chez *Curcuma longa* L. Il est de l'ordre de 0.96 % (fig. 10).

La teneur en huiles essentielles de *Curcuma longa*, obtenue par Loc et al. (2008) est d'environ 1.51% (P/P). Singh et al., (2010a) ont obtenu un rendement de 2.9% (P/P) pour les rhizomes secs et de 1.4% pour les rhizomes frais.

De leur côté, Gounder & Lingamallu (2012) ont obtenu des rendements d'extraction en huiles essentielles des rhizomes de *Curcuma longa* de l'ordre de 3.52 et 3.05 % (P/P), respectivement pour des rhizomes frais et secs.

Les travaux réalisés par Eigner & Scholz (1999) sur cette même espèce leurs ont permis d'obtenir un rendement en huile essentielle (5.8% P/P) largement supérieur à celui de cette étude.

Par ailleurs, l'extraction par des solvants volatils de l'huile essentielle de *Curcuma* effectuée par Manzan et al. (2003) leur ont permis d'obtenir des rendements de l'ordre de 5.49% (P/P).

Ces observations laissent penser que les différences dans les teneurs en huiles essentielles de *Curcuma* sont dues à plusieurs facteurs : l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce et/ou la variété végétale elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette ainsi que la méthode d'extraction (khajeh et al., 2004 et 2005; Viljoen et al., 2006a ; Sefidkon et al., 2007).

D'un autre côté, la méthode de séchage usuelle des rhizomes de *Curcuma longa* a des effets significatifs sur la qualité et la quantité de ses huiles essentielles (Asekun et al., 2007), parce que les substances volatiles sont présentes dans les cellules spécifiques et les canalisations sont présentes dans la région méristématique du rhizome (Ravindra et al., 2007).

Ces cellules peuvent être endommagées durant la râpage conduisant à l'exposition des huiles essentielles qui y sont contenues aux conditions atmosphériques, qui peuvent favoriser leur volatilisation au cours du séchage (Diaz-Maroto et al., 2002). Les échantillons séchés apparaissent trop fibreux et ainsi cela sera plus difficile à casser et à moudre. Par ailleurs, le type et la vitesse de broyage peut induire une élévation de la température et par conséquent la perte de substances volatiles (Balakrishnan, 2007 ; Gounder & Lingamallu 2012). Ceci pourrait expliquer en partie le faible rendement d'extraction obtenu dans ce travail.

III.3. Composition des huiles essentielles extraites

Les activités biologiques des huiles essentielles sont étroitement liées à sa composition chimique, et chaque huile essentielle est un mélange très complexe constitué de plusieurs dizaines de composés en proportions très variés (Bekhechi et al., 2010).

Le choix de cette plante s'est basé sur ses vertus médicinales connues telles que ses propriétés antalgiques, anti-infectieuses et antispasmodiques. Pour cela, il était nécessaire de connaître la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante poussant spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie).

III.3.1. L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*

L'analyse par chromatographie de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a révélé vingt-trois (23) constituants identifiés dans cette huile essentielle (fig. 11), dont la totalité sont des monoterpènes (tableau 9).

Le taux des monoterpènes oxygénés identifiés représente 57.4% (v/v) de la composition globale. L'alcool cumine est le monoterpène oxygéné majoritaire avec un taux de l'ordre de 44.3% (v/v), suivi par le thymol avec 10.8%. Par contre le carvacrol est présent en faible teneur (1.1%).

Trois autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés : le terpinène-4-ol (0.9%), trans- ρ -2-Menthen-1-ol (0.2%) et le linaloole (0.1%). Lors de l'analyse de ces huiles essentielles, nous avons caractérisé huit monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 42.7% de la composition chimique globale, avec prédominance du ρ -cymène (18.1%), suivi de limonène (14.2%), de γ -terpinène (10.2 – 12.4%) et de α -Pinène (1.9%). Cinq autres oléfines sont également identifiés, soit: le β -myrcène (0.5%), le α -terpinène (0.4%), le β -pinène, α -thujène et le terpinolène (avec 0.2 % pour chacun de ces composés).

Ces résultats nous amènent à dire que cette huile essentielle appartient au groupe chimique à Alcool cumine/limonène/ ρ -cymène/thymol.

D'après le screening de la documentation traitant la composition chimique d'*Ammoides verticillata*, c'est la première fois qu'on constate que l'alcool cumin soit le composé majoritaire des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* d'Algérie a fait l'objet de plusieurs études. Kambouche & El-Abed (2003) ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*, récolté dans la région d'Oran.

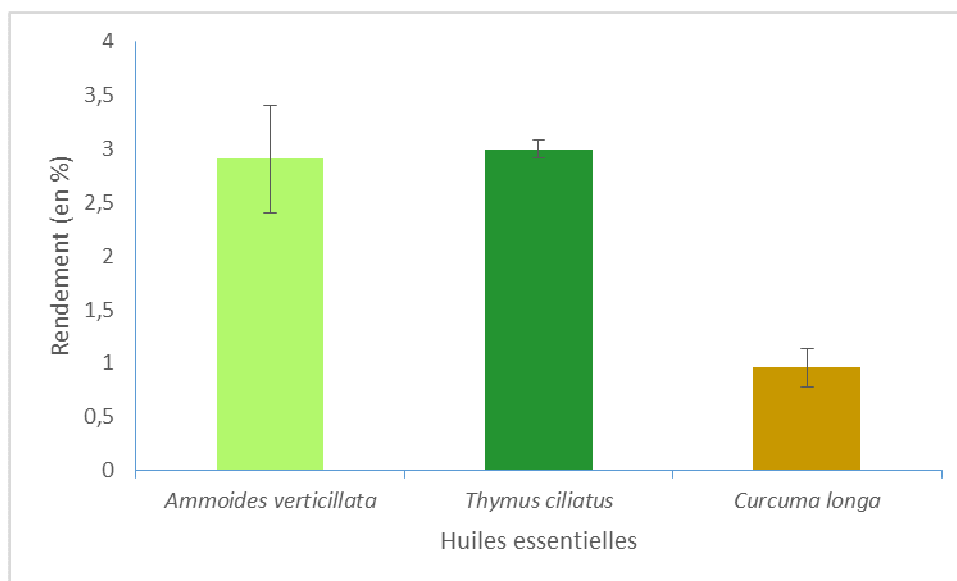


Figure 10 : Rendements des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

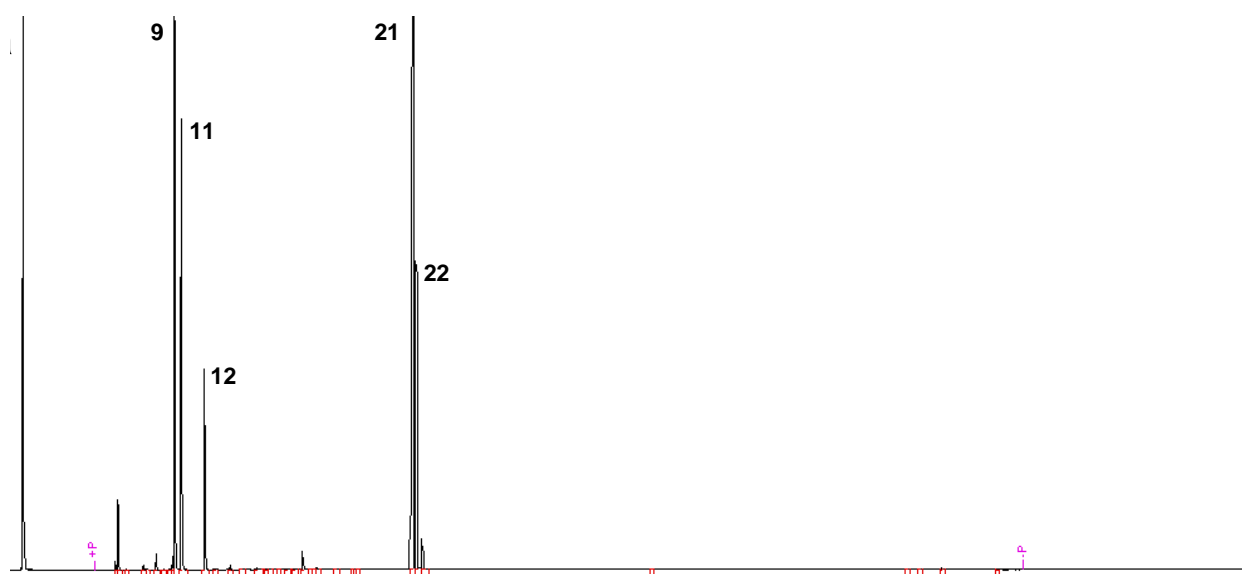


Figure 11 : Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (9 = *p*-cymene, 11 = limonene, 12 = γ -terpinene, 21 = cumin alcohol et 22 = thymol).

Tableau 9 : Composition en pourcentage (v/v) des huiles essentielles isolées de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*.

Composés	IR	IR ^L	<i>Ammoides verticillata</i> (%) (v/v)
α -Thujène	924	929	0.2
α -Pinène	930	937	1.9
Sabinène	958	961	T
β -Pinène	963	963	0.2
β -Myrcène	975	975	0.5
α -Phellandrène	995	1003	T
δ -3-Carène	1000	1004	T
α -Terpinène	1002	1005	0.4
ρ -cymène	1003	1008	18.1
β -Phellandrène	1005	1009	T
Limonène	1009	1016	14.2
γ -Terpinène	1035	1035	6.8
hydrate <i>trans</i> -Sabinène	1037	1047	T
Terpinolène	1064	1064	0.2
Linaloole	1074	1082	0.1
<i>trans-p</i> -2-Menthen-1-ol	1099	1095	0.2
Terpinène-4-ol	1148	1153	0.9
α -Terpinéol	1159	1157	T
Aldehyde cumine	1200	1200	T
Carvone	1210	1206	T
alcool cumine	1260	1270	44.3
Thymol	1275	1278	10.8
Carvacrol	1286	1299	1.1
% d'identification			99.9
Composés regroupés			
Monoterpène hydrocarbonés			42.5
monoterpènes oxygéné			57.4

- RI – Indice de rétention relativement calculé à C₉-C₁₆ *n*-alkanes sur la colonne DB-1;
- RI^L – Indice de rétention selon la littérature reporté par [Lindson & Mallar \(2014\)](#) sur les indices de rétention de DB-1 ou colonne similaires (100% Dimethylpolysiloxane).
- t - trace (<0.05%).
- Le pourcentage des composés d'huiles essentielles a été calculé par une méthode normalisée des différents aire de pics et une moyenne de deux injections pour chaque huile essentielle a été effectuée suivant la méthode décrite par [Figueiredo et al., \(2010\)](#).

L'analyse de cette huile leur a permis la mise en évidence de 20 composés représentant 99.9% (v/v) de la composition globale. L'isothymol est le composé majoritaire avec une teneur de 51.20% (v/v). D'autres composés sont également identifiés en quantités appréciables: le ρ -cymène (14.08%), le thymol (12.96%), le limonène (11.89%) et le γ -terpinène (6.79%). Par contre, la teneur en carvacrol est très faible, de l'ordre de 0.25%.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de cette plante récoltée à Terni (région de Tlemcen) faite par [Bendahou \(2007\)](#) révèle l'importante présence du thymol (50.1%), suivi par le ρ -cymène (15.6%), le limonène (15.0%), le carvacrol (8.8%) et par le γ -terpinène (6.6%).

Plusieurs autres études montrent la grande diversité de compositions chimiques des huiles essentielles, dont parmi le travail effectué par [Bekhechi \(2009\)](#) sur les huiles essentielles de la même plante récoltée à différentes stations de la région de Tlemcen (ouest d'Algérie), qui a constaté que les huiles essentielles de cette région étaient riches en thymol (48.7 – 51.6%), suivi par du limonène (18.2 – 21.1%), du γ -terpinène (10.2 – 12.4%) et du ρ -cymène (9.9 – 10.8%) par contre le carvacrol était présent en faible teneur (0.3%). Ce qui signifie qu'elles appartenaient au groupe chimique à thymol/limonène/ γ -terpinène/ ρ -cymène.

[Bekhechi et al. \(2010\)](#) a constaté des différences de dominance entre le thymol et l'isothymol, cette différence est due principalement à la station et au stade de récolte, car la plante récoltée des stations d'Ain Témouchent en début de floraison était riche en isothymol et que cette richesse diminue pour que le thymol prends la dominance durant les stades de pleine et fin floraison. Par contre la plante étudiée des stations de la région de Tlemcen garde toujours la dominance en faveur du thymol.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle des graines et de la partie aérienne de cette plante, effectuée par [Balbaa et al. \(1973\)](#), révèle l'existence de deux différents groupes chimiques, soit: thymol/ ρ -cymène/ γ -terpinène pour les graines ou bien du γ -terpinène/ ρ -cymène/thymol pour la partie aérienne.

L'huile essentielle extraite des graines de cette espèce provenant d'Inde est riche en thymol et en γ -terpinène ([Nigram et al., 1963](#)). [Khajeh et al. \(2004\)](#) rapportent également que l'huile essentielle des graines de cette plante, récoltée en Inde, est riche en thymol (49.0%), en γ -terpinène (30.8%) et en ρ -cymène (15.7%). Par contre, un type chimique signalé par [Choudhury et al. \(1998\)](#) travaillant sur l'huile essentielle des graines d'*Ammoides verticillata*, récoltée en Inde, montre de fortes teneurs de carvone (46.2%) et de limonène (38.1%), alors que celles de

provenance de Pakistan (Ashraf & Batly, 1975) et de Turquie (Chialva et al., 1993), ont démontrés la présence d'une teneur élevée en thymol, ρ -cymène et en γ -terpinène.

Dans une autre étude portée par Demissew (1993), sur l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* d'Ethiopie, a démontré sa richesse en carvacrol (69%).

D'autre part, l'analyse chimique de huile essentielle de graines de cette même espèce, provenant d'Australie, a permis à Gersbach et Reddy (2002), de constater une forte teneur en thymol (45.6%), en γ -terpinène (23.8%) et en ρ -cymène (21.25%).

Une étude phytochimique réalisée par Mahboubi & Kazempour (2011), sur les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* fourni par la compagnie « Barijdes essences pharmaceutiques d'Iran » a révélé que Thymol (45.9%), γ -terpinène (20.6%) et ρ -cymène (19%) étaient les constituants majeurs suivi par méthacrylate d'éthylène (6.9%), β -pinène (1.9%), et hexadecane (1.1%).

Les huiles essentielles de cette espèce sont caractérisées par une variabilité de la composition chimique, due probablement au stade du développement de cette espèce. Certains travaux montrent que le γ -terpinène prédomine au début du cycle végétatif de la plante, ensuite, durant la floraison, une grande quantité de ρ -cymène et une certaine teneur en thymol apparaissent. Par contre, à la maturité de la plante, les composés phénoliques dont principalement le thymol se trouvent en abondance (Choudhury et al., 1998).

Dans le même genre, l'étude réalisée sur les huiles essentielles d'*Ammoides atlantica* collecté des environs de Sétif (Est d'Algérie) par Laouer et al., (2008), nous donne une idée sur les composés majoritaire avec le Thymol (53.2%) comme composé majoritaire, λ -terpinène (19.4%) et ρ -cymène (10.6%). Ces résultats montrent que malgré qu'*Ammoides atlantica* est une espèce différente par rapport à *Ammoides verticillata* mais elles peuvent appartenir au même groupe chimique.

Par contre, Boudiar et al. (2011) a constaté que les composés et des teneurs de l'huile essentielle d'*Ammoides atlantica* collectée à Jijel (Est d'Algérie) est complètement différente avec des teneurs de 17.9% pour safranal, 17.6% pour endo-Borneol, 15.5% pour le Chrysanthenone, 12.1% pour le Filifolone et 11.8% pour le Camphore.

III.3.2. L'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*

La recherche des travaux traitant l'huile essentielle de *T. ciliatus* a donné un nombre vraiment réduit ce qui prouve que cette plante n'a pas pris sa part entière dans la recherche.

L'analyse par chromatographie de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* nous dévoile trente-trois (33) constituants et qui sont identifiés par une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Fig. 12), dont la majorité sont des monoterpènes (96.9%), alors que les sesquiterpènes ne sont présente qu'à 2.7% (tableau 10).

Le taux des monoterpènes oxygénés identifiés représente 75.4% de la composition globale. Le carvacrol est le monoterpène oxygéné majoritaire avec un taux de l'ordre de 74.4%, suivi par le linalool avec 1.7%. Par contre le thymol est présent en très faible teneur (0.2%). Sept autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés : le terpinène-4-ol (0.7%), Bornéole (0.3%) le Nérale, le Géraniale, l'alcool cumine et l'acétate de carvacryle (0.2% chacun).

Lors de l'analyse de ces huiles essentielles, nous avons caractérisé dix-sept monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 21.5% de la composition chimique globale, avec prédominance du p -cymène (8.3%), suivi par le γ -terpinène (5.9%), β -Myrcène (2%), α -terpinène (1.6%), α -Thujène (1.1%), α -Pinène (0.9%), β -Pinène, α -Phellandrène, β -Phellandrène (0.3% chacun) Camphène, 1-Octén-3-ol, limonène, Hydrate *trans*-Sabinène, Terpinolène (0.2% chacun) δ -3-Carène, la (*E*)- β -Ocimène (0.1% chacun) et l'hydrate de *cis*-Sabinène comme traces.

En plus des sesquiterpènes avec un taux globale de 2.7%, représentés par des sesquiterpènes oxygénés comme le (*E*)- β -Caryophyllène (1.8%), α -Humulène (0.2%), du β -Bisabolène et du(*E*)- α -Bisabolène (0.1% chacun).

Le composé représentant les sesquiterpènes oxygéné est l'oxide de Caryophyllène avec un taux de 0.5%.

D'autres travaux rapportent que la teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine des plantes ; c'est le cas pour *T. ciliatus* de l'Algérie, pour lequel Giordani *et al.* (2008) ont montré que l'huile essentielle de *T. ciliatus* de Djebel Ansel (Algérie) est dominée par le thymol (60.52%).

En revanche, le carvacrol (72.4-80.3%) est le constituant principal de huit provenances de *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* de la région de Tlemcen (Algérie) (Bousmaha-Marroki *et al.*, 2007).

L'étude faite par Hazzit *et al.* (2006) montre que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *T. munbyanus* (*T. ciliatus*) sont le thymol (37.7%), *p*-cymène (14.2%) et le γ -terpinène (10.1%).

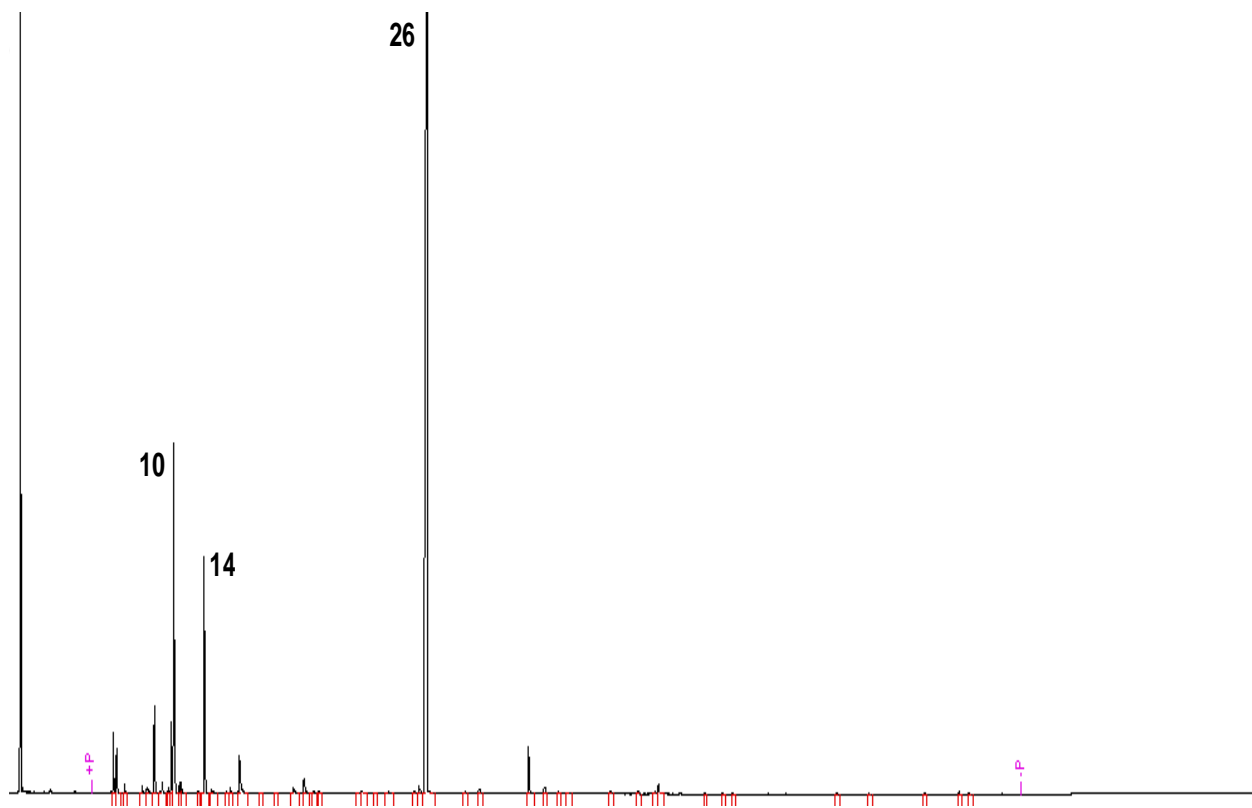


Figure 12 : Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* (10 = p-cymene, 14 = γ -terpinene, 26 = carvacrol).

Tableau 10 : Composition en pourcentage (v/v) des huiles essentielles isolées de la partie aérienne de *Thymus ciliatus*

Composés	RI	RI^L	<i>Thymus Ciliates</i> (%) (v/v)
α -Thujene	924	929	1.1
α -Pinene	930	937	0.9
Camphene	938	938	0.2
1-Octen-3-ol	961	961	0.2
β -Pinene	963	963	0.3
β -Myrcene	975	975	2.0
α -Phellandrene	995	1003	0.3
δ -3-Carene	1000	1004	0.1
α -Terpinene	1002	1005	1.6
<i>p</i> -Cymene	1003	1008	8.3
β -Phellandrene	1005	1009	0.3
Limonene	1009	1016	0.2
(E)- β -Ocimene	1027	1026	0.1
γ -Terpinene	1035	1035	5.9
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	1047	0.2
Terpinolene	1064	1064	0.2
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	1081	t
Linalool	1074	1082	1.7
Borneol	1134	1139	0.3
Terpinen-4-ol	1148	1153	0.7
α -Terpineol	1159	1157	0.1
Neral	1210		0.2
Geranial	1240	1249	0.2
Cumin alcohol	1260	1270	0.2
Thymol	1275	1278	0.2
Carvacrol	1286	1299	71.4
Eugenol	1327	1325	0.1
Carvacryl acetate	1348	1348	0.2
(E)- β -Caryophyllene	1414	1415	1.8
α -Humulene	1447	1439	0.2
β -Bisabolene	1500	1511	0.1
(E)- α -Bisabolene	1536		0.1
Caryophyllene oxide	1561	1583	0.5
% d'identification			99.9
Composés regroupés			
hydrocarbones Monoterpène			21.5
monoterpènes contenant l'Oxygène			75.4
hydrocarbones Sesquiterpène			2.2
sesquiterpènes contenant l'Oxygène			0.5
Autres			0.3

➤ RI – Indice de rétention relativement calculé à C₉-C₁₆ *n*-alkanes sur la colonne DB-1;
 ➤ RI^L – Indice de rétention selon la littérature reporté par [Lindson & Mallar \(2014\)](#) sur les indices de rétention de DB-1 ou colonne similaires (100% Dimethylpolysiloxane).

➤ t - trace (<0.05%).

➤ Le pourcentage des composés d'huiles essentielles a été calculé par une méthode normalisée des différents aire de pics et une moyenne de deux injections pour chaque huile essentielle a été effectuée suivant la méthode décrite par [Figueiredo et al., \(2010\)](#).

Dans une recherche réalisée par [Khadir et al. \(2013\)](#) sur les huiles essentielles de *T. munbyanus* ssp. *Ciliatus* récoltée à Tlemcen (Ouest d'Algérie), ils ont remarqué que cette huile est composée principalement de Carvacrol (80.1%) suivi par du *p*-Cymene (7.1%) et du γ -Terpinene (4.2%).

La composition chimique des huiles essentielles du Maroc montre également une grande diversité en ce qui concerne les composés majoritaires de cette essence.

En effet, [Benjlali et al. \(1987\)](#) en étudiant la composition chimique de 14 échantillons de *T. ciliatus* de différentes régions du Maroc ont constaté que la teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction de l'origine de la plante : le thymol (0.3-29.3%), le carvacrol (0.4- 21.7%), l'acétate d' α -terpenyl (0-42.9%), l'acétate de geranyl (0-21.7%), le butyrate de geranyl (0-26.7%), le camphre (0.4-28.4%) et le bornéol (0.1- 31.6%).

De son côté, [El Ajjouri \(2013\)](#) a constaté que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*, récoltée dans la région d'Azrou (Maroc), est constituée principalement par le thymol (44.20%), le β -E-ocimène (25.80%) et l' α -terpinène (12.30%).

Dans le même genre, [Hazzit et al. \(2006\)](#) a constaté que l'huile essentielle de *T. guyonii*, récolté de la Kabylie, est caractérisée par *p*-cymène (18.6%) et γ -terpinène (13.0%) comme composés majoritaires. Le carvacrol (41.5%) et le terpinène (16.6%) sont les composés majoritaires de *T. pallescens*. Par contre, l'huile essentielle de *T. numidicus* est caractérisée par le R-terpinéol comme composé majoritaire avec un taux de 34.4%.

Par contre, [Giordani et al. \(2008\)](#) a enregistré une dominance du Thymol (66.31 – 57.20%) dans les huiles essentielles de *T. numidicus* récolté de deux régions de Souk Ahras (Est d'Algérie), suivi par le Linalool (8.62 – 9.26%), le γ -terpinène (6.12 – 9.19%) et le *p*-Cymène (6.20 – 7.55%). Dans la même étude *T. algeriensis* donne des composants extrêmement différents avec α -Pinène (27.14 – 25.52%) comme composé majoritaire, Camphore (8.77 – 8.45%) le 1,8 Cinéole (7.69 – 7.68%) et le Sbinène (5.25 – 5.61%) en plus d'une panoplie de composés avec de faibles teneurs.

L'étude des huiles essentielles de deux espèces de thym de Blida (centre algérie), [Houmani et al. \(2002\)](#) ont remarqué que les composés dominants de l'huile essentielles de *T. willdenowii* étaient le carvacrol (51.3%); *p*-cymene 15.2%); thymol (15.1%) par contre ceux majoritaires de *T. algeriensis* étaient le linalool (40.2%) ; thymol (33.7%) ; *p*-cymene (5.5%).

III.3.3. L'huile essentielle de *Curcuma longa*

L'analyse par chromatographie de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* nous fait apparaître trente-neuf (39) composés identifiés dans cette huile essentielle (Fig. 13) représentant 84.2% de la totalité des huiles essentielles, dont 65% sont des sesquiterpène oxygénés, 8.1% sont des monoterpènes hydrocarbonés, 7.7% sont des sesquiterpènes hydrocarbonés, 1.8% sont des monoterpènes oxygéné (tableau 11).

Le tumèrone aromatique est le composé majoritaire avec un taux de l'ordre de 35.0%, suivi par le Curlone (14.2%) et le tumèrone avec (11.8%) et l'ensemble constituent le groupe des sesquiterpènes oxygéné. D'autres composés sont aussi identifiés dont le *p*-Cymène (4.1%), α -Phellandrène (2.7%), Curcumène aromatique (2.6%), le β -Sesquiphellandrene (2.5%), le *trans*- α -Atlantone (2.0%). Le reste des composés présents dans la composition de cette huile essentielle ne dépassent pas 2.0%. Il faut signaler aussi que le carvacrol et le thymol font partie des composés minoritaires avec 0.2% chacun.

Le composé majoritaire des huiles essentielles des rhizomes la variété Roma de *Curcuma longa* est l'ar-tumérone (49.1%) suivi par curlone (16.8%), α -phellandrene (5.3%), ar-curcumene (3.5%). Le même composé a été majoritaire dans les huiles essentielles des rhizomes de *Curcuma longa* de différentes origines étudié par Leela et al. (2002).

Dans une étude faite par Ferreira et al. (2013), les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Curcuma longa* sont l'ar-turmérone (33.2%), α -turmérone (23.5%) et β -turmérone (22.7%). D'autres chercheurs ont aussi obtenu l'ar-turmérone comme composé majoritaire des huiles essentielles de *Curcuma longa* (Singh et al., 2002 ; Jayaprakasha et al., 2005 ; Péret-Almeida et al., 2008 ; Dhingra et al., 2007 ; Singh et al., 2010a).

Nos résultats d'analyse chimique de l'huile essentielle ont encore été comparés avec d'autres études comme celle de Chen et al. (1983) qui ont marqué la présence de l'ar-tumérone avec une proportion de 8.4%, de même Li et al. (1997) ont signalé un taux de 6.4% du même composé, 18% signalé par Zhu et al. (1995) en plus de Sharma et al. (1997) qui ont signalé un taux compris entre 16.7 et 25.7%.

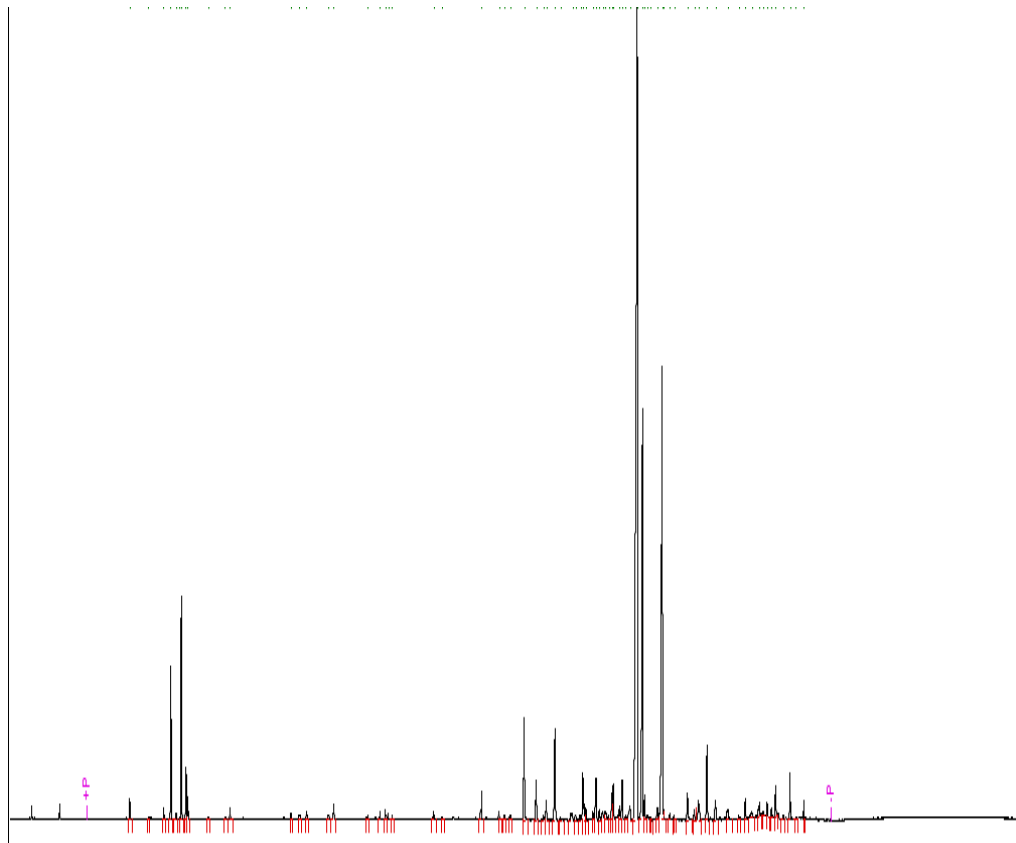


Figure 13 : Chromatogramme d'une analyse par CPG de l'huile essentielle de *Curcuma longa*.

Tableau 11 : Composition en pourcentage (v/v) des huiles essentielles isolées des rhizomes de *Curcuma longa*.

Composés	RI	RI^L	<i>Curcuma longa</i> (%) (v/v)
α -Thujène	924	929	t
α -Pinène	930	937	0.3
Sabinène	958	961	t
6-Methyl-5-hepten-2-one	960	966	t
β -Pinène	963	963	t
β -Myrcène	975	975	0.2
α -Phellandrène	995	1003	2.7
δ -3-Carène	1000	1004	0.1
α -Terpinène	1002	1005	t
<i>p</i> -Cymène	1003	1008	4.1
1,8-Cinèole	1005	1012	1.0
β -Phellandrène	1005	1009	0.1
Limonène	1009	1016	0.4
γ -Terpinène	1035	1035	t
2,5-Dimethyl styrene	1059	1080	t
Terpinolène	1064	1064	0.2
Linalool	1074	1082	t
<i>cis-p</i> -2-Menthen-1-ol	1110		t
<i>p</i> -Methyl acétophenone	1143	1154	t
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1148	1171	0.2
α -Terpinèol	1159	1157	0.1
aldehyde Cumine	1200	1200	0.1
alcool Cumine	1260	1270	t
Thymol	1275	1278	0.2
Carvacrol	1286	1299	0.2
β -Caryophyllène	1414	1415	0.7
α -Humulène	1447	1439	0.1
<i>trans</i> - β -Farnesene	1455	1467	0.2
<i>ar</i> -Curcumène	1474	1473	2.6
α -Zingiberène	1492	1489	1.1
β -Bisabolène	1500	1503	0.5
β -Sesquiphellandrene	1508	1516	2.5
6- <i>p</i> -Tolylheptan-2-one	1551		1.5
<i>ar</i> -Tumèrol	1558	1568	1.3
<i>ar</i> -Tumèrone	1607	1616	35.0
Tumèrone	1612		11.8
Curlone	1634		14.2
α -Oxobisabolène	1703		0.8
<i>trans</i> - α -Atlantone	1727		2.0
% of identification			84.2

Composés	RI	RI ^L	<i>Curcuma longa</i> (%) (v/v)
Composés regroupés			
hydrocarbones Monoterpène			8.1
monoterpènes contenant l'Oxygène			1.8
hydrocarbones Sesquiterpène			7.7
sesquiterpènes contenant l'Oxygène			65.1
Autres			1.5

- RI – Indice de rétention relativement calculé à C₉-C₁₆ *n*-alkanes sur la colonne DB-1;
- RI^L – Indice de rétention selon la littérature reporté par [Lindson & Mallar \(2014\)](#) sur les indices de rétention de DB-1 ou colonne similaires (100% Dimethylpolysiloxane).
- t - trace (<0.05%).
- Le pourcentage des composés d'huiles essentielles a été calculé par une méthode normalisée des différents aire de pics et une moyenne de deux injections pour chaque huile essentielle a été effectuée suivant la méthode décrite par [Figueiredo et al., \(2010\)](#).

Par contre [Priya et al. \(2012\)](#) ont obtenu le β -sesquiphellandrene comme compose majoritaire avec un taux de 22.8% suivi par terpinolène (9.5%) et le curcumène aromatique (7.8%).

[Singh et al., \(2011\)](#) signalent que la présence d'un taux élevé l'ar-tumérone conduit à l'augmentation de la demande et l'utilisation internationale de cultivars contenant ce genre de composé et qui va conduire à la valorisation médicinale de leurs huiles essentielles.

III.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles extraites

Lors de cette étude, nous avons testé les huiles essentielles des différentes espèces végétales vis-à-vis de souches bactériennes citées précédemment, en appliquant deux méthodes.

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité de ces huiles essentielles par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) suivi par détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) en utilisant la méthode de contact direct en milieu gélosé.

III.4.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*

III.4.1.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion sur milieu gélosé est une méthode qualitative, simple, appliquée en routine à toute bactérie considérée comme pathogène. Cette méthode est inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles

essentiels par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle (De Billerbeck, 2007).

L'activité inhibitrice des huiles essentielles de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* a été étudiée sur des bactéries à Gram + (*S. Thyphimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* EGD, *L. monocytogenes* A9, *L. monocytogenes* T8) et Gram - (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA 5, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ECL 3463, *Escherichia coli* ECL 6611, *Escherichia coli* DSM 1077), en plus d'un témoin positif (chloramphénicol) après 24 heures de co-culture à 37°C sur un milieu solide (Muller Hinton).

Le premier constat tiré à partir du [tableau 12](#), est que l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a exercé un effet antibactérien qui s'est traduit par des zones d'inhibitions qui n'ont pas dépassé 14 mm (comprise entre 13.6 mm et 9.67 mm), en constituant un seul groupe statistique ($P < 0.05$), sans que le type de microorganisme (Gram + ou Gram -) n'affecte cette efficacité comparé à la Chloramphénicol qui a exercé un fort effet inhibiteur qui s'est traduit par des zones d'inhibitions comprise entre 21 mm et 32.83 mm sur l'ensemble des souches testées, enregistrant une efficacité statistiquement ($P < 0.05$) supérieure à celle de l'huile essentielle.

III.4.1.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La concentration minimale inhibitrice c'est une faible concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe toute croissance visible d'un microorganisme après 24h d'incubation dans un milieu de culture adéquat. C'est l'approche la plus utilisée pour évaluer *In vitro* l'efficacité d'une substance antimicrobienne (Nejjah et al., 2006). En terme d'ordre de grandeur, les CMI correspondent à des valeurs proches du µg/mL et dans tous les cas plus la CMI est faible, plus l'antibactérien est actif (Nicolas et Daniel, 1998).

Notre 1^{ère} constatation faite sur le [tableau 13](#) est que la CMI des huiles essentielles des feuilles d'*Ammoides verticillata* sur la croissance de toutes les souches quelque soit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 et ATCC 43300) ou sur les souches d'*Escherichia coli* (ATCC 25922, ECL 3463 et ECL 6611) était de 1.843 mg/mL.

Selon l'étude ethnobotanique effectué sur *Ammoides verticillata*, plusieurs auteurs la considère comme une plante médicinale grâce au pouvoir antibactérien et antifongique de ses huiles essentielles (Dubey et Mishra, 1990 ; Srivastava et al., 1999).

D'après l'étude réalisée par [Abdelouhid et Bekhechi \(2002\)](#) sur les huiles essentielles d'*A. verticillata*, les valeurs de la CMI sont comprises entre 557.83 µg/mL et 1278.30 µg/mL pour *E. coli* et 650.81 µg/mL pour *S. aureus*. En comparant ces résultats avec les nôtres, nous remarquons que l'effet inhibiteur de l'huile essentielle étudiée dans notre cas est nettement plus élevée par rapport aux résultats de ces auteurs.

Le screening de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de quelques plantes médicinales dont parmi *A. verticillata* a permis à [Upadhyay et al. \(2010\)](#) d'obtenir des zones d'inhibitions de l'ordre de 23.0mm pour *Escherichia coli* (ATCC 25922) et 21.13mm pour *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ce qui mentionne l'efficacité de la plante comparée à celle étudiée dans notre cas, par contre dans la méthode de CMI, uniquement *Escherichia coli* (ATCC 25922) qui a été fortement inhibée car avec un volume de 0.125µL/mL ils ont eu une inhibition totale, en revanche vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ils ont enregistré une CMI de l'ordre de 4µL/mL.

En étudiant l'activité antimicrobienne d'*Ammoides verticillata* collectée de la station expérimentale de l'université de Tahrán (Iran), [Goudarzi et al. \(2011\)](#) ont enregistré une activité antibactérienne plus importante que la nôtre par l'obtention des zones d'inhibitions de 22mm pour *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), 21mm pour *Escherichia coli* (ATCC 25922), 23mm pour *Salmonella typhimurium* (ATCC 1731). Ce qu'il faut signaler c'est que la quantité d'huile essentielle mise dans le puits était de 5µL ce qui peut expliquer ce taux élevé. De même l'efficacité de ces huiles sur les deux souches *S. aureus* ATCC 29213 et *E. coli* ATCC 25922 réalisée par la méthode de CMI a donné une concentration de l'ordre de 0.031% (v/v) ce qui montre une efficacité nettement plus importante que celle des huiles utilisées dans notre expérimentation.

La variabilité de l'activité antibactérienne des plantes est étroitement liée à la composition chimique de leurs huiles essentielles ; [Pellicuer et al., \(1980\)](#) ainsi que [Sanny & Gopalakrishnakone \(2010\)](#), ont montré que les huiles essentielles qui sont utilisées comme agents de saveur pour aliments, possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne attribué à leur teneur élevée en dérivés phénoliques comme le carvacrol et le thymol.

Tableau 12 : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*.

Souches	<i>Ammoides verticillata</i>	Chloramphenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11.8 ± 2.6 ^a	21 ± 1.41 ^{bc}
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 5	11.67 ± 1.53 ^a	21.33 ± 2.52 ^{bc}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	11.5 ± 2.7 ^a	24.67 ± 1.04 ^c
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13.6 ± 1.8 ^a	27 ± 1.41 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	11.3 ± 1.4 ^a	29.17 ± 1.03 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	12 ± 4.2 ^a	28.33 ± 1.18 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> DSM 1077	12.36 ± 0.76 ^a	27 ± 1.5 ^{cd}
<i>Salmonella Thyphimurium</i> ATCC 14028	9.67 ± 2.36 ^a	28.83 ± 2.31 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	13 ± 0.5 ^a	29.67 ± 0.29 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	13.67 ± 0.76 ^a	32.83 ± 1.04 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> A9	12.33 ± 0.76 ^a	30.5 ± 1 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> T8	11.67 ± 3.55 ^a	30 ± 2.12 ^{cd}

Tableau 13 : Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*.

Bactéries	Concentrations en huiles essentielles d' <i>A. verticillata</i> (en mg/mL)							
	3.686	2.304	1.843	0.921	0.460	0.230	0.184	0.092
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : Croissance bactérienne - : Absence des bactéries

Plusieurs études ont approuvé que l'importance de la bio-activité des huiles essentielles d'*A. verticillata* est en relation avec sa teneur en thymol (Goudarzi et al., 2011 ; Paul et al., 2011 ; Moazeni et al., 2012). Effectivement dans les études menée par Hoferl et al., (2009) et celle d'Amarti et al. (2010), les huiles essentielles des plantes riches en thymol ont exercé une forte activité antimicrobienne. De même, Dorman et Deans (2000) ont montré que le thymol est le composé qui possède le large spectre d'activité antimicrobien vis-à-vis de 25 bactéries testées.

Lambert et al. (2001) et juven et al. (1994) ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie à la protéine membranaire et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne.

D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzyme y compris ceux impliqué dans la production d'énergie et la synthèse de structure (Trombetta et al. 2005).

Ce manque d'activité peut être attribué au faible taux de composés réputé pour avoir une activité antimicrobienne comme le thymol et ceci dépend du stade végétatif de la plante car malgré que cette dernière a été récolté à la même période que les autres plantes mises en évidence par les autres auteurs mais elle n'avait pas atteint un stade de maturité vue l'altitude et les conditions climatiques de la saison ainsi que la région de collècte et ce phénomène a été expliqué et approuvé par Choudhury et al., (1998) et aussi par Bruneton (1999).

Ce qu'on peut dire est que l'interaction entre le pathogène et l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* en plus de sa flaveur recherché par la population démontre qu'elle recèle un potentiel qui peut être exploité.

III.4.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*

III.4.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Comparée à *Ammoides verticillata*, *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* a exercé une forte activité antibactérienne qui s'est traduite par des zones d'inhibition de l'ordre de 12.5mm, enregistré par la mise en évidence de cette huile essentielle sur *S. aureus* ATCC 25923 et qui s'est avéré la plus résistante accompagnée statistiquement ($P < 0.05$) par *S. aureus* ATCC 43300 (avec 13.63 mm), de leurs côtés *E. coli* ECL 6611, *Escherichia coli* DSM 1077. *S. Thyphimurium* ATCC 14028 et *L. monocytogenes* A9 ont marqué une différence statistique

($P < 0.05$) comparées aux premières souches en enregistrant des zones d'inhibitions respectives de l'ordre de 14.17 mm, 14.67 mm, 15.67 mm et 16 mm. Entre les deux groupes, pour être marquée comme plus sensibles que les premières. Il faut signaler le groupe de souches qui a enregistré des zones inhibitrices statistiquement intermédiaire ($P < 0.05$) et qui regroupe *E. coli* ATCC 25922 (13.79 mm), *S. aureus* MRSA 5 (13.83 mm), *L. monocytogenes* T8 (13.83 mm) et *Escherichia coli* ECL 3463 (13.83 mm), pour en arriver à *L. monocytogenes* EGD et *L. monocytogenes* Scott A qui se sont montrées les plus sensibles à cette huile essentielles en enregistrant des zones d'inhibitions de l'ordre respectif de 22.5 mm et de 17 mm, cette sensibilité se rapproche de celle de la chloramphénicol (tableau 14),

III.4.2.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Le tableau 14 nous indique clairement que l'huile essentielle a été plus efficace sur les bactéries à Gram (-) représentées par *Escherichia coli* avec des CMI de l'ordre respectif de 0.977 $\mu\text{L/mL}$ pour les deux premières souche (ATCC 25922 et ECL 3463) et de 0.488 $\mu\text{L/mL}$ pour la troisième souche (ECL 6611), comparé aux bactéries à Gram (+) représentées par *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300) qui ont montrées plus de résistance pour enregistrer des CMI de 2.225 $\mu\text{L/mL}$ pour (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et de 1.954 $\mu\text{L/mL}$ pour (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300) (tableau 15).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la même espèce étudiée dans notre cas *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*, Bousmaha-Marroki et al. (2007) ont enregistré des CMI similaires aux notre (avec 0.98mg/mL) lorsqu'elle est confronté à *Escherichia coli* par contre cette huile essentielle a montré plus d'efficacité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (avec 0.92mg/mL) que la notre.

L'étude antibactérienne montée par Khadir et al. (2013) sur les huiles essentielles de *T. munbyanus* ssp. *Ciliatus* récoltée à Tlemcen (Ouest d'Algérie) vis-à-vis de différentes souche de *Staphylococcus aureus* (MRSA), a révélé des diamètres de zone d'inhibition allant de 15 à 40mm ce qui est nettement supérieur à nos résultats.

Comparée à notre huile essentielles, celle de *Thymus algeriensis* Boiss et Reut de Tunisie étudiée par Zouari et al. (2011) a exercé un effet antibactérien qui s'est traduit par un diamètre d'inhibition vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 de l'ordre de 14 mm ce qui en témoigne de l'efficacité des huiles essentielles de *T. ciliatus*.

La même constatation d'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Thymus spathulifolius* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 32 mm sur *Escherichia coli*-A1 a été faite par [Atalay et al. \(2004\)](#) mais avec des disques imprégnés de 10 μ L d'huile essentielle.

Suivant l'étude réalisée par [Mutai et al., 2009](#) ; L'huile essentielle de *Thymus fontenesii* pure a exercé une forte activité sur toutes les souches bactériennes testés. Les diamètres d'inhibitions variaient de 13.33mm à 58mm, avec le plus grand diamètre obtenue sur *Staphylococcus aureus* (58.5mm) et le plus petit sur *Pseudomonas aeruginosa* (13.33mm), ce qui signifie que les huiles essentielles du Thym étudié possèdent une large activité antibactérienne sur les bactéries Gram(+) et Gram(-).

Selon [Pibiri \(2006\)](#), la plus grande surface d'inhibition était dans le cas d'*Acinetobacter baumannii* suivi par les deux souches de *S. aureus*, ces dernières sont donc les plus sensibles à l'huile essentielle de *T. fontenesii*.

[Nodorostova et al. \(2009\)](#) reportent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus pulegioides*, *Thymus serpyllum* et *Thymus vulgaris* envers *Escherichia coli* ATCC 25922 est de l'ordre de 0.033 μ L/cm².

Pour cette souche bactérienne, les aromatogrammes ont été réalisés avec différentes espèces endémiques de Thym portugais dont les composés majoritaires étaient le linalol et 1,8-cinéol. Les diamètres d'inhibition pour 3 μ L d'HE varient entre 6mm (le diamètre de disque) et 15mm pour l'espèce active. Ces résultats montrent que la présence de phénols, Thymol ou carvacrol, augmente drastiquement l'activité des huiles essentielles de la même espèce pour une même souche ([Faleiro et al., 2003](#)).

L'analyse chimique de cette huile essentielle a révélé l'existence du carvacrol comme compose majoritaire.

Des chercheurs ont attribué la forte activité antimicrobienne des huiles essentielles au thymol et carvacrol. Ces deux composés sont similaires du point de vue structural avec différence de localisation du radical hydroxyle sur le noyau phénolique ([Burt, 2004](#)).

Effectivement dans l'étude menée par [Amarti et al. \(2010\)](#), les huiles essentielles de *Thymus beleicherianus* et *Thymus ciliatus* riches en thymol ont exercé une forte activité antimicrobienne. De même, [Dorman & Deans \(2000\)](#) ont montré que le thymol est le composé qui possède un large spectre d'activité antimicrobien vis-à-vis de 25 bactéries testées.

Tableau 14 : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*.

Souches	<i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i>	Chloramphénicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12.5 ± 0.21 ^a	21 ± 1.41 ^{bc}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	13.63 ± 1.55 ^a	24.67 ± 1.04 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 5	13.83 ± 0.29 ^{ab}	21.33 ± 2.52 ^{bc}
<i>Listeria monocytogenes</i> T8	13.83 ± 0.76 ^{ab}	30 ± 2.12 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> A9	16 ± 5.22 ^b	30.5 ± 1 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	22.5 ± 1.8 ^{bc}	29.67 ± 0.29 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	17 ± 3.91 ^{bc}	32.83 ± 1.04 ^{cd}
<i>Salmonella Thyphimurium</i> ATCC 14028	15.67 ± 1.04 ^b	28.83 ± 2.31 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13.79 ± 0.12 ^{ab}	27 ± 1.41 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	13.83 ± 2.1 ^{ab}	29.17 ± 1.03 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	14.17 ± 1.51 ^b	28.33 ± 1.18 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> DSM 1077	14.67 ± 0.29 ^b	27 ± 1.5 ^{cd}

Tableau 15 : Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*.

Bactéries	Concentrations d'huiles essentielles de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>eu-ciliatus</i> (en mg/mL)							
	3.696	2.225	1.954	0.977	0.488	0.225	0.195	0.097
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 G-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 G+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : Croissance bactérienne - : Absence des bactéries

L'efficacité antimicrobienne du thymol et du carvacrol se manifeste par l'affectation de la perméabilité de la membrane cellulaire (Lambert et al., 2001).

Il a été prouvé que ces deux composés sont capable de désagréger la membrane extérieure de la cellule des bactéries à Gram (-), en relâchant les lipopolysacharides et en augmentant la perméabilité des membranes cytoplasmiques à l'ATP (Helander et al., 1998). L'étude faite par Lambert et al. (2001) sur l'huile essentielle d'Origan riche en carvacrol a mis le point sur la perte des ions de phosphate des cellule de *S. aureus* et *P. aeruginosa* causé par ce composé.

Le deuxième composé majoritaire de cette huile essentielle est le p-cymène. Ce composé est considéré comme précurseur biologique du carvacrol, il cause des gonflements de la membrane cytoplasmique qui dépasse celle du carvacrol (Ultee et al., 2002). Une fois seul de p-cymène n'est pas efficace comme agent antimicrobien (Dorman and Deans, 2000; Juliano et al., 2000) mais associé au carvacrol, l'action synergétique a été remarqué (Ultee et al., 2000).

Dans cette étude on remarque également, que l'appartenance des souches bactériennes à Gram (+) ou à Gram (-) n'influe pas sur leur sensibilité. En outre, Ouattara et al., (1997) et Dorman et Deans, (2000) ont aussi remarqué que la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram de la bactérie.

III.4.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Curcuma longa*

III.4.3.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'huile essentielle de *Curcuma longa* a exercé un effet antibactérien qui s'est traduit par des zones d'inhibitions avec un maximum de 12 mm enregistré en contact d'*Escherichia coli* ATCC 25922 qui s'est montrée la plus sensible suivie par *Escherichia coli* ECL 6611 (11.8 mm) puis par *Escherichia coli* ECL 3463 (10.7 mm). Par contre les Staphylocoques ce sont montré moins sensibles à l'huile essentielles, sans enregistrer une différence significative ($P < 0.05$), avec des zones d'inhibition de l'ordre de 9.26 mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et de 8.93 pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tableau 16).

III.4.3.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Le tableau 17 confirme les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur gélose par l'obtention de CMI identiques pour les différentes souches d'*Escherichia coli* avec 1.906 mg/mL, par contre les deux souches *Staphylococcus aureus* ont montré une résistance à l'huile

essentielle testée en enregistrant une CMI plus importante qu'*Escherichia coli* de l'ordre de 2.3825 mg/mL.

Angel et al. (2012), en étudiant l'effet antibactérien des huiles essentielles des rhizomes de neuf espèces de *Curcuma* (*C. aeruginosa*, *C. amada*, *C. aromatica*, *C. brog*, *C. caesia*, *C. malabarica*, *C. rakhakanta*, *C. sylvatica* et *C. zedoaria*) par la méthode de disque (10µL par disque) vis-à-vis de trois souches bactériennes *Staphylococcus aureus* MTCC 902 et *Bacillus Subtilis* MTCC 2756 (gram positif) et *E. coli* MTCC 2622 (Gram négative), la plupart des huiles essentielles ont exposé une activité antibactérienne contre les bactéries utilisées mais celles de *C. aeruginosa*, *C. amada* et *C. aromatica* a été la plus remarquable en enregistrant l'activité inhibitrice la plus élevée avec des diamètre de compris entre 28 et 34 mm vis-à-vis de toutes les bactéries testées.

De leurs côtés, Apisarlyakul et al. (1995) ont constaté une excellente efficacité des huiles essentielles de *Curcuma longa* vis-à-vis des dermatophytes comparé à la curcumin brute.

Sharma et al. (1997) ont enregistré un important diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 28 mm vis-à-vis de *S. aureus* en étudiant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Curcuma longa* qui a dépassé même celui de la gentamycine qui a enregistré 17.0mm vis-à-vis de la même souche bactérienne.

Par contre, Negi et al. (1999) parlent d'une faible inhibition vis-à-vis d'*Escherichia coli*, et même de *Staphylococcus aureus*.

En effet, les différences de résultats pourraient être attribuées à la nature même de la composition chimique des huiles, car selon Oussalah et al. (2006), l'activité biologique des huiles essentielles est à mettre en relation avec sa composition chimique.

Dans ce contexte, Apisarlyakul et al. (1995) ont attribué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Curcuma longa* à l'importance de son composé turmérone aromatique. Cette déduction a été aussi supportée par Singh et al. (2011).

Gill et al. (2002) ont trouvé que l'huile essentielle de *Curcuma longa* a exercé une importante activité antimicrobienne que celle des composés majoritaires utilisés seuls. Ce constat conduit à dire que les composés minoritaires peuvent avoir un important rôle soit additif ou synergétique.

Tableau 16 : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des différentes souches bactériennes confrontées aux huiles essentielles de *Curcuma longa*.

Souches	<i>Curcuma longa</i>	Chloramphénicol
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12.0 ± 1 ^a	27 ± 1.41 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	10.7 ± 0.81 ^a	29.17 ± 1.03 ^{cd}
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	11.8 ± 4.7 ^a	28.33 ± 1.18 ^{cd}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.93 ± 1.71 ^a	21 ± 1.41 ^{bc}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	9.26 ± 0.7 ^a	24.67 ± 1.04 ^c

Tableau 17 : Viabilité des différentes souches bactériennes confrontées à différentes concentrations d'huiles essentielles de *Curcuma longa*.

Bactéries	Concentrations en huiles essentielles de <i>C. longa</i> (en mg/mL)							
	3.812	2.3825	1.906	0.953	0.4765	0.2382	0.1906	0.0953
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 3463	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ECL 6611	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	-	+	+	+	+	+	+

+ : Croissance bactérienne - : Absence des bactéries

III.5. Mesure du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites

Le stress oxydative a été relié à plusieurs problèmes de santé comme l'artériosclérose, le cancer, la maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, le diabète et l'asthme (Edris, 2007). La balance cellulaire des radicaux libres est maintenue par différents antioxydants (Raut & Karuppayil, 2014).

L'antioxydant peut agir sous différents mécanismes comme le piégeage des radicaux libres, par la décomposition des radicaux libres et par la chélation des ions métalliques (Cam, et al., 2009).

Le pouvoir antioxydant des molécules peut être évalué soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro*, des aliments, extraits naturels et antioxydants commerciales, différentes méthodes ont été développées (Alam et al., 2013). Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération formation de radicaux libres. Ces antioxydants peuvent agir selon trois mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène, par transfert d'électron ou bien par inhibition d'enzymes d'oxydations (Miguel, 2010). Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (Prior et al., 2005 ; Miguel, 2010 ; Alam et al., 2013). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de dix tests chimiques.

Toutes ces activités sont reliées aux composés de l'huile essentielle, incluant les composés phénoliques, les flavonoïdes, les terpènes et les sesquiterpènes (Tomaino et al., 2005, Ferguson & Philpott, 2008; Miguel, 2010 ; Viuda-Martos et al., 2011 ; Sanchez-Vioque et al., 2013 ; Raut & Karuppayil, 2014).

Selon Miguel (2010), ces composés font preuve de capacité à piéger les radicaux libres et d'inhiber la peroxydation des lipides par l'action de briser la chaîne entre le peroxyde et le radical piégeur. En plus, les phénols piège directement l'espèce d'oxygène réactif (le radical hydroxyle, peroxydite et l'acide hypochlorique).

De son côté, Amensour et al. (2009) attribue l'activité antioxydante des huiles essentielles à ses propriétés redox, ce qui leur permet de jouer un important rôle dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres, réprimer l'oxygène singulier et triplet, et dans la décomposition des peroxydes.

Dans ce cadre, l'*Origanum majorana*, *Tagetes filifolia*, *Bacopamonnierii* and *C. longa* ont prouvé leurs capacités antioxydantes (Maestri et al., 2006; Tripathi et al., 2007; Maheshwari et al., 2006). D'autres huiles essentielles comme ceux de *Salvia cryptantha* and *S. multicaulis*, *Achillea millefolium*, *M. officinalis*, *M. alternifolia*, *Curcuma zedoaria*; *Ocimum* sp. et *Mentha* sp. possèdent aussi un potentiel antioxydant et une capacité à piéger les radicaux libres (Gulluce et al., 2007; Hussain et al., 2008; Kim et al., 2004; Mau et al., 2003; Politeo et al., 2007; Tepe et al., 2004).

III.5.1. Piégeage du radical DPPH

Les résultats obtenus lors du test de mesure de la réduction du radical DPPH sont représentés dans la figure 14.

Le premier constat extrait de cette figure est que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles des plantes étudiées. Le même constat a été fait par plusieurs auteurs (Bounatirou et al., 2007 ; Aazza et al., 2011b ; Priya et al., 2012).

Nous remarquons que l'huile essentielle d'Ajowan a exercé une excellente activité inhibitrice du radical DPPH en atteignant plus que 80% d'inhibition à une dose de 0.7mg/mL comparée à celle du thym qui a enregistré moins de 70% d'inhibition à une dose similaire pour se faire rattraper par ce dernier aux alentours de 1mg/mL.

Malgré que l'huile essentielle de *Curcuma longa* a enregistré une bonne activité vis-à-vis du radical DPPH, sans atteindre 80% d'inhibition, cette efficacité ne dépasse celle des deux autres huiles.

Ce constat se confirme par les valeurs d'IC₅₀ car on a enregistré 0.0422mg/mL pour l'ajowan suivi par celle du thym avec 0.4705 mg/mL et en dernier lieu le curcuma avec 0.7218mg/mL. Il faut savoir que l'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car cette valeur exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Dans l'étude réalisée par Huang et al. (2011), l'huile essentielle d'ajowan a exercé une efficacité antioxydante remarquable en enregistrant un taux de 70.30% à la concentration de 1µg/mL.

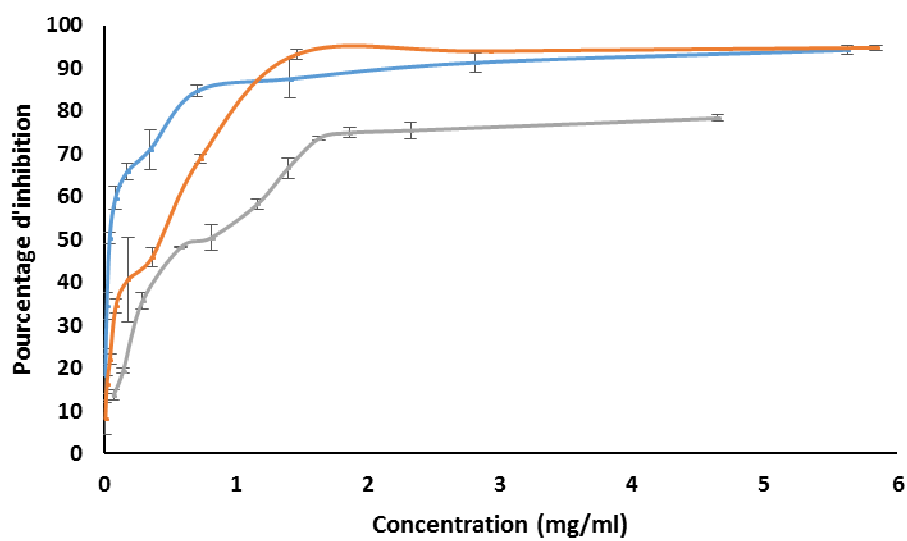


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH* en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

De leurs côtés, [Ishtiaque et al. \(2013\)](#) ont obtenu d'importantes activités inhibitrices sur le radical DPPH en atteignant les 88% d'efficacité.

Dans l'étude réalisée par [Singh et al. \(2007\)](#), l'effet de l'huile essentielle d'Ajowan obtenu des marchés de Gorakhpur (Inde) n'a pas été efficace comme dans les autres études en enregistrant seulement 61.2% avec la dose de 5 μ L d'huiles essentielles.

Dans une autre étude, [Kedia et al. \(2015\)](#) ont enregistré une meilleure efficacité d'Ajowan par une IC₅₀ de l'ordre de 0.467 μ L/mL.

De leurs côtés, [Mazumder et al. \(2014\)](#) ont enregistré une inhibition du radical DPPH de l'ordre de 70.67% et de 66.22% respectivement par 200 μ g/mL l'huile essentielle d'Ajowan et de Cardamome seules, par contre une association entre les deux (à raison de 100 μ g/mL de chaque) a amélioré cette activité en atteignant 73.90% d'inhibition, ce qui conduit à déduire qu'il y a eu une synergie entre les composés des deux huiles essentielle.

L'activité antioxydante de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne de *T. ciliatus* ssp. *coloratus* a démontré une importante activité en enregistrant une IC₅₀ de 0.85 mg/mL ([Kholkhal et al., 2013](#))

Selon [Amarti et al., \(2011\)](#) qui ont étudié l'activité antioxydante de quatre espèces de thym du Maroc, qui ont enregistré un bon effet antioxydant tel que *T. capitatus*, *T. ciliatus* et *T. bleicherianus* avec IC₅₀= 0.069mg/mL, 0.074mg/mL et 0.078 mg/mL respectivement, Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* possède une bonne activité antioxydante.

L'étude conduite par [Jamali et al. \(2012\)](#) a révélé une faible efficacité de l'huile essentielle de *T. ciliatus* (en enregistrant une IC₅₀ de l'ordre de 206.57 μ g/mL) comparée aux autres variétés étudiées du thym du Maroc et celle du BHT (avec une IC₅₀ de 4.21 μ g/mL), ce qu'il faut signaler est que la teneur en thymol et carvacrol de cette plante était nettement inférieure par rapport à celle étudiée dans notre cas et c'est ce qui a causé cette faible activité.

Comparée à une étude faite par [Bounatirou et al. \(2007\)](#) sur les huiles essentielles de *Thymus capitalus* de Tunisie, les huiles essentielles de *T. ciliatus* ont donné une activité antioxydante nettement supérieure que celle de *T. capitalus* et qui ont enregistré un taux d'efficacité antioxydante de l'ordre de 82.7% pour une concentration de l'ordre de 0.5mg/mL.

La même concentration a été faite en comparant l'efficacité antioxydante des huiles essentielles de notre étude avec celles obtenues par [Tepe et al. \(2005\)](#) en étudiant *T. sipyleus* et avec des IC₅₀ de l'ordre de 0.22 mg/mL pour *T. sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans* et 2.67 mg/mL pour *T. sipyleus* subsp. *Sipyleus*.

De même, dans une étude faite sur les huiles essentielles de *T. spathulifolius* [Sokmen et al. \(2004\)](#) ont trouvé une IC₅₀ de l'ordre de 0.243 mg/mL.

Cette activité peut être attribuée à la présence du thymol et carvacrol car plusieurs auteurs l'ont confirmé ([Ruberto & Baratta, 2000](#) ; [Miguel et al., 2004](#) ; [Bozin et al., 2006](#) ; [Aazza et al., 2011b](#) ; [Shahat et al., 2011](#)), plusieurs d'entre eux ont trouvé une différence dans l'efficacité entre ces deux mono-terpènes phénoliques ([Ruberto & Baratta, 2000](#) ; [Mastelić et al., 2008](#)) alors que d'autres non ([Aazza et al., 2011b](#)).

A travers l'étude conduite par [Tsai et al. \(2011\)](#), l'huile essentielle de *T. vulgaris* a démontré une bonne efficacité à piéger le radicale DPPH en enregistrant une IC₅₀ de 0.10µg/mL, ils ajoutent que les composés majoritaires de cette huile essentielle étaient le p-cymène et le thymol, ce qui a généré cette activité antioxydante car une proportion élevée en thymol et carvacrol fait preuve d'une bonne activité antioxydante.

En étudiant l'activité antioxydante de quelques espèces à la famille de *Curcuma*, [Angel et al., \(2012\)](#) ont enregistré un bon effet antioxydant tel que l'IC₅₀ de *Curcuma brog* a été de l'ordre de 0.0063 mg/mL et 0.0070 mg/mL pour *Curcuma malabarica* et 0.0079 mg/mL pour *Curcuma rakthakanta*, ce qui est nettement meilleur que les résultats obtenu dans notre cas.

[Priya et al. \(2012\)](#), dans leur étude sur l'huile essentielle de *Curcuma longa*, ont obtenu une IC₅₀ de 3.227mg/mL

L'activité antioxydante des huiles essentielles des rhizomes du curcuma, fraîche et séché, par le piégeage des radicaux libres a été mise en évidence en 2012 par [Gounder & Lingamallu](#), ce qui a montré une efficacité mais sans qu'elle soit comparable à celle du BHA ou le Trolox. Les IC₅₀ enregistrées dans cette étude sont de 4.5, et 3.5 mg d'huiles essentielles respectivement pour les rhizomes fraîches et séchées.

Ces auteurs ont attribué cette efficacité des rhizomes séchés au taux élevé en turmérone aromatique (en enregistrant un taux de 30.3 et 28.3% respectivement pour les rhizomes séchés et fraîche).

III.5.2. Piégeage du radical ABTS

Selon [Re et al., \(1999\)](#), la méthode de piégeage du radical ABTS est une excellente méthode pour déterminer l'activité antioxydante pour une large diversité de substances, comme antioxydants donateurs d'hydrogène ou piègeurs de radicaux en phase aqueuse et d'antioxydant briseur de chaînes ou bien comme piègeur de radicaux pyroxylé.

Les valeurs des D.O enregistré au cours de l'expérimentation ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition du radical ABTS. Ces pourcentages augmentent de façon proportionnelle en fonction des concentrations des huiles essentielles. Ces résultats ont permis de tracer les différentes courbes de la [figure 15](#).

A travers cette figure nous remarquons que les huiles essentielles d'Ajowan et du thym ont exercé une forte activité inhibitrice du radical ABTS en atteignant les 90% avec une dose inférieure à 0.01mg/mL. Par contre celle du Curcuma n'a pas exercé une si efficace inhibition sur le radical ABTS. Ce qui signifie que cette dernière n'agit pas comme un bon donneur d'hydrogène comparée à celle d'Ajowan et du thym.

Les valeurs des IC₅₀ des différentes huiles essentielles nous donnent une idée sur leurs efficacités car l'Ajowan a donné une IC₅₀ de l'ordre de 0.0013 mg/mL suivi par celle du thym avec 0.0017 mg/mL et en dernier lieu celle du curcuma avec 0.2187mg/mL.

Donc le pouvoir antioxydant des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, de *Thymus ciliatus* et de *Curcuma longa* par le test ABTS confirme l'efficacité antioxydante testé par le DPPH.

Dans la littérature peu d'article ont testé l'efficacité des huiles essentielles de ces plantes par le test ABTS.

A part l'huile essentielle de *Curcuma longa*, l'efficacité antioxydante des autres huiles essentielles est nettement meilleure que celle enregistré par [Amarti et al., \(2011\)](#) en étudiant l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc avec 0.07597 mg/mL.

Comparés aux résultats présentés par [Tel et al., \(2010\)](#) sur *Salvia chionantha* (lamiaceae), l'activité antioxydante des huiles essentielles, des plantes étudiées au cours de notre expérimentation, a démontré une efficacité nettement supérieure.

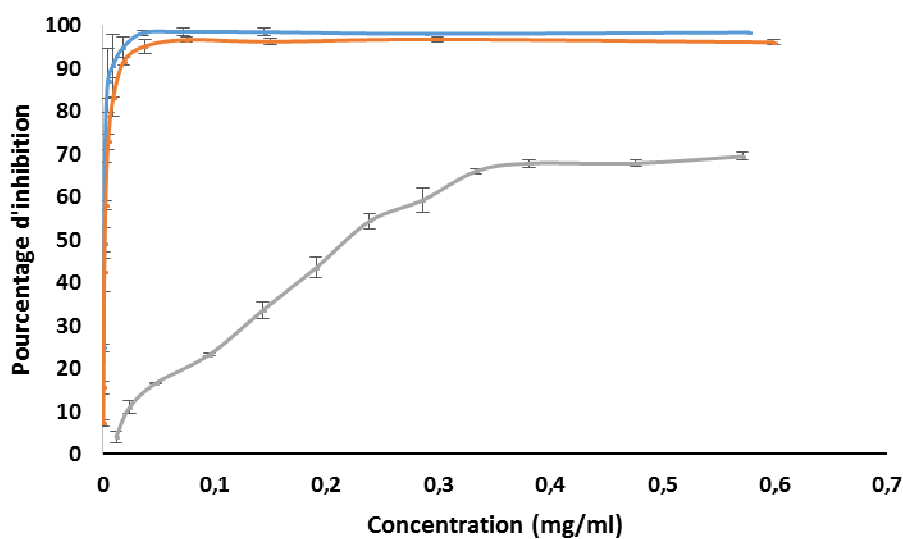


Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS* en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

Nos résultats ont donné une efficacité antioxydant évaluée par la méthode ABTS nettement meilleurs à ceux enregistré par Bakchiche et al. (2013) en étudiant les huiles essentielles d'*Artemisia campestris* ($IC_{50} = 1.013$ mg/mL) et *Juniperus phoenica* ($IC_{50} = 2.020$ mg/mL) par contre Ozturk (2012) en étudiant les huiles essentielles de *Satureja thymbra* a enregistré une activité antioxydante sensiblement similaire à nos huiles essentielles avec une IC_{50} de 0.0093 mg/mL.

Undeger et al. (2009) et Damasceno et al. (2011) ont attribué l'efficacité antioxydante des huiles essentielles étudiées par le test d'ABTS à leur contenance en composés à structure phénolique (thymol et carvacrol).

En le testant par ABTS, l'huile essentielle de *Thymus capitata* riche en carvacrol étudié par El Abed et al. (2014) ont enregistré une excellente efficacité par rapport au BHT (en enregistrant des IC_{50} respectif de 0.463 μ g/mL, 3.204 μ g/mL).

D'après d'autres travaux, le thymol est considéré comme le composé antioxydant le plus efficace de tous les mono et sesquiterpènes (Amensour et al., 2009 ; Viuda-Martos et al., 2011). Même comparé au carvacrol le thymol possède l'activité antioxydante la plus élevée (Viuda-Martos et al., 2010).

En étudiant l'activité inhibitrice du radical ABTS par les huiles essentielles de *Curcuma longa* (fraîches et séché) Gounder & Lingamallu (2012) ont remarqué que le séchage améliore l'activité des huiles essentielles des rhizomes de *Curcuma longa* en accroissant la teneur de l'ar-turmérone en enregistrant des IC_{50} de 3.3 et 1.9mg/mL respectivement pour les huiles essentielles des rhizomes fraîches et séchées.

D'un autre côté, Priya et al. (2012) a enregistré une IC_{50} de 1.541mg/mL en étudiant l'huile essentielle des feuilles de *Curcuma longa*. En comparant nos résultats avec ces chiffres on déduit que l'huile essentielle des rhizomes est plus efficace que celle des feuilles de la même plante.

III.5.3. Capacité antioxydante totale

La méthode de réduction du phosphomolybdène a été utilisée pour rechercher la capacité antioxydante totale des différentes huiles essentielles.

Pour tester cette capacité antioxydante totale, une gamme de concentrations a été préparée pour chaque huile essentielle. Les valeurs des D.O obtenues montrent une

augmentation proportionnelle de cette capacité antioxydante en fonction des concentrations des huiles essentielles. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires.

Le premier constat tiré de la [figure 16](#) est que l'huile essentielle de *Curcuma longa* possède le pouvoir réducteur le plus élevé comparé à ceux des huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* et d'*A. verticillata*.

Dans ce test, on a pas enregistré de corrélation avec les tests de DPPH, TBARS et du pouvoir réducteur car ce test donne des résultats complètement différentes que celles déjà citées et ce constat a été aussi remarqué par [Jayaprakasha et al. \(2002\)](#). par contre [Gounder & Lingamallu \(2012\)](#) ont que la logique de classement des huiles essentielles entre les huiles testés existe entre cette méthode et les autres.

De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des huiles essentielles des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique [Benabdelakader \(2012\)](#).

En prenant en considération la composition chimique des trois huiles essentielles on peut déduire que les composés majoritaires de *Curcuma longa* à savoir le Turméron et le Turmérone aromatique possèdent une faculté réductrice du phosphomolybdène supérieure que celle du cuminol, thymol et carvacrol.

L'étude réalisée par [Jayaprakasha et al. \(2002\)](#) a démontré une efficacité réductrice de l'huile essentielle de *Curcuma longa* et de la fraction III vis-à-vis du phosphomolybdène. Cette efficacité peut être due à la composition et principalement aux composés majoritaires de l'huile essentielle et de la fraction III car ces auteurs ont enregistré une richesse de ces échantillons en turmérone, turmérone aromatique en plus du Curnone.

Dans leur étude, [Gounder & Lingamallu \(2012\)](#) ont constaté que l'huile essentielle des rhizomes de *Curcuma longa* séchées a exercé un effet réducteur sur le phosphomolybdène par rapport à celui des rhizomes fraîche qu'ils attribuent aussi à la teneur en ar-turmérone.

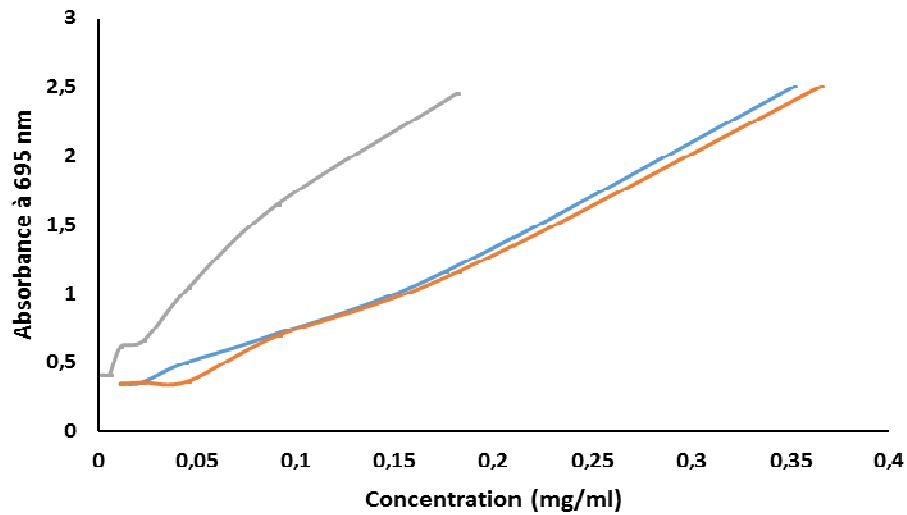


Figure 16 : Absorbances indiquant la capacité antioxydante totale en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (■) et de *Curcuma longa* (■).

En étudiant l'effet réducteur des extraits de quelques plantes médicinales à savoir de *Solenostemma oleifolium* Bull. & Bruce., *Echium pycnanthum* Pomel, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* et *Prasium majus* L [Chaouche \(2014\)](#) a constaté une efficacité de ces extraits selon le classement par ordre décroissant suivant : Ecorces de racines de *J. oxycedrus* > Aiguilles de *J. oxycedrus* > *P. majus* > Feuilles de *S. oleifolium* > Fleurs de *S. oleifolium* > Racines d'*E. pycnanthum* > Baies de *J. oxycedrus*. En outre, il s'est avéré que les extraits les plus actifs sont les plus riches en composés phénoliques.

III.5.4. Pouvoir réducteur du fer

Pour tester le pouvoir réducteur, une gamme de concentrations a été préparée pour chaque huile essentielle en plus de l'acide ascorbique. Les valeurs des D.O obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations des huiles essentielles. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures linéaires.

L'huile essentielle d'*A. verticillata* possède aussi un pouvoir réducteur plus élevé que celui de l'huile essentielle de *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* et en dernier lieu celle de *Curcuma longa*. De tels résultats ont été attendus, puisque le mécanisme impliqué dans la réaction est basé sur le transfert d'électrons, comme ceux des activités de piégeage des radicaux ABTS et DPPH car une corrélation positive existe entre ces deux méthodes et le test du pouvoir réducteur a été constaté par [Bentes et al. \(2009\)](#).

La [figure 17](#) montre que le pouvoir réducteur dépend de la concentration de l'huile essentielle dans l'échantillon, ce constat a été fait aussi par plusieurs autres auteurs ([Bentes et al., 2009](#) ; [Aazza et al., 2011b](#)).

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme indicatrice pour son activité antioxydante ([Duh, 1998](#)).

[Ishtiaque et al. \(2013\)](#) ont obtenu un important pouvoir réducteur d'ajowan même comparable à celui du BHA sur toute la gamme de concentrations, ce qui confirme les résultats obtenus dans notre étude.

[Jamali et al. \(2012\)](#) ont enregistré un faible pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *T. ciliatus* qui s'est traduit par une IC₅₀ de l'ordre de 184.05µg/mL comparé au BHT qui a révélé une efficacité avec une IC₅₀ de 7.09µg/mL.

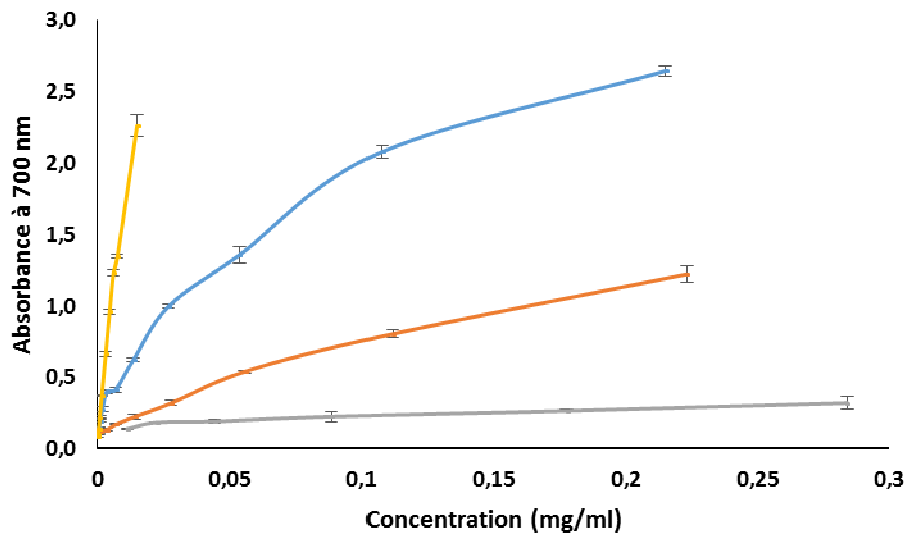


Figure 17 : Pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (■), *Curcuma longa* (■) et de l'acide ascorbique (■).

Dans leurs étude Priya et al. (2012) et Gounder & Lingamallu (2012) ont obtenus de faibles pouvoir réducteur par leurs études sur *Curcuma longa*. Le même constat a été fait par Mau et al. (2003) qui ont aussi enregistré un faible pouvoir réducteur de l'huile essentielle et des différentes fractions de *Curcuma zedoaria* ce qui est en concordance avec celle de l'huile essentielle de *Curcuma longa*.

Les résultats obtenus par Singh et al. (2007) montrent que les huiles essentielles d'Ajowan et de curcuma ont exercé un pouvoir réducteur modéré en enregistrant des taux respectivement de 65.2% et 67.4% avec un volume en huiles essentielles de 25 μ L.

A travers l'étude réalisée par Aazza et al. (2011b), ont remarqué que *Thymus vulgaris* a enregistré un bon pouvoir réducteur. Dans cette même étude, ils ont obtenu des résultats confirmant l'effet du δ -3-Carene, le thymol et le carvacrol comme de bons réducteurs du Fe^{3+} en Fe^{2+} .

Le thymol est considéré comme le composé antioxydant le plus efficace de tous les mono et sesquiterpènes (Amensour et al., 2009 ; Viuda-Martos et al., 2011). Même comparé au carvacrol le thymol possède l'activité antioxydante la plus élevée (Viuda-Martos et al., 2010).

Le pouvoir réducteur de l'huile essentielle peut être dû à son habilité de donation d'hydrogène et, généralement, associés à la présence de composés réducteurs dans sa constitution (Singh et al., 2007).

III.5.5. Pouvoir chélateur du fer

L'étude de l'activité chélatante des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* a révélé une non activité chélatante.

Bounatirou et al. (2007) ont constaté que l'huile essentielle de *Thymus capitatus* Hoff. et Link. n'a pas démontré une activité chélatante, le même constat a été fait par Sarikurkcu et al. (2010) en étudiant les huiles essentielles de *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*.

Viuda-Martos et al. (2009) attribuent l'absence d'activité chélatante de l'huile essentielle d'Origan à la forte teneur en carvacrol, qui est incapable de former un complexe avec le Fe^{2+} .

L'étude réalisée par Singh et al. (2007) a concorde avec nos résultats car ces auteurs ont obtenus de très faibles activités chélatantes des huiles essentielles d'Ajowan et de Curcuma, en plus des autres huiles essentielles, même avec de fortes concentrations dépassant 25 μ L.

De même Orhan et al. (2009), ont constaté une inactivité chélatante des huiles essentielles de *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*.

Mau et al. (2003) ont aussi enregistré l'absence d'activité chélatante en étudiant l'huile essentielle et les différentes fractions dérivées de *Curcuma zedoaria*.

De son coté, Miguel (2010) affirme l'incapacité du 1,8-cinéole et le terpinen-4-ol comme composé mono-hydroxylé à chélater les ions ferreux.

Par contre, Viuda-Martos et al. (2010) ont constaté un effet chélateur avec une importante IC₅₀ de l'ordre de 17.32 mg/mL en étudiant les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* d'Espagne.

En étudiant l'effet chélateur des huiles essentielles de *Myrtus communis* Wannes et al., (2010) ont constaté que les fleurs ont exercé un effet chélateur contrairement aux feuilles et tiges qui n'ont pas démontré une activité chélatante. Ces auteurs expliquent l'efficacité des huiles essentielles des fleurs par la présence d'eugénol et de méthyl-eugénol, par contre la faible concentration de ces deux composés dans l'huile essentielle des feuilles n'a pas permis de chélater le fer.

Jia et al. (2010) ont constaté que les huiles essentielles de *Thymus marschallianus* et *Thymus proximus* n'ont pas exercé d'activité chélatante.

Singh et al. (2010a), ont constaté une forte activité à chélater les ions ferreux ce qui ne colle pas avec notre constat.

Ishtiaque et al. (2013) ont obtenu une faible activité chélatante qui n'a pas dépassé les 50% même avec une concentration de 2.5mg/mL, en étudiant l'huile essentielle d'Ajowan.

III.5.6. Piégeage du radical hydroxyle

Par des dilutions en cascade des différentes huiles essentielles à tester, une gamme de concentrations a été réalisée. Les différentes absorbances enregistrés nous ont servi de base pour calculer les pourcentages d'inhibition du radical hydroxyle qui ont permis de tracer des courbes ayant des allures logarithmiques (Fig. 18).

Les résultats représentés dans cette figure, nous donne une claire idée sur l'efficacité inhibitrice du radical hydroxyle par l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* en enregistrant une IC_{50} de l'ordre de 0.00221mg/mL, suivi par celle d'*Ammoides verticillata* avec une IC_{50} de l'ordre de 0.0355mg/mL et en dernier lieu celle de *Curcuma longa* avec une IC_{50} de 0.222mg/mL.

L'habilité des huiles essentielles à réduire l' $OH\bullet$ semble être directement liée à la prévention de la propagation du procès de peroxydation des lipides et semble être un bon piègeur des espèces d'oxygène actif, ce qui conduit à réduire le taux de réactions d'oxydations (Sahreem et al., 2010).

Senthilkumar & Venkatesalu (2013) ont obtenu un bon effet inhibiteur du radical hydroxyl en utilisant l'huile essentielle de *Feronia limonia* qui s'est traduit par une IC_{50} de 25.05 μ g/mL même comparée à celle l'acide ascorbique comme standards qui a enregistré une IC_{50} de 28.65 μ g/mL.

Les huiles essentielles de *T. caespititius* de différentes stations qui ont fait l'objet d'étude de Dandlen et al. (2010) leur ont permis d'obtenir une efficacité inférieure à celle enregistré pour *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* utilisé dans notre étude car ils ont obtenus des IC_{50} comprises entre 0.417 mg/mL, 0.508 mg/mL. Les composés majoritaires des espèces de thym étudiées dans cette étude étaient Borneol, camphor, α -terpineol, 1,8-cineole, camphene, α -pinene and *p*-cymene avec différentes concentrations.

La présence de composés phénoliques comme thymol et carvacrol n'est pas déterminante pour piéger le radical hydroxyle, ce qui signifie que leurs présence comme composés majoritaire n'est pas synonyme d'efficacité inhibitrice. Par contre la celle de borneol, camphor, α -terpineol, 1,8-cineole, camphene, α -pinene et *p*-cymene peut conduire à une forte comme elle peut conduire à une faible activité et ça dépend de l'espèce et du lieu de collecte de la plante (Dandlen et al., 2010).

Par contre Singh et al. (2010b) ont enregistré des IC_{50} élevé de l'ordre de 126.15 et 109.75 μ g/mL respectivement pour les huiles essentielles des jeunes et mature feuilles d'*Artemisia scoparia* traduisant ainsi leurs faibles activité à piéger l' $OH\bullet$.

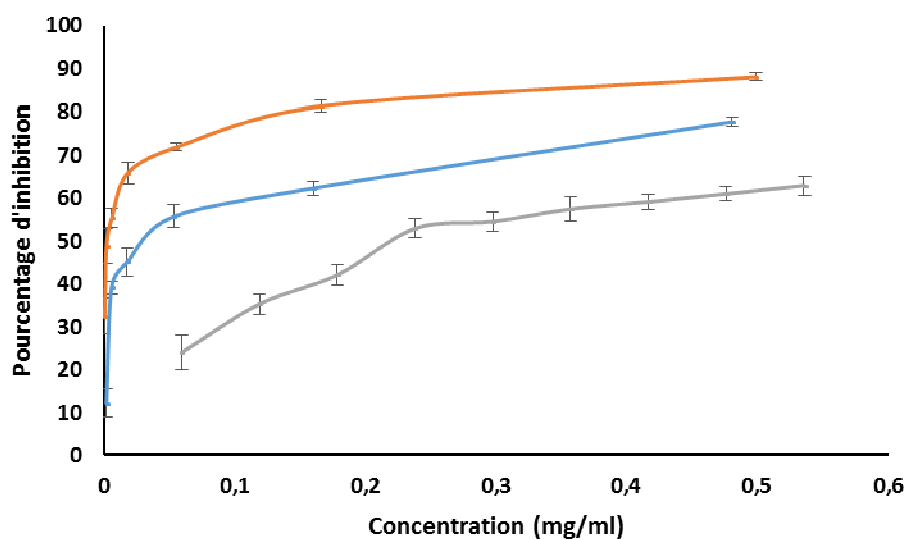


Figure 18 : Pourcentages de piégeage du radical hydroxyle en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

De même le constat fait par [Thirugnanasampandan et al. \(2012\)](#) sur l'efficacité de l'huile essentielle de *Toddalia asiatica* (L.) riche en β -phellandrene a révélé une inefficacité vis-à-vis du radical OH• en enregistrant une IC₅₀ de 281.30 μ g/mL comparé à celle du BHT avec une IC₅₀ de 30.14 μ g/mL.

III.5.7. Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (TBARS)

Par des dilutions en cascade des différentes huiles essentielles à tester, une gamme de concentrations a été réalisée. Les résultats représentés dans la [figure 19](#), montrent que les pourcentages d'inhibition de l'oxydation des lipides du jaune d'œuf, sont proportionnels aux concentrations des huiles essentielles. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures logarithmiques.

Les résultats montrent une faible variabilité en enregistrant des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 0.02794 mg/mL pour *A. verticillata*, de 0.0469mg/mL pour *C. longa* et de 0.1096 mg/mL pour *T. ciliatus*. Le plus remarquable est que l'huile essentielle la plus active est celle d'*A. verticillata* en enregistrant l'IC₅₀ la plus faible et en atteignant le pourcentage d'inhibition le plus élevé comparé aux deux autres huiles essentielles.

Le pourcentage d'inhibition de la substance réactive à l'acide Thio-barbiturique augmente avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles des plantes étudiées.

Il faut signaler que l'alcool cumine composés principal de l'huile essentielle d'*A. verticillata* et le carvacrol de *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* ont été considéré respectivement comme des antioxydants faibles et modérés par [Teissedre & Waterhouse \(2000\)](#) et [Lee et al. \(2005\)](#).

La bonne activité observée pour l'huile essentielle d'*A. verticillata*, dont domine le cuminol, peut également être attribué au pourcentage élevé de thymol (11%). Ce terpène phénolique a été considéré meilleur antioxydant que son isomère, carvacrol, dans la prévention de la peroxydation des lipides ([Yanishlieva et al., 1999](#) ; [Öztürk, 2012](#) ; [Ramos et al., 2012](#)). En plus le cuminol et le thymol peuvent agir d'une manière synergique œuvrant pour une meilleure activité de l'huile essentielle d'*A. verticillata* comparé au carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle de *T. ciliatus*.

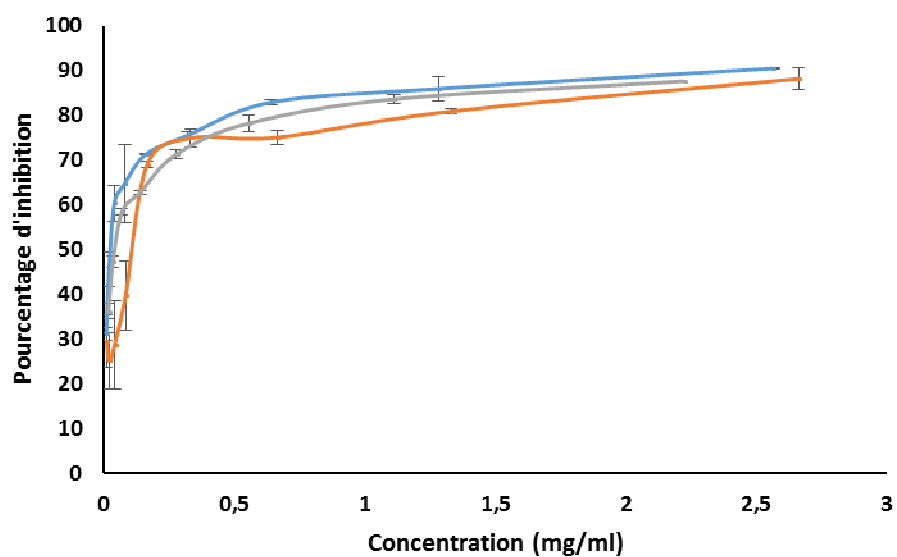


Figure 19 : Pourcentages d'inhibition de la substance réactive à l'acide Thio-barbiturique en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

Dans une étude réalisée par [Dandlen et al., \(2010\)](#), l'activité antioxydante évaluée par la méthode TBARS a également montré une très bonne capacité antioxydante telle que *T. zygis* subsp *sylvestris* , avec $IC_{50} = 0.066$ à 0.087 mg/mL, ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* possède une activité antioxydante sensiblement moins efficace.

Dans une étude réalisée par [Hazzit et al. \(2006\)](#), *Thymus munbyanus* a prouvé son efficacité par rapport aux autres huiles essentielles des plantes médicinales étudiées (*Origanum glandulosum*, *O. floribundum*, *T. pallescens*, *T. numidicus* et *T. guyonii*).

Dans une autre étude, [Hazzit et al. \(2009\)](#) ont enregistré une activité antioxydante sensiblement supérieure à la nôtre en étudiant les huiles essentielles de *T. algeriensis* de Chréa à 800m d'altitude en enregistrant une $IC_{50} = 0.1067$ mg/mL, par contre la même espèce de *T. algeriensis* de Chréa mais récolté à une altitude de 1500 m s'est révélé non active. Dans la même étude les huiles essentielles de *T. pallescens*, récolté de plusieurs régions d'Algérie, ont démontré des efficacités antioxydantes moins importantes comparées à *T. ciliatus*.

L'étude de [Viuda –Martos et al. \(2010\)](#) *Thymus vulgaris* a démontré une forte activité antioxydante testé par la méthode de TBARS avec une IC_{50} de 0.090 mg/mL.

De leurs côtés, [Bounatirou et al. \(2007\)](#) ont aussi enregistré une bonne efficacité antioxydante des huiles essentielles de *T. capitalus* en floraison et en poste floraison avec des IC_{50} inférieurs à 0.1 mg/mL par contre le stade végétatif donne une efficacité moindre avec des IC_{50} supérieures à 0.25 mg/mL.

Selon l'étude réalisée par [Aazza et al., \(2011b\)](#) l'huile essentielle de *T. vulgaris* a montré une meilleure activité inhibitrice de la peroxydation des lipides car plus que 80% d'activité a été observé avec 0.8mg/mL d'huile et avec une IC_{50} de l'ordre de 0.116 mg/mL.

La bonne activité de *T. vulgaris* peut être attribuée à la présence du carvacrol et le thymol, connu pour leurs activités antioxydante ([Ruberto & Baratta, 2000](#)).

Lorsque [Aazza et al. \(2011b\)](#) ont testé l'activité antioxydante des composés majoritaires des huiles essentielles par la méthode de TBARS, la bonne activité des deux composés a été confirmée.

[Ruberto & Baratta \(2000\)](#) reporte que ces composés phénoliques sont meilleurs dans la prévention de la formation des hydro-péroxydiènes (produit fini de la première étape du

procès de dégradation de la matrice lipidique) que la prévention de la formation du malonaldéhyde (un des produits finis de la peroxydation secondaire des lipides), dont la quantification indique l'extension de la dégradation des lipides.

III.5.8. Liposomes

Bangham *et al.* (1965) sont les premières personnes à avoir volontairement fabriqué des liposomes. Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques organisées entre deux compartiments aqueux (Laurin *et al.*, 2004). Leur taille varie de 20 nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. Celles-ci emprisonnent un compartiment aqueux et lorsque des protéines sont insérées dans leur matrice, on parle alors de protéoliposomes (Rigaud, 2002 ; Mourtas *et al.*, 2011). Les liposomes sont obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, dont les plus couramment utilisés sont des phospholipides. Les liposomes sont de plus en plus développés dans la recherche pharmaceutique comme vecteurs de médicaments (Amphotéricine B). Les liposomes peuvent retenir plusieurs types de composés qu'ils soient hydrosolubles ou liposolubles. L'encapsulation permet la protection des substances contenues dans les liposomes vis-à-vis d'une dégradation enzymatique ou bien d'une élimination. L'encapsulation permet aussi de limiter l'action toxique des substances vis-à-vis du patient (Ruby *et al.* 1995 ; Li *et al.* 2005 ; Takahashi *et al.*, 2009 ; Mourtas *et al.*, 2011).

Les radicaux libres sont capables d'attaquer les acides gras insaturés des systèmes membranaires provoquant la peroxydation des lipides. Une surproduction des Malondialdéhyde, comme produit secondaire de la peroxydation des lipides, survient après une hausse des radicaux libres. L'effet inhibiteur de l'huile essentielle sur la peroxydation des lipides dans le test de liposome est généralement estimé après une incubation de ces liposomes avec le complexe ascorbate/Fe³⁺ et après la détermination de la quantité de TBARS accumulé après un intervalle de temps d'une heure (Du *et al.*, 2012 ; Şerbetçi *et al.*, 2012). Dans cette étude, la production de radicaux libre a été remplacée par une cuisson à 100°C pendant une durée bien déterminée. Dans ces conditions, les huiles essentielles ont présenté la capacité d'inhiber la formation de malonaldéhydes.

Malgré que le principe de ce test est le même, à part le substrat lipidique impliqué (jaune d'œuf et liposome), que celui du TBARS mais les courbes de la figure 20 démontre une efficacité moindre que celle du test précédant qui s'est traduite par des IC₅₀ sensiblement élevées (0.2987mg/mL, 0.53 mg/mL et 0.456mg/mL respectivement pour *A. verticillata*, *T.*

ciliatus ssp. *eu-ciliatus* et *C. longa*). En plus une différence d'efficacité entre les différentes huiles essentielles testées car *C. longa* n'a pas été si efficace ce qui n'était pas le cas dans le test précédant.

Dans son étude sur des extrait et huiles essentielles de plantes médicinales Bakchiche et al. (2013) ont obtenu un effet satisfaisant en étudiant l'huile essentielle de *Juniperus phoenica* avec une IC50 de 0.080mg/mL ce taux a été sensiblement élevé que celui du BHT (0.002mg/mL) par contre l'effet d'*Artemisia campestrice* a été modéré en enregistrant une IC50 de l'ordre de 0.91mg/mL.

Aazza et al., (2011b) affirment que le thymol et le carvacrol sont significativement meilleurs pour prévenir l'oxydation des lipides.

A 5mg/mL, les extrait des fruits et fleurs d'*Hypericum lydium* Boiss ont exercé une activité inhibitrice de la peroxydation des liposomes en enregistrant des taux respectifs de 86.40 % et 88.86 % (Serbetci et al., 2012). De même, plusieurs auteurs ont enregistré des taux similaires en étudiant les extraits de différentes espèces d'*Hypericum* (Conforti et al., 2002 ; Zou et al., 2004 ; Silva et al., 2005 ; Kızıll et al., 2008).

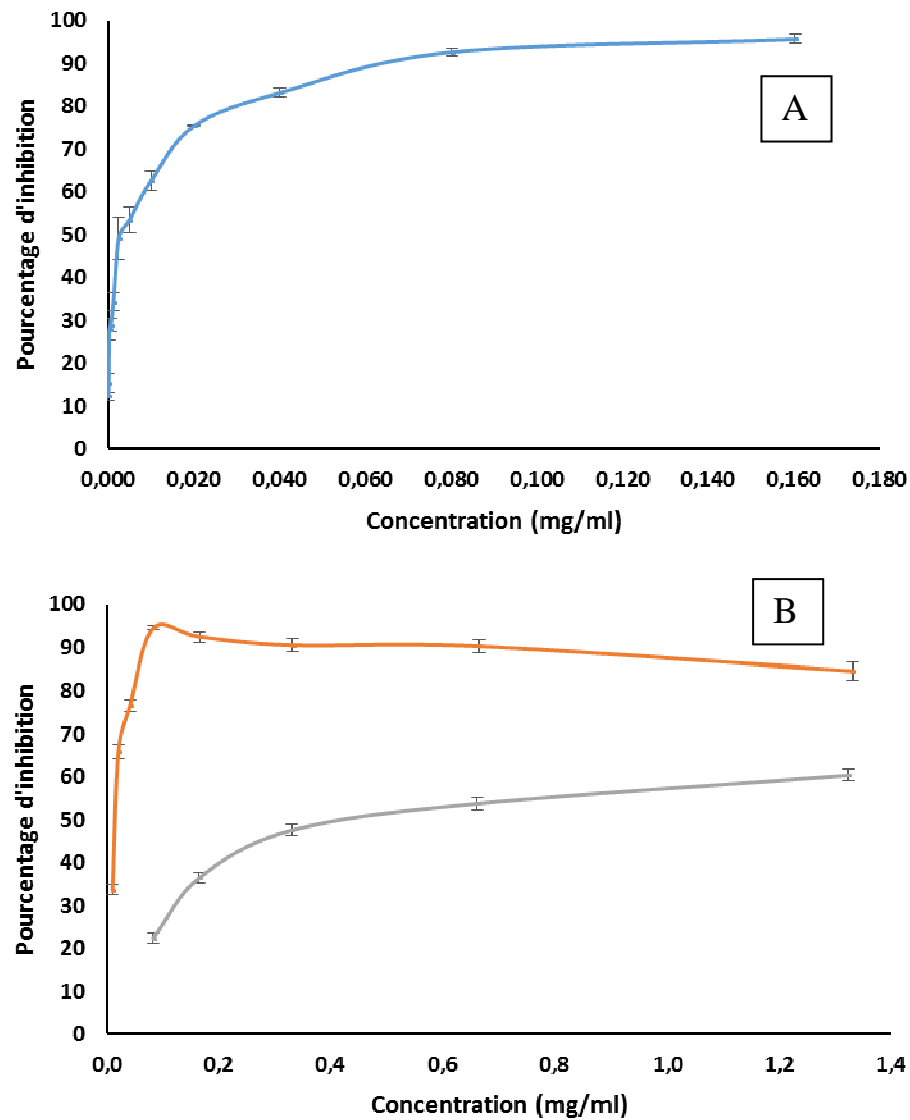


Figure 20 : Pourcentages de préservation des liposomes en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles (en A) d'*Ammoides verticillata* (■), (en B) de *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

III.5.9. Piégeage du radical peroxyde d'hydrogène

L'humain est exposé indirectement au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par son environnement aux environ de 0.28 mg/Kg/jour. Ces H_2O_2 pénètrent au corps humain soit par respiration ou par contact de la peau et des yeux (Alam et al., 2013). Comme il peut être naturellement produit dans l'organisme comme produit du métabolisme d'oxygène. Ce composé est généré en conditions physiologiques par les peroxysomes et par une variété d'enzymes incluent glucose oxydase, acide D-aminé oxydase et par la dismutation du radicale superoxyde (Gulcin, 2012). Presque tous les organismes vivants possèdent des enzymes, qui décomposent de faibles concentrations d' H_2O_2 en eau et oxygène. Halliwell et al. (2000) ont signalé qu'un niveau inférieur à 20-50 μ g/cellule d' H_2O_2 semble avoir une cytotoxicité limitée sur plusieurs types de cellules. Ceci est due au fait que ce composé soit rapidement décomposé en oxygène et en eau, ce qui peut produire le radical hydroxyle (OH^\bullet) et à son tour peut initier la peroxydation des lipides et endommager l'ADN cellulaire, pour cette raison qu'*in vivo* il doit être rapidement éliminé par les enzymes comme les catalases, peroxydases (Alam et al., 2013).

L' H_2O_2 est considéré donc comme un fort agent oxydant. En plus, il y a une croissante évidence que l' H_2O_2 , soit directement ou indirectement par le biais de son produit réduit (OH^\bullet), agit comme molécule messagère dans la synthèse et l'activation de médiateurs inflammatoires. Il peut traverser facilement les membranes cellulaires mais il est inoffensif à faibles concentrations et réagit tout doucement avec la plupart des composés (à part l'oxygène, oxyde nitrique et quelques protéines fer-sulfures). Autrement vu, la génération d' H_2O_2 par les phagocytes est connue pour son important rôle dans l'élimination de souches bactériennes et fongiques (Gulcin, 2012 ; Alam et al., 2013 ; MacDonald-Wicks et al., 2006).

Chai et al. (2003) signalent l'importance de l'élimination de l' H_2O_2 , en plus de l'anion superoxyde, pour la protection des produits alimentaires et pharmaceutiques.

Les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène calculés à partir des valeurs de D.O enregistré au cours de l'expérimentation augmentent de façon proportionnelle en fonction des concentrations des huiles essentielles. Ces résultats ont permis de tracer les courbes de la figure 21.

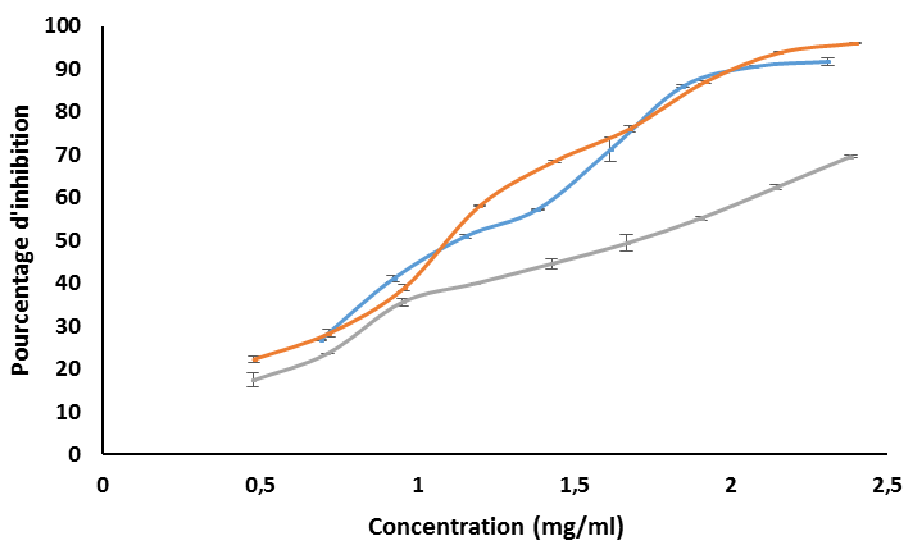


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

Il apparaît clairement que les deux huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* et d'*Ammoides verticillat* ont exercé une activité inhibitrice similaire mais avec une légère avance de la première huile essentielles pour enregistrer des IC₅₀ respectifs de l'ordre de 0.522mg/mL et de 0.789mg/mL. Par contre *Cucuma longa* a révélé une activité moins bonne que les deux autres en enregistrant une IC₅₀ de l'ordre de 1.699mg/mL.

Dans leurs étude [Mazumder et al. \(2014\)](#) ont constaté que l'ajowan a exercé une inhibition modéré en enregistrant un taux de piégeage d'H₂O₂ de l'ordre de 62.77% à une concentration de 200µg/mL alors que 100µg/mL n'a pas suffi pour exercer une inhibition remarquable (34.25%) comparé à l'acide ascorbique qui a enregistré une importante inhibition (60.34% et 90.90% respectivement pour les concentrations de 100µg/mL et 200µg/mL). Par contre une association entre l'huile essentielle d'Ajowan et de caraway (à raison de 100µL/mL pour chaque) a donné une efficacité qui a dépassé celle enregistré pour chaque huile essentielle testé à part (74.42%, 72.27% et 62.77% respectivement pour 200µg/mL de mélange ajowan + caraway, 200µg/mL caraway et 200µg/mL d'ajowan), ce qui signifie qu'il y a eu un effet synergitique entre deux composés qui se trouvent dans les deux huiles essentielles.

Le travail conduit par [Chandran et al. \(2012\)](#) a révélé que l'extrait d'acétate éthyle de *Monochoria vaginalis* (Burm. F.) C. Presl. est considéré comme un excellent piègeur du peroxyde d'hydrogène, d'inhibition avec 76.2% et 68.3% respectivement pour les extraits des feuilles et des racines, comparé aux autres extrait.

[Sahoo et al. \(2014\)](#) a trouvé que l'huile essentielle de *Kaempferia galanga* a démontré une forte activité de piégeage de l'H₂O₂ en enregistrant une IC₅₀ de 29µg/mL ce qui est excellent comparé à l'acide ascorbique

L'huile essentielle de *Zataria multiflora* a exercé une forte activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène qui s'est traduite par une IC₅₀ de 3.84µg/mL en plus d'une efficacité qui a frôlé les 100% à la concentration de 18µg/mL, par contre l'huile essentielle de *Ferula assafoetida* n'a pas donné un bon effet aux mêmes concentrations ([Kavoosi et al., 2012](#)).

A travers l'étude mené par [Senthilkumar & Venkatesalu \(2013\)](#), l'huile essentielle de *Feronia limonia* (L.) a démontré une efficacité à piéger l'H₂O₂ (avec une IC₅₀ de 45.49µg/mL) comparable à celle de l'acide ascorbique (avec 60.21µg/mL) à la même concentration.

Par contre l'huile essentielle d'*Artemisia scoparia* n'a pas enregistré une bonne efficacité en enregistrant des IC₅₀ de l'ordre de 170.11 µg/mL et de 153.95 µg/mL respectivement pour les jeunes feuilles et feuilles mature (Singh *et al.*, 2010b).

Dans l'étude conduit par Singh *et al.* (2012), l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora* a exercé une faible efficacité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène et qui n'a pas dépassé celle de la citronellale (composé majoritaire de cette huile essentielle).

III.5.10. Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC)

Le protocole de l'ORAC «*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*» a largement été utilisé pour tester les activités antioxydantes des phénols naturels et des échantillons alimentaires, incluant le thé, les fruits, les légumes (Guo *et al.*, 1997; Caldwell, 2001; Henning *et al.*, 2003) et les différents extraits des végétaux (Wang *et al.*, 1996).

Un des avantages majeurs d'utilisation de cette méthode pour évaluer la capacité antioxydante des substances alimentaires est la prise en charge de l'ensemble des actions antioxydantes avec ou sans retard. Ceci veut dire que c'est bénéfique en mesurant l'activité antioxydante d'un aliment qui peut contenir des ingrédients qui ont des activités qui peuvent être lente ou rapides dans la même matrice et qui ne peuvent pas être calculé au même temps (Caldwell, 2000 ; Kohri *et al.* 2009).

Les huiles essentielles de *T. ciliatus* et *A. verticillata* ont permis de préserver l'oxydation testé par la méthode ORAC qui s'est traduite par des valeurs de 1.19±0.04 et 3.00±0.13mM Trolox/g.

L'étude réalisée par Bakchiche *et al.* (2013) sur les différentes activités des extraits et des huiles essentielles de différentes plantes médicinales leurs a conduit à déduire que dans ce test les huiles essentielles sont plus efficaces que les extraits.

Dans une autre étude, l'huile essentielle d'*Artemisia annua* L a exercé une faible activité comparée à nos résultats en enregistrant 5.09mM TE/g (Cavar *et al.* 2012), ce résultat a été aussi constaté par Juteau *et al.* (2002) et Lopes-Lutz *et al.* (2008), cette faible activité est due à la faible présence en composés phénoliques (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

Le thymol a prouvé son efficacité pour faire face à l'oxydation de la baie de même l'eugénol et le menthol ont aussi exercé un bon effet mais pas au point de celui du thymol

(Wang *et al.* 2007). Yanishlieva *et al.* (1999) a aussi évalué l'efficacité du thymol à éviter l'oxydation des triacylglycérols de l'huile de tournesol au cours du protocole d'ORAC.

III.6. Pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles extraites

III.6.1. Pouvoir d'inhibition de la lipoxygénase

Initialement, l'inflammation est une réponse normale à une infection ou traumatisme tissulaire, mais sans un traitement adéquat, ça peut engendrer le développement de maladies chroniques au corps humain. Plusieurs enzymes, comme la lipoxygénase ou l'hyaluronidase, sont impliquées dans le développement de l'inflammation (Werz & Steinhilber, 2006 ; Gautam & Jachak, 2009). La lipoxygénase peut être rencontré dans les cellules et les organes. Le métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans le corps humain par la lipoxygénase cause la formation de leucotriènes (Vane & Botting, 1987). Ces enzymes sont aussi impliqués dans la biosynthèse de médiateurs de lipides inflammatoires, comme les prostaglandines, et leurs inhibitions est considérées comme un des objectifs de la prévention de maladies dont leurs développements sont liés au stress oxydatif et aux inflammations (Dzoyem & Eloff, 2015). Dans une étude clinique, Henderson (1994) élucide le rôle des leucotriènes dans les maladies inflammatoires comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires des intestins. Suivant le collège américain de rhumatologie, les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont très efficaces pour soulager la souffrance et réduire les signes de l'inflammation. Toutefois, leurs effets indésirables comme les saignements stomacaux, réactions allergiques, problèmes rénaux et les problèmes cardiaques peuvent causer de sérieux problèmes pour la santé de leurs utilisateurs (Yahaya *et al.*, 2014).

Heureusement, plusieurs produits naturels ont fait preuve d'activités anti-inflammatoires, comme l'aspirine et les médicaments à base d'aspirine-like incluant les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens, et ont été largement utilisés pour alléger le problème des inflammations comme les fièvres, les douleurs, les migraines et les arthrites (Lin & Lin, 2011). Plusieurs autres produits naturels d'origine végétales utilisés comme remède anti-inflammatoire ont prouvé leur efficacité pour réprimer la formation des leucotriènes, dont la plupart agissent sur l'activité des lipoxygénases ; (Werz, 2007 ; Napagoda *et al.*, 2014).

Les inhibiteurs directs de la lipoxygénase (quelque soit naturels ou synthétiques) sont essentiellement classés comme :

1) de type redox car ils interfèrent avec le site actif de la lipoxygénase par le cycle redox ;

2) par la chelation du ligand de fer

3) et par rivalisations des substrats acides gras ou bien par du complexe acide gras – hydroperoxide (Werz & Steinhilber, 2005 ; Pergola & Werz, 2010).

A travers la figure 22 il apparaît clairement que l'huile essentielle de *Curcuma longa* a exercé une forte activité inhibitrice de la lipoxigénase comparée aux deux autres huiles essentielles, cette activité s'est traduite par de faibles IC₅₀ de l'ordre de 0.01344mg/mL, 0.132mg/mL et 0.17525mg/mL respectivement pour *Curcuma longa*, *Thymus ciliatus* ssp. *euciliatus* et *Ammoides verticillata*. Ce qu'il faut tirer aussi est que cette activité est dose dépendante.

Plusieurs huiles essentielles et leurs composés ont montré une efficacité inhibitrice de la lipoxigénase (Baylac & Racine, 2003 ; Choi & Hwang, 2004 ; Viljoen et al., 2006b ; Miguel et al., 2010 ; Albano et al., 2012) dont parmi, les huiles essentielles d'*Artemisia campestris* L. et de *Juniperus phoenicea* L. collecté de la région de djebel Amour situé dans la zone steppique d'Algérie ont exercé une bonne activité anti-inflammatoire, Bakchiche et al., (2013) ont attribué cette activité à la présence d' α -pinene et du limonene dans ces huiles essentielles.

En plus, les huiles essentielles d'*Illicium verum* Hook f., *Citrus aurantium* subsp. *bergamia* (Risso) Wight & Arn., *Cinnamomum zeylanicum* Blume., *Eucalyptus globulus* Labill., *Juniperus communis* L., *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt, *Thymus vulgaris* L., *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F et Thomson riches en limonene, linalyl acetate, β -trans-caryophyllene, 1,8-cineole, *p*-cymene, thymol et eugenol ont montré aussi une forte activité inhibitrice de la lipoxigénase (Wei & Shibamoto, 2010).

Dans une étude réalisée sur les huiles essentielles de six plantes aromatiques dont parmi *T. vulgaris*, Tsai et al. (2011) ont obtenu une forte inhibition de la lipoxigénase en enregistrant une IC₅₀ de l'ordre de 0.005 μ g/mL, ils attribuent, en grande partie, cette activité au 1,8-cineole.

D'autres exemples sur l'activité inhibitrice de la lipoxigénase incluant les huiles essentielles de plusieurs espèces du genre *Salvia* du sud d'Afriques dont Kamatou et al. (2006) l'attribue à la présence 1,8-cineole, α -pinene et β -caryophyllene présentes dans les huiles essentielles. Ces mêmes composés présents dans les huiles essentielles de quelques espèces du genre *Helichrysum* du sud d'Afrique ont aussi prouvé leurs efficacités vis-à-vis de la lipoxigénase (Lourens et al., 2004).

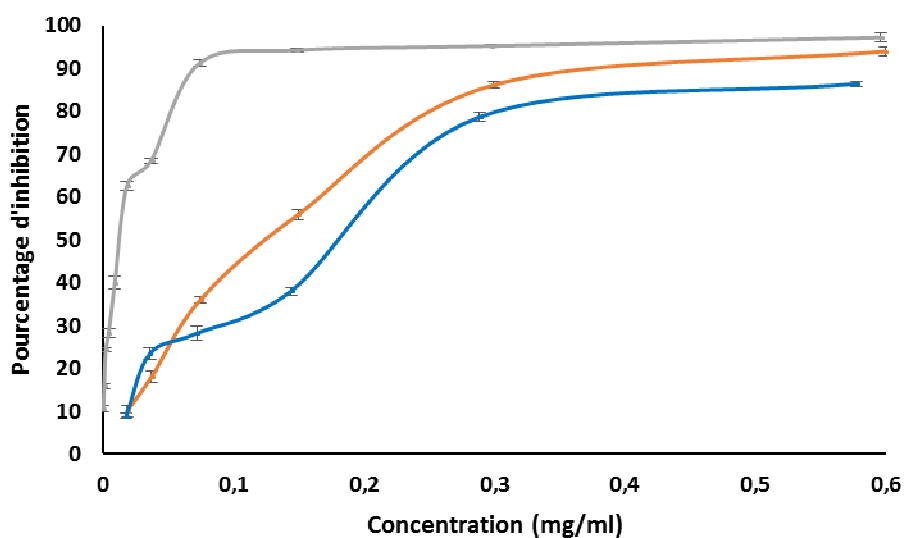


Figure 22 : Pouvoir inhibiteur de la lipoxigénase par les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

Les huiles essentielles des feuilles et des rhizomes d'*Alpinia murdochii* Ridl., *Alpinia scabra* (Blume) Naves et les feuilles d'*Alpinia pahangensis* Ridl. ont aussi montré une bonne inhibition de la lipoxgénase. De même que, β -Pinene, α -pinene et sabinene qui sont des composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles en plus de quelques sesquiterpènes dont l' γ -selinene, α -selinene et α -panasinsen dominant dans les huiles essentielles des rhizomes (Syamsir, 2009).

Dans une autre étude, un effet anti-inflammatoire du thymol a été reporté par Braga et al. (2006) en mettant en évidence 10 à 20 μ g/mL de ce composé avec les cellules neutrophiles humaines.

De leurs côtés, Sosa et al. (2005) ont remarqué qu'une application topique de carvacrol à raison de 100 μ g/cm² réduit l'œdème chez les souris.

Le constat porté par Loap (2008) est que le curcuma comme la capsaïcine (principe actif de *Capsicum frutescens* ou poivre de Cayenne) sont utilisés en application locale pour leur propriété anti-inflammatoire, car, ils provoquent la déplétion des terminaisons nerveuses de la substance P, neurotransmetteur de la douleur.

III.6.2. Pouvoir anti-acétylcholinestérase des huiles essentielles extraites

La maladie d'Alzheimer est due à un désordre neurodégénérative ce qui cause de problème de folie chez les gens âgés. Ce désordre neurodégénérative cause le dysfonctionnement et la mort de cellules nerveuses responsables du stockage et traitement d'informations. De ce fait, les malades, atteints par l'Alzheimer, perdent leur mémoire qui conduit à un changement dramatique de leurs personnalités. Cette maladie est devenue un problème de santé qui cause une lourde charge économique (Vladimir-Knezevic et al., 2014).

L'acétylcholine est un neurotransmetteur relâchée dans la zone synaptique. Les pathologies physiologiques du centre du système nerveux sont identifiées par des troubles au niveau des neurotransmetteurs et l'insuffisance surtout des fonctions de la cholinergiques (Mukherjee et al., 2007). Dans les conditions normales, la choline est hydrolysée par l'action catalytique des enzymes cholinestérases. Une concentration élevée de cette enzyme conduit à une diminution de la disponibilité de la choline dans la zone synaptique. Des taux élevés de l'enzyme cholinestérase ont été trouvés dans des échantillons de cerveau de cadavres de personnes déjà atteintes par la maladie d'Alzheimer ce qui a conduit à déduire que le déclin de cognitif chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer est reliée à la dégénération progressive de la cholinergique (Farfara et al., 2008; Snyder et al., 2001). Deux enzymes de

cholinestérase, acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase, jouent un rôle important dans diminution du niveau de la choline dans le corps (Chaiyana & Okonogi 2012). La grande réduction de ce neurotransmetteur dans le cortex cérébral signifie la maladie d'Alzheimer (Fujiwara *et al.*, 2010). Pour cette raison, les approches promotrices dans le traitement de la maladie d'Alzheimer est d'élever le taux des neurotransmetteurs cholinergique dans le cerveau par les inhibiteurs de l'enzyme cholinestérase (Scarpini *et al.*, 2003).

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ont été utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Le seul traitement efficace contre la maladie d'Alzheimer cible le système cholinergique en utilisant des composés anti-cholinestérase (Marcoux & Choi, 2002). La maladie d'Alzheimer est conditionnée par le phénomène de neuro-dégénérateur qui affecte les gens âgés avec comme premier symptôme la perte de mémoire (Cummings *et al.*, 1996; Perry *et al.*, 2000). Peu de médicaments synthétiques existes sur la marché citons par exemple tacrine et donepezil en plus des produits de base naturel comme rivastigmine et galantamine pour traiter le dysfonctionnement cognitif et les pertes de mémoires associées à la maladie d'Alzheimer. Ces médicaments ont prouvé leurs limites d'utilisation due leurs effets indésirable comme les problèmes gastro-intestinales et les problèmes de bio-disponibilité (Schulz, 2003; Oh *et al.*, 2004 ; Winblad *et al.*, 2007 ; Wentrup *et al.*, 2008).

Par conséquent, il y a tout de même une grande demande pour de nouveau médicament candidats pour traiter la maladie d'Alzheimer. Plusieurs plantes ont été utilisées traditionnellement pour accroître les fonctions cognitives et alléger les autres symptômes associés à la maladie d'Alzheimer (Howes & Houghton, 2003). Dans la médecine chinoise, les substances d'origine végétales obtenus à partir de plantes ont été utilisées pour faire face aux perte de fonctions cognitives avec la progression de la maladie d'Alzheimer (Mantle *et al.*, 2000). Depuis le temps, plusieurs huiles essentielles et leurs monoterpènes ont été étudiés pour leurs capacités à inhiber l'acétylcholinestérase. Dans ce cadre, l'étude conduite par Dohi *et al.* (2009) a démontré pour la première fois que l'eugénol est un inhibiteur potentiel de l'acétylcholinestérase.

Plusieurs témoignages ont portés sur le fait que le stress oxydatif est impliqué dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge. Par conséquent, les plantes médicinales sont utilisées comme antioxydants pour réduire ou bloquer la destruction des neurones survenue lors de ce type de désordre physiologique (Ramassamy, 2006).

Dans ce contexte, l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) par les composés des huiles essentielles extraits des plantes ont été largement étudiées (Miyazawa *et al.*, 1997 ; Aazza *et al.* 2011b ; Sung-Woong *et al.*, 2013 ; da Silva *et al.*, 2014).

Notre étude sur l'effet des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* et *Curcuma longa* sur l'acétylcholinestérase rentre dans cet objectif.

D'après la [figure 23](#) il apparaît clairement la forte capacité d'inhibition de l'acétylcholinestérase par l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* qui dépassé les 90% par seulement 3mg/mL et en enregistrant une IC₅₀ de l'ordre de 0.7mg/mL, suivi par l'huile essentielle de *Curcuma longa* en frôlant les 66% avec une concentration qui dépasse les 12mg/mL et avec une IC₅₀ de 2.42mg/mL et en dernier lieu l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* en enregistrant moins de 60% d'inhibition avec 12mg/mL d'huile essentielle et une faible IC₅₀ de l'ordre de 8.24mg/mL.

D'autre part, dans l'étude réalisée par [Aazza *et al.* \(2011b\)](#), *T. vulgaris* a présenté aussi une capacité inhibitrice de l'activité AChE, cette activité peut être due aux thymol et carvacrol comme composés majoritaires. Ces deux composés sont reconnu pour leurs propriétés inhibitrice de l'AChE ([Jukic *et al.*, 2007](#) ; [Orhan *et al.*, 2009](#)). [Aazza *et al.* \(2011b\)](#) ont signalé de leurs côté que le carvacrol est plus efficace que le thymol, alors que [Jukic *et al.* \(2007\)](#) approuve cette version en soulignant l'importance de la position du groupe hydroxyl dans la structure de la molécule que celle de son isomère sur l'inhibition de l'activité inhibitrice de l'AChE.

L'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus*, riche en hydrocarbon et sesquiterpènes oxygénés, a prouvé une inhibition trois fois plus importante que celle de la galantamine, utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et les autres détérioration de la mémoire ([Khadri *et al.*, 2008](#) ; [da Silva *et al.*, 2014](#)).

Dans une autre étude conduite par [Dandlen *et al.* \(2011\)](#), où ils ont évalué plusieurs espèces de thym du Portugal comme inhibiteurs potentiel de l'AChE, ont constaté que toutes les espèces riches en carvacrol et le borneol ont présenté une forte activité inhibitrice. Donc le borneol de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* a conduit à accentuer l'efficacité de l'huile essentielle de cette dernière mais sans avoir une bonne influence pour *Ammoides verticillata*.

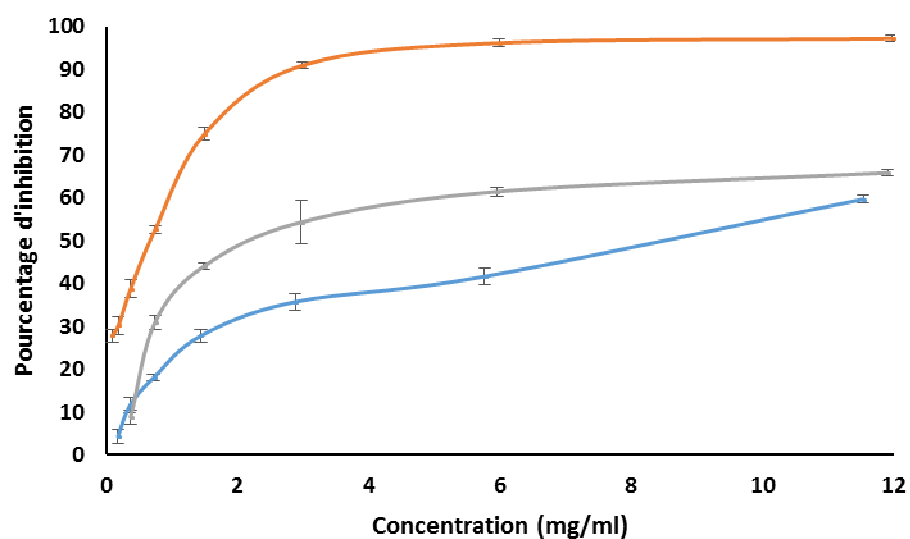


Figure 23 : Pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase par les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* (■), *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* (■) et *Curcuma longa* (■).

L' α -Pinène (monoterpène bi-cyclique) a aussi prouvé son effet inhibiteur de l'acétylcholine-estérase (Miyazawa & Yamafuji, 2005), mais sans inverser la situation dans le cas d'*Ammoides verticillata* car les 1.9% de ce composé était insuffisante dans l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* pour exercer une bonne activité.

Plusieurs auteurs considèrent le limonène (14.2% dans l'huile essentielle d'Ajowan) comme inefficace vis-à-vis l'acétylcholinestérase (Dohi et al., 2009 ; Aazza et al., 2011b) mais sans que cette inefficacité n'affecte l'effet des autres constituants (Aazza et al., 2011b).

A travers le travail de Perry et al. (2000), porté sur l'effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase par l'huile essentielle de *Salvia lavandulaefolia*, ces auteurs ont constaté une bonne efficacité de cette huile essentielle due à ses composés majoritaires (1,8 cinéol et α -pinène). En plus de l'activité inhibitrice de ces composés étudiés seules, une synergie entre l' α -pinène et le caryophyllène a été constatée par Savelev et al. (2003), ce qui a renforcé l'efficacité de l'huile essentielle du thym en plus de l'huile essentielle de *Curcuma longa*. Selon Orhan et al. (2009) cette situation peut survenir pour tous les huiles essentielles car c'est pas toujours nécessaire d'avoir un seul composé responsable de l'activité biologique, ce qui signifie que cette activité dépend de plusieurs composés qui interagissent d'une manière synergique ou comme un composé qui régule un autre composé et ça peut constituer une explication du bon effet inhibiteur pour *Curcuma longa*.

Dans une étude réalisée par Sung-Woong et al. (2013), l' α -Pinène à une concentration de 1mg/mL a démontré l'inhibition la plus importante (de l'ordre 97.36%), suivi par β -pinène (54.96%) et enfin le limonène (51.23%).

III.7.Pouvoir anti-diabétique des huiles essentielles extraites

Presque 150 millions de personnes à travers le monde sont atteintes de diabète et ce nombre pourrait doubler en 2025 (Bnouham et al., 2012).

Le diabète est un désordre chronique du métabolisme des glucides, lipides et protéines, caractérisé par une élévation du niveau de glucide sanguin quelque soit à jeun ou postprandial. La peroxydation des membranes lipidiques des cellules peut conduire à la nécrose de la cellule et peut être associé à plusieurs désordres chroniques incluant une carcinogène et une hyperglycémie (Bavarva & Narasimhacharya, 2010). De son côté, l'hyperglycémie chronique cause des complications liée au diabète, comme les maladies cardiaques, rétinopathie, maladies rénales et la neuropathie, comme elle cause les morbidités communes dans le monde et l'incapacité parmi les fonctionnaire (Thirumalai et al., 2011).

Le diabète est aussi associé à la génération de substances réactives à l'oxygène, causant ainsi des dommages oxydatifs particulièrement aux tissus (Mohamed *et al.*, 1999). Des chercheurs ont trouvé que le niveau du glucose pouvait influencer la production de radicaux libre, qui peuvent être considéré comme marqueurs de cellules endommagées, comme les Malonaldéhydes et les diènes conjugués (Cuncio *et al.*, 1995).

L'insuline et les agents pharmacologiques actuellement utilisé pour le traitement du diabète par exemple de type 2 inclus les sulfonyurées, biguanides, thiazolidinedione et les inhibiteurs de l' α -glyconidases (Balamurugan & Ignacimuthu 2011 ; Meliani *et al.*, 2011) sont efficaces pour contrôler l'hyperglycémie, mais ces genres de médicaments causent aussi de sérieux effets indésirables (Ozsoy-Sacan *et al.* 2006 ; Verma *et al.*, 2012).

Les plantes ont toujours été utilisées comme source de médicaments et plusieurs médicaments disponibles sur le marché ont été obtenus de plantes soit directement ou indirectement. Suivant les recommandations du comité d'experts sur le diabète de l'organisation mondiale de la santé, il est nécessaire de rechercher des agents hypoglycémiques d'origine végétales utilisé dans la médecine traditionnelle (Alarcon-Aguilera *et al.*, 1998).

III.7.1. Test de l'inhibition de l' α amylase

L'inhibition de l' α amylase par les huiles essentielles des différentes plantes étudiées est exprimée en mg équivalent acarbose par gramme d'huile essentielle ($\mu\text{g EA.g}^{-1}$ HE), à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acarbose comme référence ($y = 0.4335 \ln(X) + 0.7678$, $R^2 = 0.9931$) (fig. 24).

La figure 25 montre que l'huile essentielle la plus active est celle de *T. ciliatus* ssp. *eu-cilatus* ($5.198 \mu\text{g EA.g}^{-1}$ HE) suivi d'*A. verticillata* ($2.725 \mu\text{g EA.g}^{-1}$ HE) et en dernier lieu on retrouve celle de *Curcuma longa* ($0.559 \mu\text{g EA.g}^{-1}$ HE).

A travers l'analyse chimique des huiles essentielles en plus de ces résultats nous pouvons déduire que le carvacrol et le thymol ont agi positivement sur l'efficacité de ces huiles essentielles vis-à-vis de l'alpha mylase. Par contre les composés majoritaires n'était si efficaces.

Dans une étude réalisée par Hyun *et al.* (2014) ont constaté que l'extrait méthanolique de *Thymus quinquecostatus* a exercé une bone activité en enregsitrant une IC_{50} de $4.39 \mu\text{g/mL}$.

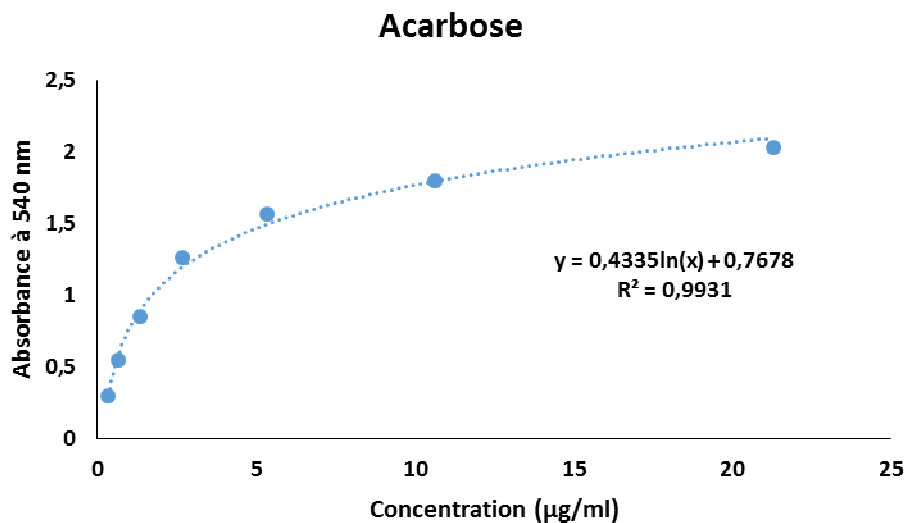


Figure 24: Courbe d'étalonnage de l'acarbose pour la détermination de la capacité antidiabétique par l'alpha amylase.

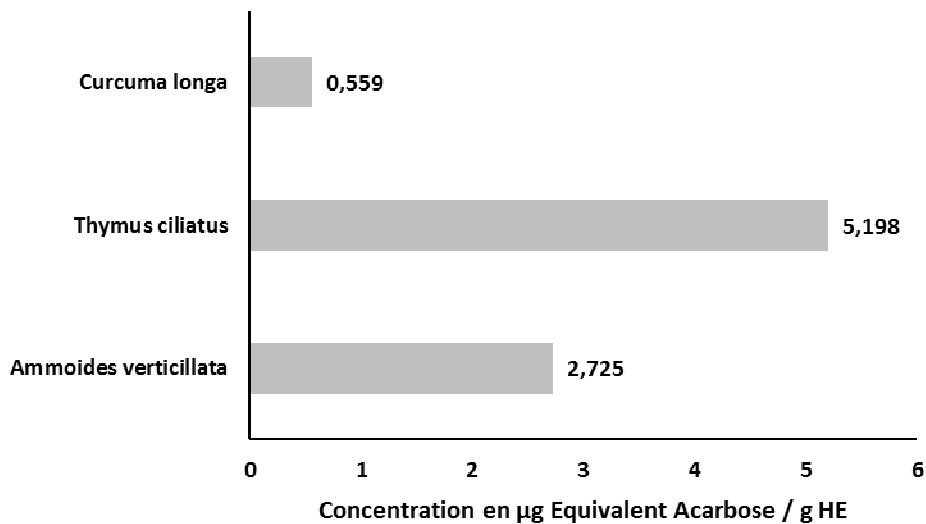


Figure 25 : Capacité antidiabétique des huiles essentielles par le test alpha amylase.

De leurs côtés [Nampoothiri et al. \(2012\)](#) ont constaté que les déchets récupéré après extraction de la curcumine a exercé un excellent effet antidiabétique en inhibant l'alpha amylase avec une efficacité (IC_{50} de l'ordre de $0.16\mu\text{g/mL}$) dépassant même celle de l'acarbose (avec une IC_{50} de l'ordre de $81\mu\text{g/mL}$).

Par contre, l'extrait méthanolique d'*Amaranthus viridis* n'a pas manifesté une bonne activité inhibitrice de l' α amylase ce qui a nécessité une IC_{50} de $10.19\mu\text{g/mL}$ contre $0.312\mu\text{g/mL}$ pour l'acarbose ([Kumar et al., 2012](#)).

III.8. Observation sur l'activité antiproliférative des huiles essentielles extraites de *T. ciliatus* et *A. verticillata* vis-à-vis de la lignée cellulaire THP-1

A travers la littérature, il a été constaté que les mutations induites par plusieurs mutagènes ont été réduites par les piègeurs d'oxygène active ([Kim et al., 1991](#); [Ueno et al., 1991](#)). Dans le même cadre, il a été démontré que les composés qui possèdent une activité antioxydante, peuvent inhiber les mutations et le cancer parce qu'ils peuvent piéger les radicaux libres ou bien activer les enzymes anti-oxydatives ([Hochstein & Atallah, 1988](#) ; [Jayaprakasha et al., 2002](#)).

III.8.1. Activité antiproliférative des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*

Les cellules de THP-1 ont été traitées avec différentes concentration d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (allant de 10 à $500\mu\text{L}$ d'huile essentielle /mL de culture) durant 01, 04 et 07 jours.

Le premier constat tiré de la [figure 26](#) est que l'efficacité de l'huile essentielle utilisée est dépendante de deux facteurs, dose et temps d'incubation, car à une dose de $100\mu\text{L/mL}$ n'élimine pas 50% de cellule sur l'ensemble de durées d'incubation et il faut une concentration supérieure pour agir efficacement avec des taux de viabilité inférieur à 20% avec une dose de $250\mu\text{L/mL}$ après 04 et 07 jours de contact, mais sans que cette efficacité ne soit décelable après une journée de contact.

III.8.2. Activité antiproliférative des huiles essentielles *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus*

La [figure 27](#) nous donne une idée sur l'effet inhibiteur de l'huile essentielle *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* sur la croissance des cellules THP-1.

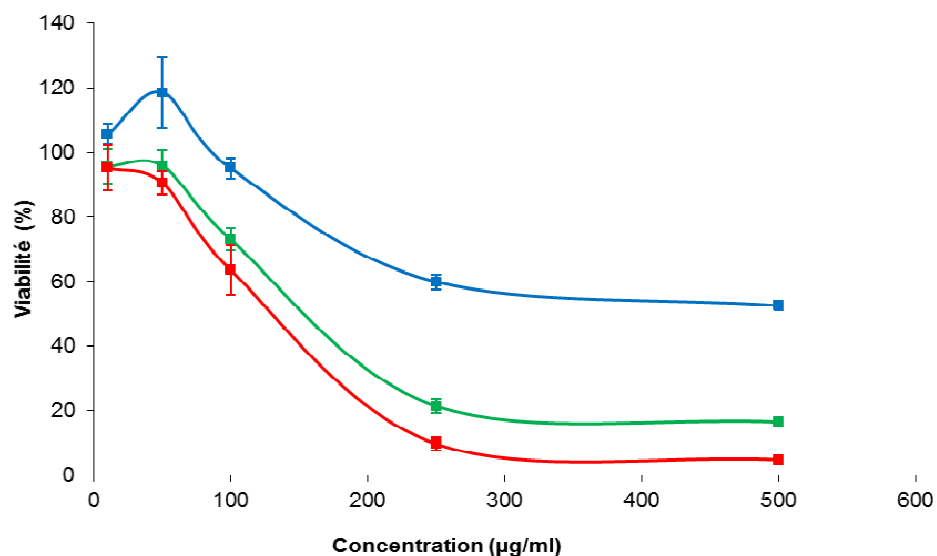


Figure 26 : Viabilité des cellules THP-1 (en % par rapport au control) confronté à l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* après 01 jour (■), 04 jours (■) et 07 jours (■) de contact.

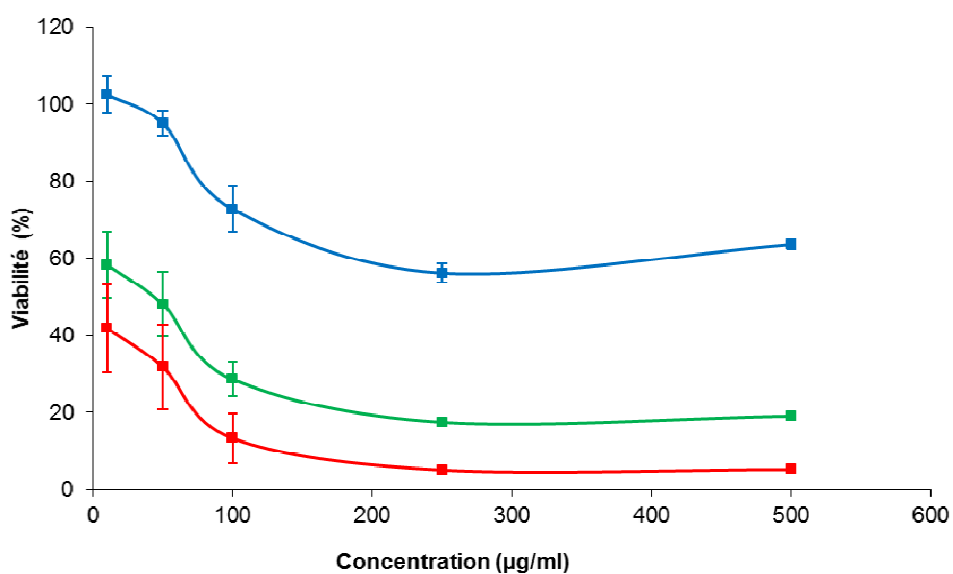


Figure 27 : Viabilité des cellules THP-1 (en % par rapport au control) confronté à l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* après 01 jour (■), 04 jours (■) et 07 jours (■) de contact.

En traitant les données, il apparait clairement que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* a été plus efficace que celle d'*Ammoides verticillata* car à la même dose de 10 μ L/mL le thym enregistre un taux d'inhibition supérieur à 40% de cellules comparé à celui de l'ajowan qui n'a pas dépassé les 5% d'inhibition, et c'est le même constat pour les doses de 50 et 100 μ L/mL.

De même l'efficacité de cette huile essentielle dépend aussi de la dose et de la durée de traitement car 7 jours de traitement est nettement meilleur que celle de 4 jours alors que cette dernière enregistre des taux d'inhibition remarquable comparée à une journée de traitement.

Nos résultats sont compatibles avec les autres études démontrant que l'inhibition de la prolifération des lignées de cellules cancéreuses (leucémie, cancer du sein, carcinome de l'épithélium cervicale, carcinome de la cavité orale, carcinome du poumon et le carcinome de la prostate) est dose dépendante (Amir & Karimi, 2001 ; Zu et al., 2010 ; Sertel et al., 2011 ; Berdowska et al., 2013 ; Ayesh et al., 2014).

Dans une étude réalisée sur *T. vulgaris*, les auteurs que cette plante fait preuve d'une inhibition sélective vis-à-vis de la prolifération des cellules THP-1. Ce constat donne espoir que *T. vulgaris* peut contenir des agents à effets thérapeutiques contre le cancer, une fois purifié, ils sont sélectifs aux cellules leucémiques que les cellules sanguines normales, même à faibles concentrations (Ayesh et al., 2014). En outre, *T. vulgaris* est considérée parmi les plantes médicinales utilisées possédant les extraits les plus sûre et présentant le moindre effet indésirable (Posadzki et al., 2013).

Les résultats de l'activité antiproliférative des huiles essentielles étudiées sont similaires ou même supérieurs que celle reporté sur l'huile essentielle de l'origan (*Origanum vulgare*) étudié par Ocana-Fuentes et al. (2010) avec le thymol, carvacrol et l'hydrate de trans-sabinène comme composés majoritaires. Dans l'étude mené par ces auteurs la viabilité cellulaire de la ligné THP-1 a été de 70% avec 70 μ L d'huile essentielle d'origan /mL de culture après deux jours d'exposition alors que dans notre cas 10 μ L d'huile essentielle /mL de culture et après 04 jours de contact, a pu éliminer 40% de cellules THP-1 (donc taux de viabilité est de 60%).

Les huiles essentielles en plus du thymol, carvacrol, p-cymene, linalool et le γ -terpinene n'ont pas d'effets à faibles concentrations par contre à forte concentrations ils affectent la viabilité des cellules THP-1 (Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012).

En étudiant la même espèce d'origan (Labiée), Fuentes *et al.* (2010) ont remarqué que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L., riche en *transsabinene* hydrate, thymol et carvacrol, agit sur la sécrétion de cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10), ce qui a conduit à déduire que cette huile essentielle ainsi que ses composés agissent sur la synthèse des composés pro-inflammatoire secrété par les macrophages THP-1 comme model cellulaire d'athérosclérose.

Chan *et al.* (2005) ont démontré que les composés des huiles essentielles comme le carvacrol, composé présent dans plusieurs huiles essentielles de plantes médicinales, peuvent moduler les fonctions des cellules immuno-nerveux par différentes voies de signalisations intracellulaires.

Dans une autre étude, les auteurs ont signalé que le cravacrol déclenche la mobilisation du calcium intracellulaire dans les cellules T et THP-1, et stimule la phosphorylation active du sous-groupe p38 du protéine mitogène activé kinase dans les deux types de cellules (Esa *et al.*, 2013).

concernant la stimulation de la THP-1 par les lipo-polysaccharides, l' α -pinène a démontré une régulation de l'expression I κ B α à travers l'inhibition de la translocation nucléaire de la NG- κ B (Zhou *et al.* 2004 ; Salminen *et al.*, 2008). A une certaine concentration, l' α -pinène seul peut être effectif, toutefois, son activité est dépendante de la composition de l'huile essentielle, ce qui lui permet d'agir sur toute l'activité antiinflammatoire quelque soit positivement ou négativement (Zhou *et al.*, 2004).

Par contre Dar *et al.* (2011) ont constaté que l' α -pinène démontre un pourcentage d'inhibition inférieur à 20% vis-à-vis de la lignée cellulaire THP-1.

Martin *et al.*, (1993) ont remarqué un effet synergétique entre l' α -pinène et β -caryophyllene, en appliquant les mêmes doses que ceux contenu dans l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosens* ce qui a donné un effet comparable à celui de l'huile essentielle et différent si chaque composé a été utilisé seul.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales resteront toujours une source fiable de principes actifs d'intérêt thérapeutique. Face à la phobie des molécules de synthèse chimique, leur utilisation est en progression constante. La problématique soulevée dans cette thèse s'inscrit dans ce souci d'exploration et de criblage de nouvelles biomolécules contenues dans des plantes autochtones qui poussent à l'état sauvage dans nos contrées et faisant partie de la pharmacopée traditionnelle de nos populations. C'est le cas d'*Ammoïdes* (ou *Ptychotis*) *verticillata* (Desf.) Briq. de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. Le rhizome de *Curcuma longa* a, également, fait l'objet de cette étude en raison des vertus qu'on lui attribue et de sa large utilisation dans la cuisine algérienne.

Dans un premier volet de ce travail, nous avons procédé à l'extraction et à l'analyse chimique des huiles essentielles des trois espèces végétales par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par le couplage CPG/spectrométrie de masse (SM) a révélé une variabilité chimique, qualitative et quantitative, très intéressante.

Nous avons noté la prédominance du carvacrol (71.4% v/v) dans l'huile essentielle extraite de *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus*, de l'alcool cumine (44.3% v/v) dans celle d'*Ammoïdes verticillata* et du turmérone aromatique (35% v/v) dans celle de *Curcuma longa*. Plusieurs autres espèces moléculaires ont été identifiées et quantifiées dans les trois types d'huiles essentielles : du *p*-Cymène (8.3%) et du γ -Terpinène (5.9%) pour *T. ciliatus*. ; du γ -Terpinène (18.1%), du Limonène (14.2%) et du thymol (10.8%) chez *A. verticillata* ; du Curlone (14.2%) et du tumérone (11.8%) chez *C. longa*.

Dans un deuxième volet, nous avons mis en évidence et évalué les propriétés biologiques des huiles essentielles extraites.

La première propriété vérifiée est l'activité antimicrobienne de ces huiles vis-à-vis de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* *Salmonella Thyphimurium*) impliquées, le plus souvent, dans des contaminations d'aliments responsables de toxi-infections chez l'homme. Les CMI (concentration minimale inhibitrice) ont été déterminées. L'huile essentielle de *T. ciliatus* a manifesté l'effet inhibiteur le plus puissant.

La deuxième série de propriétés biologiques des huiles essentielles explorée a été l'évaluation de leur activité anti-radicalaire, de leur pouvoir réducteur et de leur capacité de préservation des liposomes vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Les multiples tests réalisés (radical hydroxyle, ORAC, DPPH, ATBS, TBARS, H₂O₂) laissent apparaître des différences entre les huiles essentielles des trois espèces végétales.

En effet, nous avons noté une efficacité remarquable de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS et H₂O₂ ; ainsi qu'un fort pouvoir réducteur et une bonne préservation des liposomes. En revanche, dans les tests de piégeage du radical hydroxyle, l'efficacité de l'huile essentielle de *T. ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* a été la plus remarquable.

L'activité inhibitrice des huiles essentielles vis-à-vis d'enzymes comme la lipoxygénase, la cholinestérase et l' α -amylase a été, également, mesurée. Les observations faites indiquent une inhibition totale de la cholinestérase et de l' α -amylase par l'huile essentielle extraite de *T. ciliatus* ; alors que l'huile de *Curcuma longa* a exercé une forte inhibition vis-à-vis de la lipoxygénase et arrive à réduire le phosphomolybdène.

En revanche, toutes les huiles essentielles extraites des trois espèces végétales n'ont pas pu chélater le fer.

L'expérience relative à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses THP-1 par les huiles essentielles a, également, été concluante. Nous avons remarqué un taux d'inhibition de la croissance de ces cellules voisin de 40% sous l'effet de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*. En revanche, l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* n'a pas d'effet remarquable sur le développement de ces cellules cancéreuses.

L'ensemble de ces propriétés biologiques démontrées expérimentalement confèrent aux huiles essentielles des espèces végétales étudiées un statut de médicament naturel dénué de toute suspicion quant à leur composition chimique et des bénéfices santé qu'elles peuvent nous procurer.

En perspective, il serait fort intéressant de compléter cette étude in vitro par une expérience *In vivo*, à même capable de vérifier les propriétés biologiques de ces huiles essentielles et de s'en assurer de l'innocuité totale chez un modèle animal de choix. Il serait, également, très

instructif d'explorer l'effet isolé et synergique des différents constituants des huiles essentielles de ces espèces.

Références Bibliographiques

-A-

1. **Aazza S., Lyoussi B. & Miguel M.G. (2011a).** Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols. *J. Med. Plants Res.*, **5**: 6688–6696.
2. **Aazza S., Lyoussi B. & Miguel M.G. (2011b).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, **16**: 7672–7690.
3. **Abdelouahid D. E. & Bekhechi C. (2002).** Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'Ammoides verticillata (Nûnkha). *Biologie et Santé*, **4**: 91 - 100.
4. **Abrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K & Hellman L. (1994).** Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte macrophage cell lineage. *Leukemia*, **8**: 1579-1584.
5. **Adorjan B. & Buchbauer G. (2010).** Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr. J.* **25**: 407–426.
6. **Aftab K., Rahman A.U. & Usmanghani K. (1995).** Blood pressure lowering action of active principle from *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. *Phytomedicine*. **2(1)**: 35- 40.
7. **Agrawala J. N. & Pant M. C. (1986).** Effect of feeding *Carum copticum* seeds on serum lipids, high density lipoproteins (HDL) and serum cholesterol binding reserve in the albino rabbits. *Indian Journal of Medical Research*, **83**: 93 - 95.
8. **Alam Md. N., Bristi N. J. & Rafiquzzaman Md. (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**: 143–152
9. **Alarcon-Aguilera F.J., Roman-Ramos R. & Perez-Gutierrez S. (1998).** Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, **61**: 101–110.
10. **Albano S.M., Lima A.S., Miguel M.G., Pedro L.G., Barroso J.G. & Figueiredo A.C., (2012).** Antioxidant, anti-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants. *Rec. Nat. Prod.* **6**, 35–48.
11. **Albayrak S. & Aksoy A. (2013).** Essential oil composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus cappadocicus* boiss. *Journal of Food Processing and Preservation*. **37**: 605–614.
12. **Almedia L. P., Cherubino A. P. F., Dufosse L. & Gloria M. B. A. (2005).** *Food Res. Int.* **38** : 1039-1044.
13. **Amarti F. Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. & Chaouch A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus Algeriensis* boiss. Reut. Et *Thymus ciliatus* (desf) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **14(1)**: 141-148.
14. **Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M. & Chaouch A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, **9**: 149–157
15. **Ambasta S. P., Ramachandran K., Kashyapa K., Chand R. & Edits (1986).** The useful plants of India. *Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi, India*, 643.
16. **Amensour, M., Sendra, E., Jamal, A., Bouhdid, S., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández- López, J. (2009).** Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Natural Products Communications*, **4(6)**: 819-824.
17. **Amir G. & Karimi M. (2001).** Cytotoxic activity of *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium* and *Thuja orientalis* on different growing cell lines. *Med J Islam Repub Ira*, **15**: 149–154.
18. **Angel G. R., Vimala B. & BalaNambisan. (2012).** Antioxidant And Antimicrobial Activity of Essential Oils From Nine *Starchycurcuma* species. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, **4(2)**: 45-47.
19. **Angelopoulou D., Denetzos C. & Perdetzoglou D. (2002).** Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematic and Ecology*, **30**: P 189-203.

20. **Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K. (2002).** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**: 183-198.
 21. **Apisarlyakul A., Vanittanakom N. & Buddhasukh D. (1995).** Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **49**: 163-169.
 22. **Arnao M.B., Cano A. & Acosta M. (2001).** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.* **73**: 239-44.
 23. **Arpino P., Perevot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A. & Witier P. (1995).** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, *Ed. Masson, Paris*, p. 700.
 24. **Asekun O. T., Grierson D. S. & Afolayan A. J. (2007).** Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chem.* **101**: 995-998.
 25. **Ashraf M. & Bhatti M. K. (1975).** Studies on the essential oils of Pakistani species Of the family umbelliferae. Part I. *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (ajowan) seed ou. *Pakistan J. Sci. md. Res.*, **18**: 232-235.
 26. **Atalay S., Gulluce M., Akpulat A. H., Deferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. & Sahin F., (2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, **15**: 627-634.
 27. **Auwerx J. (1991).** The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, **47**: 22-31.
 28. **Ayesh B. M., Abed A. A. & Faris D. M. (2014).** *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. *BMC Research Notes*, **7**: 612.
 29. **Azevedo N.R., Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C. Paula J.R. & Ferri P.H. (2001).** Chemical variability in the essential oil of *Hyptissua veolens*. *Phytochemistry*, **57**: P 733-736.
 30. **Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F. Z., Benmehdi H. & Belkacem N. (2012).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research.* **6(10)**: 2041-2050.
- B-**
31. **Baba Aïssa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles: Flore d'Algérie et du Maghreb. *Ed. Librairie Moderne-Rouiba*, 231 pages.
 32. **Babulka P. (2007).** Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales : de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne. *Phytothérapie*, **5**: 137-145.
 33. **Bagard S. (2008).** Physique-Chimie 1e S: Tout-en-un, *Ed. Bréal*, 432 pages.
 34. **Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C. & Miguel M. G. (2013).** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, **46**: 85- 96.
 35. **Bakkali F., Averbeck, S., Averbeck D. & Idaomar M. M. (2008).** Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem. Toxicol.* **46**: 446-475.
 36. **Balakrishnan K. V. (2007).** Post harvest technology and processing of turmeric. **In: Ravindra, P.N., Nirmal Babu, K., Sivaraman, K.,** Turmeric, The Genus *Curcuma*, vol. 45. *CRC Press (Taylor & Francis Group)*, 193-256.
 37. **Balamurugan R. & Ignacimuthu S. (2011).** Antidiabetic and Hypolipidemic effect of methanol extract of *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **S30-S36**.
 38. **Balbaa I., Huai S. H. & Haggag M. Y. (1973).** The volatile oil from herb and fruits of *Carum copticum* at different stages of growth. *Planta Medica*, **23**: 301 - 307.
 39. **Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965).** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**: 238-252.
 40. **Barel S., Segal R. & Yashphe J. (1991).** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol.* **33**: 187-191.

41. **Barry N., (2001).** Art d'extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi-même. *Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 125- 128.
42. **Baser K. H., Tümen G., Tabanca N. & Demirci F. (2001).** Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana* (Lallem.). *Velen. Z. Naturforsch*, **56c**: P 731-738.
43. **Baudoux D. (1997).** Un procédé, une analyse, une définition. *Aroma News*. Lettre d'information de N.A.R.D: Natural Aromatherapy Research and Development.
44. **Bavarva J. H. & Narasimhacharya A. V. (2010).** *Leucas cephalotes* regulates carbohydrate and lipid metabolism and improves antioxidant status in IDDM and NIDDM rats. *J. Ethnopharmacol.*, **127(1)**: 98-102.
45. **Baylac S. & Racine R., (2003).** Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int. J. Aromat.*, **13**, 138–142.
46. **Baytop T. & Siltlipinar N. (1986).** Characteristics of « Nankhan » cultivated in Anatolia and its volatile oil. *J Fac. Pharm. Istanbul*, **22**: 73 - 76.
47. **Bekhechi C. (2002).** Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. *Mémoire de Magister*, option Biologie Moléculaire et Cellulaire, université Abou Bakr Belkaïd.
48. **Bekhechi C. (2009).** Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN ¹³C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Cellulaire Option Biochimie. *Université de Tlemcen*. 240 pages.
49. **Bekhechi C., Boti J. B., Atik Bekkara F., Abdelouahid D. E., Casanova J. & Tomi F. (2010).** Isothymol in Ajowan Essential Oil. *Natural Product Communications*. **5(7)**: 1107 – 1110.
50. **Bekir J., Mars M., Souchard J. P. & Bouajila J. (2013).** Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, **55**: 470–475.
51. **Belaiche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme. éd. Maloine. Paris.
52. **Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Editions Ibis presse, Paris*, pp. 764.
53. **Benabdelakader T. (2012).** Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato , un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique. Thèse de doctorat de l'*Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger*, Algérie. 259 pages.
54. **Benavente-Garcia, O., Castillo J. & Lorente J. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *oleaeuropaea* L leaves, *Food Chem*, **68**: 457-62.
55. **Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D. & McAllister T.A. (2008).** Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. **145**: 209–228.
56. **Bendahou M. (2007).** Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat d'Etat*, option biochimie, université Abou Bah Belkaïd Tlemcen.
57. **Bendahou M., Benyoucef M., Benkada D., Soussa Elisa M. B. D., Galvao E. L., Marques M. M. O., Muselli A., Desjobert J. M., Bernardini A. F. & Costa J. (2007).** Influence of the processes extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. *J. of Applied Sciences*, **8**: 1152-1157.
58. **Benjilali B. (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. *Le pharmacien du Maghreb*. 17-59.
59. **Benjilali B., Hammouni M. & Richard H. (1987).** Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. *Sci. Aliments*, **7**, 77-91.

60. **Bentes J., Miguel M.G., Monteiro I., Costa M., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Pedro L.G. (2009).** Antioxidant activities of the essential oils and extracts of Portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Ital. J. Food Sci.*, **21**: 183-195.
61. **Berdowska I., Zieliński B., Fecka I., Kulbacka J., Saczko J. & Gamian A. (2013).** Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chem*, **15**: 1313–1321.
62. **Berges A., Van Nassauw L., Timmermans J. P. & Vrints C. (2007).** Time dependent expression pattern of nitric oxide and superoxide after myocardial infarction in rats. *Pharmacol. Res.*, **55**: 72–79.
63. **Bergogne-Bérézin E. & Brognard J. M. (1999).** Bases biologiques de l'antibiothérapie. *Ed. Masson*, pp 27.
64. **Bharat B., Aggarwal B. & Bokyoung S. (2008).** Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Revue: article in press (Cell)*.1-10.
65. **Blois M.S. (1958).** Antioxydant determination by the use of stable free radical, *Nature*. 181.
66. **Bnouham M., Benalla W., Asehraou A. & Berrabah M. (2012).** Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. *Spatula*, **2(1)**: 69-73.
67. **Bnouham M., Merhfour F. Z., Legssyer A., Mekhfi H., Maallem S. & Ziyat A. (2007).** Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute*. *Pharmazie*, **62**: 630-632.
68. **Bnouham M., Merhfour F. Z., Ziyat A., Aziz M., Legssyer A. & Mekhfi H. (2010).** Antidiabetic effect of some medicinal plants of oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **29(10)**: 865-871.
69. **Boira H. & Blanquer A. (1998).** Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematic and Ecology*, **26**: P 811-822.
70. **Boskabady M. H. & Shaikhi J. (2000).** Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H1) receptors of isolated guinea-pig. Tracheal chains. *Journal of Ethnopharmacology*, **69**: 217-227.
71. **Boudiar T., Bensouici C., Safaei-Ghomi J., Kabouche A. & Kabouche Z. (2011).** GC-MS Analysis of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf. from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **14(2)**: 172 – 174.
72. **Boullard B. (2001).** Dictionnaire des plantes médicinales du monde. *Estem. Paris* : 174.
73. **Boulos L. (1983).** Medicinal plants of north africa. *Reference Publication : Algonac, MI*, 109-175.
74. **Bounatirou S., Smiti S., Miguel M. G., Faleiro L., Rejeb M. N., Neffati M., Costa M. M., Figueiredo A. C., Barroso J. G. & Pedro L. G. (2007).** Chemical composition, antioxydant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. *Food chemistry*, **105**: 146-155.
75. **Bousmaha-Marroki L., Atik B.F., Tomi F. & Casanova J. (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. *Journal of Essential oil Research*, **19(5)**: 490-493.
76. **Boutedjiret, C. (1990).** L'huile essentielle d'Artémisia herba-Alba Asso d'Algérie. Approche des conditions optimales se sont extraction par entrainement à la vapeur d'eau. Contribution à son étude analytique. Mémoire de magister en génie chimique, Ecole national polytechnique d'Alger.
77. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N. & Anackov G. (2006).** Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 1822-1828.
78. **Braga P. C., Dal Sasso M., Culici M., Bianchi T., Bordoni L. & Marabini L. (2006).** Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil Elastase. *Pharmacology*, **77(3)**: 130–136.
79. **Broadasky T. F., Lewis C. & Eble T.E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, **123**: 33-44.
80. **Bruneton J. (1987).** Mono et sesquiterpènes In éléments de phytochimie et de pharmacognosie. *Ed : Tec & Doc., Lavoisier, Paris*, 223-234.

81. **Bruneton J. (2009)**. Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinales. *Lavoisier Technique & Documentation*, 4^{ème} Edition. Paris.
82. **Burbott A. & Loomis P. (1987)**. Development, oil storage of dehiscence and peltate trichomes in *Thymus vulgaris*. *Nord J. Bot*, **3**: 245-504.
83. **Burt S. (2004)**. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223 – 253.

-C-

84. **Caldwell, C. R. (2000)**. A device for the semiautomatic determination of oxygen-radical absorbance capacity. *Analytical Biochemistry*, **287**: 226–233.
85. **Caldwell, C. R. (2001)**. Oxygen radical absorbance capacity of the phenolic compounds in plant extracts fractionated by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, **293**: 232–238.
86. **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. & Ferret A. (2007)**. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. **90**: 2580–2595.
87. **Çam, M., His il, Y., & Durmaz, G. (2009)**. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, **112(3)**: 721-726.
88. **Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. & Akpulat H.A. (2003)**. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **87**: 215-220.
89. **Cao G.H. & Prior R.L. (1999)**. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Oxidants and antioxidants. *Method. Enzymol.*, **299**: 50–62.
90. **Carrée P. (1953)**. Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II. *Ed. Ballière J. B. et fils*. 432 pages.
91. **Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V. (2002)**. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **46**: 1914–1920.
92. **Castro L. & Freeman B. A. (2001)**. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, **170**: 161-165.
93. **Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Dacunha A.P., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Casanova J. (2003)**. Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 31: P 193-201.
94. **Cavar S., Maksimovic M., Vidic D. & Paric A., (2012)**. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind. Crops Prod.* **37**: 479–485.
95. **Chai P. C., Long L. H. & Halliwell B. (2003)**. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **304**: 650–654.
96. **Chaiyana W. & Okonogi S. (2012)**. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, **19**: 836– 839.
97. **Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. & Chopineau J. (1997)**. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, **9**: P 67-75.
98. **Chan A. S. L., Pang H., Yip E. C., Tam Y. K. & Wong Y. H. (2005)**. Carvacrol and eugenol differentially stimulate intracellular Ca²⁺ mobilization and mitogen-activated protein kinases in Jurkat T-cells and monocytic THP-1 cells. *Planta Med.*, **71**: 634–639.
99. **Chander H., Kulkarni S. G. & Berry S. K. (1991)**. Effectiveness of turmeric powder and mustard oil as protectants in stored milled rice against the rice weevil *Sitophilusoryzae*. *Int. Pest control* **33**: 94-97.
100. **Chander H., Kulkarni S. K. & Berry S. G. (1992)**. Studies on turmeric and mustard oil as protectants against infestation of red Xour beetle, *Triboliumcastaneum*(Herbst) in stored rice. *J. Insect Sci.***5**: 220-222.

101. **Chandra S. (2004)**. Effect of altitude on energy exchange characteristics of some alpine medicinal crops from central Himalayas. *Journal of Agronomy and crop science*, **190 (1)**:13-20.
102. **Chandran R., Thangaraj P., Shanmugam S., Thankarajan S. & Karuppusamy A. (2012)**. Antioxidant and anti-inflammatory potential of *Monochoria vaginalis* (Burm. F.) C. Presl.: a wild edible plant. *Journal of Food Biochemistry*, **36**: 421–431.
103. **Chaouche T. M. (2014)**. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de Doctorat En Biologie Option : Biochimie. *Université de Tlemcen*. 122 pages.
104. **Chen J., Chen Y. & Yu J., (1983)**. Studies on Chinese Curcuma-IV. Quantitative determination of curcuminoids in the root and tuber *Zhongcaoyao*. *Chinese Traditional Herbal Drugs*, **14 (2)**: 59-63.
105. **Chen, P. S., Toribara, T. Y., & Warner, H. (1956)**. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**, 1756–1763.
106. **Chialva F., Monguzzi F., Manitto P. & Akgul A. (1993)**. Essential oil constituents of *Trachyspermum copticum* (L.) fruits. *Journal of Essential Oil Research*, **5**: 105 - 106.
107. **Chiej R. (1982)**. Les plantes médicinales *Ed. Solar*.
108. **Choi E.-M. & Hwang J.-K., (2004)**. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, **75**, 557–565.
109. **Choudhury S., Ahmed R., Kanjilal P. B. & Leclercq P. A. (1998)**. Composition of the seed oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Northeast India. *Journal of Essential Oil Research*, **10**: 588 - 590.
110. **Chowdhury H., Walia S. & Saxena B. S. (2000)**. Isolation, characterization and insect growth inhibitory activity of major turmeric constituents and their derivatives against *Schistocercagregaria* (Forsk) and *Dysdercuskoenigii*(Walk). *Pest Manag.Sci.* **56** : 1086-1092.
111. **Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J. (2002)**. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol.* **79(2)**: 213-320.
112. **CLSI (2006a)**. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9 (ISBN 1-56238-586-0). **26 (1)**: 39 pages.
113. **CLSI (2006b)**. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9). **26 (2)**: 31 pages.
114. **Colegate S.M. & Molineux R.J., (1993)**. Bioactive natural products. Detection, isolation structural determination. *CRC press Inc.* 528p.
115. **Combrinck S., Du Plooy G. W., Mccrindle R. I. & Botha B. M. (2007)**. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany.* **99(6)**: 1111–1119.
116. **Conforti F., Statti G.A., Tundis R., Menichini F. & Houghton P. (2002)**. Antioxi-dant activity of ethanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia* **73**: 479–483.
117. **Costa P., Goncalves S., Grosso C., Andrade P. B., Valentão P., Bernardo-Gil M. G. & Romano A. (2012)**. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products.* **36**: 246–256.
118. **Council of Europe, (1996)**. Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A, Ed. Sainte Ruffine, France.
119. **Cox S. D., Mann C. M. & Markam J. L. (2001)**. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology.* **9**: 492–497.
120. **Cummings B. J., Pike C. J., Shankle R. & Cotman C. W. (1996)**. β -Amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **17**: 921–933.

121. **Cuncio F., Pegoraro I., Dello-Russo P., Falleti F., Perrella G. & Ceriello A., (1995).** SOD and GSH inhibited the high glucose induced oxidative damage and the PDGF increased secretion in cultured human endothelial cells. *Thrombosis Homeostasis*, **74**: 963–973.

-D-

122. **da Silva J. K. R., Pinto L.C., Burbano R.M.R., Montenegro R. C., Guimarães E. F., Andrade E. H. A. & Maia J. G. S. (2014).** Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, **58**: 55–60.
123. **Damasceno E. I. T., Silva J. K. R., Andrade E. H. A., Sousa P. J. C. & Maia J. G. S. (2011).** Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Rev. Bras. Farmacog. Braz. J. Pharmacog.*, **21**: 78-85.
124. **Dandlen A. S., Lima A. S., Mendes M. D., Miguel M. G., Faleiro M. L., Sousa M. J., Pedro L. G., Barroso J. G. & Figueiredo A. C., (2010).** Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and fragrance journal*. **25**: 150–155.
125. **Dandlen S.A., Miguel M.G., Duarte J., Faleiro M.L., Sousa M.J., Lima A.S., Figueiredo A.C.; Barroso J.G. & Pedro L.G. (2011).** Acetylcholinesterase inhibition activity of Portuguese *Thymus* species essential oils. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, **14**: 140-150.
126. **Dapkevicius A., Venskutonis R., van Beek T. A. and Linssen J. P. H. (1998).** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agr.* **77**: 140- 146.
127. **Dar M. Y., Shah W. A., Rather M. A., Qurishi Y., Hamid A. & Qurishi M. A. (2011).** Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chemistry*, **129(4)**: 1606–1611.
128. **De Billerbeck V. G. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, **5**: 249–253.
129. **De Hoffman E., Charrette J. & Strootbant V., (1999).** Spectrométrie de masse. *Librairie Dunod, Paris*, p. 339.
130. **De Lisi A., Tedone L., Montesano V., Sarli G. & Negro D. (2011).** Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chemistry*. **125**: 1284–1286.
131. **De Sousa A. C., Alviano D. S., Blank A. F., Alves P. B., Alviano C. S. & Gattass C. R. (2004).** *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 677-681.
132. **Deak T. & Beuchat L. R. (1996).** Handbook of food spoilage. New York, USA : CRC Press.
133. **Deans G. C., Noble C. R., Mac Pherson A., Penzes L., Imre G. S. & Hofecker G. (1994).** Skalicky Ageing Series, vol 4, *Facultas Press*, Vienna. P 173.
134. **Delaveau P. (1987).** Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. *Ed. Albin Michel, Paris*. 130-136.
135. **Demissew S. (1993).** A description of some essential oil bearing plants in Ethiopia and their *indigeous uses*. *Journal of Essential Oil Research*, **5**: 465 —479.
136. **Desjobert G. (1997).** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils.
137. **Dhingra, O. D., Jham, G. N., Barcelos, R. C., Mendonca, F. A., & Ghiviriga, I. (2007).** Isolation and identification of the principal fungitoxic component of turmeric essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, **19**: 387–391.
138. **Diaz-Maroto M.C., Perez-Coello M.S. & Cabezudo M.D., (2002).** Effect of drying method on the volatiles in Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.). *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4520–4524.
139. **Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D. & Roncalés P. (2012).** Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science* **92**: 667–674

140. **Djenane D., Yanguela J., Amrouche T., Boubrit S., Boussad N. & Roncales P. (2011).** Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International*. **17(6)**: 505–515.
141. **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T. & Chelghoum C. (2006).** Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharmaceutical Biology*, **44(8)**: 607 – 612.
142. **Dobignard A. & Chatelain C. (2011).** Index synonymique de la flore d’Afrique du nord. Volume 2 : Dicotyledoneae : Acanthaceae - Asteraceae. *Editions des conservatoires et jardin botaniques - Genève*. 428 pages.
143. **Dobignard A. & Chatelain C. (2012).** Index synonymique de la flore d’Afrique du nord. Volume 4 : dicotyledoneae : fabaceae – nymphaeaceae. *Editions des conservatoires et jardin botaniques - Genève*. 431 pages.
144. **Dohi S., Terasaki M. & Makino M. (2009).** Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 4313-4318.
145. **Dong H. Q., Li M., Zhu F., Liu F. L. & Huang J. B. (2012).** Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*, **130**: 261–266.
146. **Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S. & Kukic J. (2007).** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **109**: 458-463.
147. **Dorman H. J. D. & Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oil. *J. Appl. Microbiol.*, **88**: 308-316.
148. **Du P. D., Tu Y. Y. & Yen G. C. (1999).** Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Sci. Technol.*, **32**: 269–277.
149. **Dubey N. K. & Mishra A. K. (1990).** Evaluation of some essential oils against dermatophytes. *Indian Drugs*, **27**: 529-531.
150. **Duh P. D. (1998).** Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 455–461.
151. **Dupont F., & Guignand J. L. (2007).** Botanique: Systématique moléculaire. 14^{ème} Edition, *Edition Masson, Paris France*. 188 pages.
152. **Dzoyem J. P. & Eloff J. N. (2015).** Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **160**: 194–201.
- E-**
153. **Edris A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, **21**: 308–323.
154. **Eigner D. & Scholz D. (1999).** *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. Review article. *Journal of Ethnopharmacology* **67**: 1-6.
155. **El Abed N., Habibi K., Kaabi B., Mejri M., Smaali M. I., Marzouki M. N., Chabbouh M., & Ben Hadj Ahmed S. (2014).** Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in minced Beef Meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2014**: 1-11.
156. **El Ajjouri M. (2013).** Etude de la composition chimique et de l'efficacité des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus* dans la préservation du bois contre les champignons lignivores. Thèse de doctorat. *Université Mohammed V - AGDAL - Rabat*. 181 pages.
157. **El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F. & Aberchane M. (2008).** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L)Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d’œuvre. *Biotechnol. Agar. Soc. Environ.* **12(4)**: 345-351.

158. **El Ouariachi E., Bouyanzer A., Salghi R., Hammouti B., Desjobert J. M., Costa J., Paolini J. & Majidi D. (2015).** Inhibition of corrosion of mild steel in 1 M HCl by the essential oil pr solvent extracts of *Ptychotis verticillata*. *Research on Chemical intermediates*, **41**: 935–946.
159. **El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J. M., Costa J. & Paolini J. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, **49**: 533–536.
160. **El-Keltawi N. E. & Croteau R. (1986a).** Influence of ethephon and daminozide on growth and essential oil content of peppermint and sage. *Phytochem*, **25**: 1285-1288.
161. **El-Keltawi N. E. & Croteau R. (1986b).** Influence of phosphon D and cycocel on growth and essential oil content of peppermint. *Phytochem*, **25**: 1603-1606.
162. **Esa R. C. S., Andrade L. N. & de Sousa D. P. (2013).** A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules*, **18**: 1227-1254.
163. **Euro+Med (2006).** Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [18/03/2015].

-F-

164. **Farfara D., Lifshitz V. & Frenkel D. (2008).** Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell Mol. Med.*, **12**: 762–780.
165. **Felidj M., Bouazza M. & Ferouani T. (2010).** Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (*verticillata*) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Geo-Eco-Trop.*, **34**: 147 – 154.
166. **Ferguson L. R. & Philpott M. (2008).** Nutrition and mutagenesis. *Annu. Rev. Nutr.* **28**: 313–329.
167. **Ferreira F. D., Kimmelmeier C., Arrotéia C. C., da Costa C. L., Mallmann C. A., Janeiro V., Ferreira F. M. D., Mossini S. A. G., Silva E. L. & Machinski Jr. M. (2013).** Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, **136**: 789–793.
168. **Figueiredo A. C., Garcia C., Sim-Sim M., Sérgio C., Pedro L. G. & Barroso J. G. (2010).** Volatiles from *Plicanthus hirtellus* (F. Weber) R.M. Schust. and *Radula boryana* (F. Weber) Nees (Hepaticae) grown in São Tomé e Príncipe Archipelago. *Flavour Fragr. J.*, **25**: 219–222.
169. **Fisher K. & Phillips C. (2009).** In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycinresistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.* **66**: 180-185.
170. **Fiske, C. H., & Subbarow, I. P. (1925).** The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375–379.
171. **Frum Y. & Viljoen A. M. (2006).** In vitro 5-lipoxygenase activity of three indigenous South African aromatic plants used in traditional healing and the stereospecific activity of limonene in the 5-lipoxygenase assay. *J. Essent. Oil Res.* **18**: 85-88.
172. **Fuentes A. O., Gutierrez E. A. & Senorans E. (2010).** Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Antiinflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1568-1575.
173. **Fujiwara M., Yagi N. & Miyazawa M. (2010).** Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Baker (Yellow Batai) and bisabolene-type sesquiterpenoids. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 2824-2829.

-G-

174. **Garneau F.X. (2004).** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. P 1-16.
175. **Garnero J., (1975).** Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition des huiles essentielles. *Journée de dermato-pharmacie (Nice)*, 105-126.
176. **Gautam R. & Jachak S. M. (2009).** Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.*, **29(5)**: 767–820.

177. **Gersbach P. V. & Reddy N. (2002)**. Non-invasive localization of thymol accumulation in *Carum copticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. *Annals of Botany*, **90**: 253 - 257.
178. **Ghanbari H., Saghravanian N., Zakery M., Mahdavi S. N., Baradaran N. E., Zareian J. M. & Parsaei H. (2008)**. Histological evaluation of *Curcuma longa-ghee* formulation and hyaluronic acid on gingival healing in dog. *Journal of Ethno pharmacology* **120**: 335-341.
179. **Ghestem A., Seguin E., Paris M. & Orecchioni A.M. (2001)**. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, -Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
180. **Giordani R., Hadeif Y. & Kaloustian J. (2008)**. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, **79**: 199-203.
181. **Giweli A. A., Džamic A. M., Sokovic M. D., Ristic M. S. & Marin P. D. (2013)**. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Cent. Eur. J. Biol.* **8(5)**: 504-511.
182. **Glimn-Lacy J. & Kaufman P. B. (2006)**. Botany illustrated. Introduction to plants, Major Groups, Flowering Plant Families. Second edition. *Springer Edition*. 146 pages.
183. **Goudarzi Gh. R., Saharkhiz M. J., Sattari M., & Zomorodian K. (2011)**. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) Essential Oil *J. Agr. Sci. Tech.* **13**: 203-208.
184. **Gounder D. K. & Lingamallu J. (2012)**. Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh, dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Industrial Crops and Products* **38**: 124– 131.
185. **Griffin S. G., Wyllie S. G., Markham J. L. & Leach D. L. (1999)**. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance Journal*. **14**: 322–332.
186. **Grosjean N. (2004)**. Huiles essentielles: Se soigner par l'aromathérapie. Ed. Eyrolles, pp 98.
187. **Guede–Guina F., Berebi-Bertrand I., Smith M.O. & Ochilo R., (1992)**. Pharmacological characterization of a novel analog from *Mansonia altissima* : an *In vitro* investigation of effets on Na⁺/K⁺-ATPase. *Cell. Molec. biol*, **5**: 240-247.
188. **Guignard J.L. (2000)**. Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé *Dunod, Paris*. 177-185.
189. **Guignard J.L., Cosson L. & Henry M. (1985)**. Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris. P 155-174.
190. **Guillier L., Nazer A.L. & Dubois-Brissonnet F. (2007)**. Growth response of *Salmonella typhimurium* in the presence of natural and synthetic antimicrobials : estimation of MIC_s From three different models. *J. Food Prot.* **70(10)**: 2243-2250.
191. **Gulcin I. (2012)**. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol*, **86**: 345-391.
192. **Gulcin I., Oktay M., Koksai E. S. erbetci H., Beydemir S. & Kufrevioglu O. I. (2008)**. Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. *Asian J Chem.* **20**:2079–2090
193. **Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. & Ozkan H. (2007)**. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. sp. *longifolia*. *Food Chem.*, **103**: 1449–1456.
194. **Guo, C., Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997)**. High-performance liquid chromatography coupled with colometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: Relationship to oxygen radical absorbance capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**: 1787–1796.
195. **Gustafson R. H. & Bowen R. E. (1997)**. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*. **83**: 531–541.

-H-

196. **Haddouchi F., Lazouni H. A., Meziane A. & Benmansour A. (2009)**. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique scienc*, **05(2)**: 246-259.

197. Halliwell B., Clement M. V. & Long L. H. (2000). Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Lett*, **486**:10–13.
198. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. & Arnoma O. L. (1987). The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem*, **165**: 215-219.
199. Hamburger M. & Hostettmann K., (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* **30**: 3864-3874.
200. Haoui I., Derriche R., Madani L. & Oukali Z. (2011). Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*. xxx, xxx–xxx. doi:10.1016/j.arabjc.2011.05.005
201. Hashemi M. B., Niakousari M., Saharkhiz M. J. & Eskandari M. H. (2014). Stabilization of sunflower oil with *Carum copticum* Benth & Hook essential oil. *J. Food Sci. Technol.*, **51**(1): 142–147.
202. Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M. L., & Miguel M. G. (2006). Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 6314-6321.
203. Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo A. R., Faleiro M. L. & Miguel M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*, **116**: 741-721.
204. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris, L. G. M. & Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3590–3595.
205. Henderson W. R. (1994). The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med.*, **121**(9): 684–97.
206. Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L., & Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer*, **45**: 226–235.
207. Hiura T. S., Kaszubowski M. P., Li N. & Nel A. E. (1999). Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J. Immunol.*, **163**: 5582-5591.
208. Hochstein P. & Atallah A. S. (1988). The nature of oxidant and antioxidant systems in inhibition of mutation and cancer. *Mutat. Res.*, **202**: 363-375.
209. Hofler M., Buchbauer G., Jirovetz L., Schmidt E., Stoyanova A., Denkova Z., Slavchev A. & Geissler M. (2009). Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents. *Journal of Essential Oil Research*, **21**: 459-463.
210. Hombourger C. (2010). Le Curcuma, de l'épice au médicament. Thèse Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Faculté de pharmacie. Université Henri Poincaré, Nancy 1. 222 pages.
211. Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. *Edition De Boeck & Larcier*. p 515.
212. Houmani Z., Azzoudj S., Naxakis G. & Skoula M. (2002). The Essential Oil Composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. **9**(4): 275-280.
213. Howes M. R. & Houghton P. J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **75**: 513–527.
214. Huang C. C., Wang H. F., Chen C. H., Chen Y. J. & Yih K. H. (2011). A study of four antioxidant activities and major chemical component analyses of twenty-five commonly used essential oils. *J. Cosmet. Sci.*, **62**: 393–404.
215. Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A. & Deemer E. K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1815–1821 .
216. Hurtel J. M. (2007). Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. *Art. Revue NAFAS. Edition de santé*. **5**(1): 3-26.
217. Hussain A. I., Anwar F., Hussain Sherazi S. T. & Przybylski R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* **108**: 986–995.

218. **Hyun T. K., Kim H. C. & Kim J. S. (2014)**. Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Industrial Crops and Products*, **52**: 611– 616.

-I-

219. **Ibrahim M. A., Kainulainen P., Aflatuni A., Tiilikkala K. & Holopainen J. K. (2001)**. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and Phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agr. Food Sci. Finland*, **10**: 243-259.
220. **Iserin P. (2001)**. Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soin. Larousse Paris. 335 pages.
221. **Ishtiaque S., Khan N., Siddiqui M. A., Siddiqui R. & Naz S. (2013)**. Antioxidant Potential of the Extracts, Fractions and Oils Derived from Oilseeds. *Antioxidants*, **2**: 246-256.

-J-

222. **Jafri M.A., Farah Javed K. & Singh S. (2001)**. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *J. Ethnopharmacol.* **75**: 89-94.
223. **Jagetia G & Baliga M. (2005)**. The effect of seasonal variation on the Antineoplastic activity of *Alstonia scholaris* R.Br.in HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*. **96 (1-2)**: 37-42.
224. **Jamali C. A., El Bouzidi L., Bekkouche K., Lahcen H., Markouk M., Wohlmuth H., Leach D. & Abbad A. (2012)**. Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chemistry & Biodiversity*, **9**: 1188-1197.
225. **Jayaprakasha G. K., Jena B. S., Negi P. S. & Sakariah K. K. (2002)**. Evaluation of Antioxidant Activities and Antimutagenicity of Turmeric Oil: A Byproduct from Curcumin Production. *Z. Naturforsch.*, **57c**: 828-835.
226. **Jayaprakasha, G. K., Jagan, L., Rao, L. J. M., & Sakariah, K. S. (2005)**. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Journal of Food Science and Technology*, **20**: 1–16.
227. **Jayasena D. D. & Jo C. (2013)**. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **34**: 96-108
228. **Jia H. L., Ji Q. L., Xing S. L., Zhang P. H., Zhu G. L. & Wang X. H. (2010)**. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. *J. Food Sci.*, **75**: E59-E65.
229. **Jilani G. & Saxena R. C. (1990)**. Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweetflag oil, neem oil and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Econ. Entomol.* **83**: 629-634.
230. **Jordan M. J., Martinez R. M., Goodner K. L., Baldwin E. A. & Sotomayor J. A. (2006)**. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*.
231. **Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M. & Milos M. (2007)**. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.*, **21**: 259-261.
232. **Juliano C., Mattana A. & Usai M. (2000)**. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, **12**: 516–522
233. **Juteau F., Masotte V., Bessiere J.M. & Viano J. (2002)**. Compositional characteristics of essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Biochemical Systematic and Ecology*, **30**: P 1065-1070.
234. **Juven B. J., Kanner J., Schved F. & Weisslowiez H. (1994)**. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 626-631.

-K-

235. **Kalemba D. & Kunicka A. (2003)**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.
236. **Kamatou G. P. P.; van Zyl R. L.; van Vuuren S. F.; Viljoen A. M.; Figueiredo A. C.; Barroso J. G.; Pedro L. G. & Tilney P. M. (2006)**. Chemical composition, leaf trichome types and biological

- activities of the essential oils of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. *J. Essent. Oil Res.*, **18**: 72-79.
237. **Kambouche N. & El-Abed D. (2003)**. Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *Journal of Essential Oil Research*, **15**: 10-11.
238. **Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D. & Skaltsa H. (2006)**. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* **72**: 1330-1334.
239. **Karray-Bouraoui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A. & Marzouk B. (2009)**. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*. **30**: 338–343.
240. **Kavoosi G. & Teixeira da Silva J. A. (2012)**. Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in glucose-stimulated human monocyte. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 3079–3085.
241. **Kavoosi G., Purfard A. M. & Aram F. (2012)**. Radical scavenging properties of essential oils from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S1351-S1356.
242. **Kedia A., Prakash B., Mishra P. K., Dwivedy A. K. & Dubey N. K. (2015)**. *Trachyspermum ammi* L. essential oil as plant based preservative in food system. *Industrial Crops and Products*, **69**: 104–109.
243. **Khadir A., Bendahou M., Benbelaid F., Bellahcene C., Abdelouahid D. E., Museili A., Paolini J. & Desjobert J. & Costa J. (2013)**. Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3(7)**: 018-024.
244. **Khadri A., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F., Neffati M., Smiti S. & Araújo M. E. M. (2008)**. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng: dc composition by GC–mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food Chem.*, **109**: 630–637.
245. **Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F. & Pirmoradei M.R. (2005)**. Comparison of essential oil composition of *Ferula assafoetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. **91**: 639-644.
246. **Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F. & Bahramifar N. (2004)**. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, **86**: 587-591.
247. **Kholkhal F. (2014)**. Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et ssp. *eu-ciliatus*. Thèse de doctorat en Biologie. Université de Tlemcen. 200 pages.
248. **Kholkhal F., Lazouni H. A., Bendahou M., Boublenza I., Chabane Sari D. & Chaouch T. (2013)**. Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus*. *Afrique SCIENCE* **09(1)**: 151 – 158.
249. **Kim E. Y., Baik I. H., Kim J. H., Kim S. R. & Rhyu M. R. (2004)**. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **36**: 333–338.
250. **Kim M. K., Choi G. J. & Lee H. S. (2003)**. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in greenhouse. *J.Agric. Food chem.* **51**: 1578-1581.
251. **Kim S. B., Kim I. S., Yeum D. M. & Park Y. H. (1991)**. Mutagenicity of Maillard reaction products from D-glucose-amino acid mixtures and possible roles of active oxygens in mutagenicity. *Mutat. Res.*, **254**: 65- 69.
252. **Kim S. W., Kang J. & Park I. K. (2013)**. Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **16**: 443–448.
253. **Kızıl G., Kızıl M., Yavuz M., Emen S. & Hakimoglu F. (2008)**. Antioxidant activities of ethanol extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroides*. *Pharm. Biol.* **46**: 231–242.

254. **Kohri S., Fujii H., Oowada S., Endoh N., Sueishi Y., Kusakabe M., Shimmei M. & Kotake Y. (2009).** An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Anal Biochem.* **386**: 167–171
255. **Kong J.K., Goh N.K., Chia L.S. & Chia T.F., (2003).** Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin* **24**: 7-21.
256. **Krishnaiah D., Sarbatly R. & Nithyanandam R. (2011).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing.* **89**: 217–233
257. **Kumar B. S. A., Lakshman K., Jayaveea K. N., Shekar D. S., Khan S., Thippeswamy B. S. & Veerapur V. P. (2012).** Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **64**: 75– 79.

-L-

258. **Lambert R. J. W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G. J. E. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 453–462.
259. **Lang G. & Buchbauer G. (2012).** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* **27**: 13–39.
260. **Laouer H. (2004).** Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoide spusillaet* de *Magydari spastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
261. **Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Singh G., Marimuthu P., de Heluani C., Catalan C. & Baldovini N. (2008).** Composition and Antibacterial Activity of The Essential Oil of *Ammoides atlantica* (Coss. et Dur.) Wolf. *Journal of Essential Oil Research*, **20**: 266-269.
262. **Laouer H., Zerroug M. M., Sahli F., Chaker A. N. Valentini G., Ferretti G., Grande M. & Anaya J. (2003).** Composition and Antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential oil Research*, **15**: 135-138.
263. **Laouer H., Zerroug M. M., Sahli F., Chaker A. N. Valentini G., Ferretti G., Grande M. & Anaya J. (2003).** Composition and Antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. essential oil. *Journal of Essential oil Research*, **15**: 135-138.
264. **Le Cren F. (2004).** Les antioxydants, la révolution du XXI^e siècle, 2^{ème} édition. Éd. Québecor. 223 pages.
265. **Lee S.-J., Umamo K., Shibamoto T. & Lee K.-G., (2005).** Identification of volatile compounds in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, **91**: 131–137.
266. **Leela N. K., Tava A., Shafi P. M., John S. P. & Chempakam B. (2002).** Chemical composition of essential oils of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Acta Pharmaceutica*, **52**: 137-141.
267. **Legault J. & Pichette A. (2007).** Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**: 1643-1647.
268. **Lertsatitthanakorn P., Taweechaisupapong S., Aromdee C. & Khunkitti W. (2006).** *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. *Int. J. Aromather.* **16**, 43-49.
269. **Li L., Braiteh F. S., Kurzrock R. (2005).** Liposome-Encapsulated Curcumin. *In Vitro* and *In Vivo* Effects on Proliferation, Apoptosis, Signaling, and Angiogenesis. *Cancer.* **104**, 1322–1331.
270. **Li L., Luo Z-Q., Ma G-Y., Zhang Y-O & Zhao G-J. (1997).** GC/MS study on chemical constituents from zingiberaceae plants. *Guangpu Shiyanshi*, **14**: 1-5.
271. **Lien E. J., Ren S., Bui H. H. & Wang R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radic Biol Med*, **26**: 285-294.
272. **Lin W. C. & Lin J. Y. (2011).** Five Bitter Compounds Display Different Anti-inflammatory Effects through Modulating Cytokine Secretion Using Mouse Primary Splenocytes in Vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **59**: 184–192.

273. **Linstrom P. J. & Mallard W.G. (2014)**. NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, Eds., NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov>.
274. **Loap S. (2008)**. Curcuma (partie I). *Phytothérapie*, **6**: 22–28.
275. **Loc N. H., Diem D. T. H., Binh D. H. N., Huong D. T., Kim T. G. & Yang M.S. (2008)**. Isolation and Characterization of Antioxidation Enzymes from Cells of Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) Cultured in a 5-1 Bioreactor. *Mol. Biotechnol.*, **38**: 81-87.
276. **Lopes G.K., Schulman H.M. & Hermes-Lima M. (1999)**. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1472**: 142-152.
277. **Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C. S. & Kolodziejczyk P. P. (2008)**. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, **69(8)**: 1732–1738.
278. **Lorin A., Flore C., Thomas A. & Brasseur R. (2004)**. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **8(3)**: 163–176.
279. **Lourens A. C. U., Reddy D., Başer K. H. C., Viljoen A. M. & van Vuuren S. F. (2004)**. *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *J. Ethnopharmacol.*, **95**: 253-258.
280. **Lucienne A. D. (2010)**. les plantes médicinales d'Algérie .Ed. Berti. 239 p.
- M-**
281. **MacDonald-Wicks L. K., Wood L. G. & Garg M. L. (2006)**. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 2046–2056.
282. **Madeira S. V.F., Rabelo M., Soares P. M. G., Souza E. P., Meineles A. V. P., Montenegro C., Lima R. F., Assreuy A. M. S. & Criddle D. N. (2005)**. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L.(labiateae) on Guinea-pigileum. *Phytomedicine*, **12**: P 506-509.
283. **Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L. & Zygadlo, J.A. (2006)**. Natural products as antioxidants. In: Filippo, I. (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research*. Res. Signpost, Trivandrum, India, pp. 105–135.
284. **Mahboubi M. & Kazempour N. (2011)**. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iranian Journal of Microbiology*. **3(4)**: 194-200.
285. **Maheshwari R. K., Singh A. K., Gaddipati J. & Srimal R. C. (2006)**. Multiple biological activities of curcum: a short review. *Life Sci.*, **78**: 2081–2087.
286. **Majinda R. R. T., Abegaz B. M. & Bezabih. (2001)**. Recent results from naturel production research at the University of Botswana. *Pure. Appl. chem.* **73(7)**: 1197-1208.
287. **Mantle D., Anderton J. G., Falkous G., Barnes M., Jones P. & Perry E. K. (1998)**. Comparison of methods for determination of total antioxydant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **121**: 385-391.
288. **Mantle D., Pickering A. T. & Perry E. K. (2000)**. Medicinal plant extracts for the treatment of dementia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *CNS Drugs*, **13**: 201-213.
289. **Manzan A. C. M., Toniolo F. S., Bredow E. & Povh N. P. (2003)**. Extraction of essential oil and pigments from *Curcuma longa* (L.) by steam distillation and extraction with volatile solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 6802-6807.
290. **Marcoux F.W. & Choi D.W. (2002)**. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 155, CNS Neuroprotection. *Springer, Berlin, Heidelberg, Germany*, 308–312.
291. **Martin S., Ocete M. A., Galvez J., Jimenez J. & Zarzuelo A. (1993)**. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *Planta Med.*, **59**: 533–536.

292. Mastelić, J., Jerković, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki V., Zarcović N., Brčić-Kostić K., Vikić-Topić D. & Müller N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 3989-1996.
293. Mata A. T., Proenca C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F. & Araújo M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.*, **103**: 778-786.
294. Mau J. L., Lai E. Y. C., Wang N. P., Chen C. C., Chang C. H. & Chyau C. C. (2003). Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chemistry*, **82**: 583-591.
295. May J., Chan C.H., King A., Williams L. & French G.L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 639-643.
296. Mazumder J., Kumria R. & Pathak D. (2014). Evaluation Of Synergistic Antimicrobial Activity and Antioxidant Activity of blend of Essential Oil contains Fennel, Coriander, Ajowan and Caraway. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **9(1)**: 87-94.
297. Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A. & Ziad A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 839-847.
298. Mehta R. L. & Zayas J. F. (1995). Anoxidative effect of ajowan in a model system. *JAOCS*, **72**: 1215-1218.
299. Mehtas R. L., Zayas J. F. & Yang S. S. (1994). Ajowan as a source of natural lipid antioxidant. *Journal of Agriculture and food chemistry*, **42**: 1420-1422.
300. Meliani N., Dib M. E. A., Allali H. & Tabti B. (2011). Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 468-471
301. Miguel G., Simões M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. & Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.*, **86**: 183-188.
302. Miguel M. G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, **15**: 9252-9287.
303. Miguel M. G., Doughmi O., Aazza S., Antunes D., & Lyoussi B. (2014). Antioxidant, Anti-inflammatory and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Propolis from Different Regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10068-014-0.
304. Miguel M.G., Cruz C., Faleiro L., Simoes M.F.F., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Pedro L.G., (2010). *Foeniculum vulgare*: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat. Prod. Commun.*, **5**, 319-328.
305. Miguel M.G., Figueiredo C., Costa M.M., Martins D., Duarte J., Barroso J. G. & Pedro L.G. (2003). Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. carnosus* and *T. capiata* in sunflower oil. *Nahrung Food*, **47(6)**: P 397-402.
306. Millago H., Guisson IP., Naculma O. & Traore A S. (2005). Savoir traditionnel et médicament traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre centre européen de santé humanitaire ; Lyon.
307. Miller N. J., Sampson, J. & Candeias L.P. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Letter*, **384**: P 240-2.
308. Miller, N.J. & Rice-Evans C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem*, **60**: 331.
309. Miyazawa M. & Yamafuji C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1765-1768.
310. Moazeni M., Saharkhiz M. J. & Hosseini A. A. (2012). *In vitro* lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces, *Vet. Parasitol.*, **187**: 203-208.

311. **Mockute D. & Judzentiene A. (2003)**. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: P 1033-1045.
312. **Mohamed A. K., Bierhaus A., Schiekofer S., Tritschler H., Ziegler H. & Nawroth, P. P. (1999)**. The role of oxidative stress and NF (B) activation in late diabetic complications. *Biofactors*, 10: 171–179.
313. **Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M., Sactton M.F. & Boldrini E. (2002)**. Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 237: 209-214.
314. **Moon J. K. & Shibamoto T. (2009)**. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: 1655–1666.
315. **Mosmann T. (1983)**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63.
316. **Mourtas S., Canovi M., Zona C., Aurilia D., Niarakis A., La Ferla B., Salmona M., Nicotra F, Gobbi M. & Antimisiaris S. G. (2011)**. Curcumin-decorated nanoliposomes with very high affinity for amyloid- β 1-42 peptide. *Biomaterial*, 32, 1635–1645.
317. **Mukherjee P. K., Kumar V., Mal M. & Houghton P. J. (2007)**. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14: 289–300.

-N-

318. **Naghbi F, Mohamedi M.S & Ghorbani A. (2005)**. Labiatae family in folk Medicine in Iran., from Ethnobotany to pharmacology ., *Iranian Journal of pharmaceutical Research*., Vol (2) ., p 63-79.
319. **Nampoothiri S. V., Lekshmi P. C., Venugopalan V. V. & Menon A. N. (2012)**. Antidiabetic and antioxidant potentials of spent turmeric oleoresin, a by-product from curcumin production industry. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S169-S172.
320. **Napagoda M., Gerstmeier J., Wesely S., Popella S., Lorenz S., Scheubert K., Svatoš A. & Werz O. (2014)**. Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 151: 800–809
321. **Narayana C., Somayajulu B. A. R. & Thirumala S. D. (1967)**. Recovery of fatty oil from spent seeds of Ajowan (*Trachyspermum ammi* Linn.). *Indian Journal of Technology*, 5: 268 - 269.
322. **Negi P. S., Jayaprakasha G. K., Jagan Mohan Rao L. & Sakariah K. K. (1999)**. Antibacterial Activity of Turmeric Oil: A Byproduct from Curcumin Manufacture. *J. Agric. Food Chem.*, 47(10): 4297-2300.
323. **Nejjah, F., Ouhssine, M., Srhiri, A. A., El Yachoui, M. & Hajjaji, N. (2006)**. Activité Inhibitrice de la N-hexadécylbétaine sur *Staphylococcus aureus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145: 85-90.
324. **Nickavar B., Adeli A. & Nickavar A. (2014)**. TLC-Bioautography and GC-MS Analyses for Detection and Identification of Antioxidant Constituents of *Trachyspermum copticum* Essential Oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1): 127-133.
325. **Nicolas, M., & Daniel, C. (1998)**. Activités technologiques en microbiologie1 -Techniques de base et méthodologie. *Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux*, 152 pages.
326. **Nigram C., Shakum W. & Levi L. (1963)**. Determination of trace constituents of oil of Ajowan. *Perfumery Essential Oil Record*, 54: 25 - 28.
327. **Nodorostova L., Kloucek P., Ladislav Kokoska L., Stolcova M. & Pulkrabek J. (2009)**. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*. 20: 157-160.

-O-

328. **Ocana-Fuentes A., Arranz-Gutiérrez E., Señorans F. J. & Reglero G. (2010)**. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1568–1575.

329. **Oh M. H., Houghton P. J., Whang W. K. & Cho J. H. (2004).** Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine*, **11**: 544–548.
330. **Okunda A. L. (2002).** *Ageratum conyzoides*.L. (Asteraceae), *Fitoterapia*.**73 (1)**:1-16.
331. **Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C. & Ferri P.H. (2005).** Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptissua veolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: P 275-285.
332. **Orhan I., Senol F. S., Gulpinar A. R., Martal M., Sekeroglu N., Deveci M., Kan Y. & Sener B. (2009).** Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotricum niveum*, *Thymus praecox* susp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and chemical toxicology*, **47**: 1304-1310.
333. **Ou B., Hampsch-Woodill M. & Prior R.L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 4619–4626.
334. **Ouattara B., Simard R. E., Holley A. R., Piette G. J. P. & Bégin R. (1997).** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, **37**: 155-162.
335. **Oussalah M., Caillet S., Saucier L., & Lacroix M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **18(5)**: 414-420,
336. **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2006).** Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, **73**: 236-244.
337. **Ozsoy-Sacan O., Yanardag R., Orak H., Ozgey Y., Yarat A. & Tunalı T. (2006).** Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **104**: 175–181
338. **Öztürk M. (2012).** Anticholinesterase and antioxidant activities of savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chem.*, **134**: 48–54.
- P-**
339. **Padrini F. & Lucheroni M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles: Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromomassage énergétique avec plus de 100 photographies. *Ed. De Vecchi*, pp 15.
340. **Palà-paul J., Perez-Alonso M. J., Velasco-Negueruel A., Pala-paul R., Sanz J. & Conejero F. (2001).** Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. *spp rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic and Ecology*, **29**: 663-672.
341. **Pallecier J. (1976).** Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*, **9**: 135-159.
342. **Paris M. & Hurabielle M. (1981).** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Ed. Masson. P339.
343. **Paul S., Dubey R. C., Maheswari D. K. & Kang S. C. (2011).** *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogen. *Food Control*, **22**: 725-731.
344. **Pelli K. & Lyly M. (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. *Edition INRA*.
345. **Peng H.Y. & Yang X. E. (2005).** Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science*, **6B (2)**: P 91-95.
346. **Péret-Almeida, L., Naghetini, C. C., Nunan, E. A., Junqueira, R. G., & Glória, M. B. A. (2008).** Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. *Ciência e Agrotecnologia*, **32**: 875–881.
347. **Pergola, C. & Werz, O. (2010).** 5-Lipoxygenase inhibitors: are view of recent developments and patents. *Expert Opin. Ther. Patents* **20(3)**: 355–375.

348. **Perry N. S. L., Houghton P., Theobald A., Jenner P. & Perry E. K. (2000).** *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**: 895-902.
349. **Perry N.B., Anderson R.E. & Brenna N. J. (1999).** Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis*): variation among individuals, plant parts, seasons and sites. *J. Agric. Chem.* **47(5)**: 48-54.
350. **Pibiri M. C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse doctorat, Ecole polytechnique fédérale de lausanne. 161 pages.
351. **Pokorny J., Yanishlieva N. & Gordon M. (2001).** Antioxidants in food, Practical applications. *Woodhead Publishing Limited.* 288 pages.
352. **Politeo O., Jukic M. & Milos M. (2007).** Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chem.*, **101**: 379-385.
353. **Portes E. (2008).** Synthèses et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de Doctorat en Chimie Organique. *Université BORDEUX I.*
354. **Posadzki P., Watson L. & Ernst E. (2013).** Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clin Med*, **13**: 7-12.
355. **Prieto P., Pineda M. & Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, **269(2)**: 337-341.
356. **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.
357. **Prior, R. L. & Cao, G. (1999).** *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Bio. Med.* **27**: 1173-1181.
358. **Priya R., Prathapan A., Raghu K. G. & Menon A. N. (2012).** Chemical composition and *in vitro* antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S695-S699.

-Q-

359. **Quezel P. & Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. *Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris France.* 603 pages.

-R-

360. **Ramassamy C. (2006).** Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.*, **545**: 51-64.
361. **Ramos M., Jiménez A., Peltzer M. & Garrigós M.C., (2012).** Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.*, **109**: 513-519.
362. **Randrianalijaona J.A., Ramanoelina P.A.R., Rasoarzhona J.R.E. & Gaydou E.M. (2005).** Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta*, **545**: P 46-52.
363. **Raut J. S. & Karuppayil S. M. (2014).** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, **62**: 250-264.
364. **Ravindra P. N., Nirmal Babu K. & Shiva K.N. (2007).** Botany and crop improvement of turmeric. **In: Ravindra, P.N., Nirmal Babu, K., Sivaraman, K.,** Turmeric, The Genus *Curcuma*, vol. 45. *CRC Press (Taylor & Francis Group)*, 15-77.
365. **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.

366. **Reddy M. V. B., Angers P., Gosselin A. & Ami J. (1998)**. Characterisation and use of *essential oil from Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in *strawberry fruits*. *Phytochemistry*, **47**: 1515 - 1520.
367. **Richard H., Benjilali B., Banquour N. & Baritaux O. (1985)**. Etude de diverses huiles essentielles de thym de Maroc. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, **18**: 105 - 110.
368. **Rigaud J. L. (2002)**. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 753–766.
369. **Robard I. (2004)**. Plantes médicinales d'outre-mer et pharmacopées : aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie*, **1**: 16-21.
370. **Ruberto G. & Baratta M. T. (2000)**. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.*, **69**: 167-174.
371. **Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C. & Bicchi C. (2010)**. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.*, **25**: 282-290.
372. **Ruby A. J., Kuttan G., Babu K. D., Rajasekharan K. N. & Kuttan R. (1995)**. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* **94(1)**: 79–83.
373. **Ruch R. J., Cheng S. J. & Klaunig J. E. (1989)**. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen*, **10**: 1003–1008.

-S-

374. **Sagdiç, O. & Ozcan, M. (2003)**. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food control*, **14**:141-143.
375. **Sahoo S., Parida R., Singh S., Padhy R. N. & Nayak S. (2014)**. Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of *in vitro* propagated *Kaempferia galanga* Linn. *Journal of Acute Disease*, 124-130.
376. **Sahreem S., Khan M.R. & Khan R.A. (2010)**. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.*, **122**: 1205–1211.
377. **Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K. & Huuskonen J. (2008)**. Terpenoids: natural inhibitors of NF-κB signalling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2979-2999.
378. **Samy R. P. & Gopalakrishnakone, P. (2010)**. Review : Therapeutic potential of plants as anti-microbial for drug discovery. *eCAM*, **7(3)**: 283-294.
379. **Sanchez-Vioque R., Polissiou M., Astraka K., Mozos-Pascual M., Tarantilis P., Herraiz-Penalver D. & Santana-Meridas O. (2013)**. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Ind. Crops Prod.*, **49**: 150–159.
380. **Sangwan N .S., Farooqui A. H. A., Shabih F. & Sangwan R. S. (2001)**. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* **34**: 3-21.
381. **Santocono M., Zurria M., Berrettini M., Fedeli D. & Falcioni G. (2006)**. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, **85**: 205–215.
382. **Sarikurku C., Ozer M. S., Eskici M., Tepe B., Can S. & Mete E. (2010)**. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1801–1805.
383. **Savelev S., Okello E., Perry N. S. L., Wilkins R. M. & Perry E. K. (2003)**. Synergistic and antagonistic interaction of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lacandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **75**: 661-668.
384. **Scarpini E., Schelterns P. & Feldman H. (2003)**. Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. *Lancet Neurol.*, **2**: 539–547.
385. **Schirner M. (2004)**. Huiles essentielles: Description de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. *Guy Trédaniel*, 23.

386. **Schulz V. (2003)**. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, **10**: 74–79.
387. **Schwob I., Bessiere J.M., Masotti V. & Viano J. (2004)**. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**: 735-745.
388. **Scollan N.D., Richardson L., De smet S., Moloney A.P., Doreau M., Bouchart D. & Nuernberg K. (2005)**. Indication of milk and beef quality. Pp 151-162. JF Hoquette et S Gigli Editors, Wageningen Academic Publishers ; Wageningen, Netherlands.
389. **Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z. & Ahmadi S. (2007)**. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* jamzad. *Food chemistry*, **100**: 1054-1058.
390. **Selim S. (2011)**. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant Enterococci (vre) and *Escherichia coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian journal of microbiology*. **42**: 187-196
391. **Senthilkumar A. & Venkatesalu V. (2013)**. Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from the fruit pulp of wood apple, *Industrial Crops and Products*, **46**: 66– 72.
392. **Şerbetçi T., Özsoy N., Demirci B., Can A., Kültür Ş. & can Başer K. H., (2012)**. Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of *Hypericum lydium* Boiss. *Ind. Crops Prod.*, **36**: 599–606.
393. **Sertel S., Eichhorn T., Plinkert P. & Efferth T. (2011)**. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, **31**: 81–87.
394. **Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Hendawy, S.F., Omer, E.A., Hammouda, F.M., Abdel-Rahman F. & Saleh M.A. (2011)**. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules*, **16**: 1366-1377.
395. **Sharma P. R., Mondhe D. M., Muthiah S., Pal H. C., Shahi A. K., Saxena A. K. & Qazi G. N., (2009)**. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* **179**: 160-168.
396. **Sharma R. A., Gescher A. J. & Steward W. P. (2005)**. Curcumin: The story so far. *European journal of Cancer*. **41**: 1955-1968.
397. **Sharma R. K., Misra B. R., Sharma T. C., Bordoloi A. K, Pathak M. G. & Leclercq R. A. (1997)**. Essential oils of *Curcuma longa* L from Bhutan. *J. Essent. oil. Res.*, **9**: 589- 592.
398. **Shin S. & Kim J. H. (2005)**. In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 897-901.
399. **Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O.Jr, Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G. & Henriques M.G. (1999)**. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* **66**: 57-69.
400. **Siddhuruju P. & Becker K. (2007)**. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chem*, **101**: 10-19.
401. **Sikkema J., Bont J.A.M. & Poolman B. (1994)**. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. **269**: 8022–8028.
402. **Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O. & Dias A.C.P. (2005)**. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*. **90**: 157–167.
403. **Silvestre A.J.D., Cavaleiro J.A.S., Delmond B., Filliatre C. & Bourgeois G. (1997)**. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulis* Labill. From Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, **6**: P27-33.
404. **Singh G., Kapoor I. P. S., Singh P., de Heluani C. S., de Lampasona M. P. & Catalan C. A. N. (2010a)**. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1026-1031

405. Singh G., Maurya S., Marimuthu P., Murali H. S. & Bawa A. S. (2007). Antioxidant and antibacterial investigations on essential oils and acetone extracts of some spices. *Natural Product Radiancance*, **6(2)**: 114-121.
406. Singh H. P., Kaur S., Mittal S., Batish D. R. & Kohli R. K. (2010b). In vitro screening of essential oil from young and mature leaves of *Artemisia scoparia* compared to its major constituents for free radical scavenging activity. *Food Chem. Toxicol.*, **48**: 1040–1044.
407. Singh H. P., Kaur S., Negi K., Kumari S., Saini V., Batish D. R. & Kohli R. K. (2012). Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT - Food Science and Technology*, **48**: 237-241.
408. Singh S. (2007). From exotic spice to modern drug, *Cell*. **130**: 765-768.
409. Singh S., Sankar B., Rajesh S., Sahoo K., Subudhi E. & Nayak S. (2011). Chemical Composition of Turmeric Oil (*Curcuma longa* L. cv. Roma) and its Antimicrobial Activity against Eye Infecting Pathogens. *Journal of Essential Oil Research*, **23**: 11-18.
410. Singh, G., Singh, O. P., & Maurya, S. (2002). Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, **45**: 75–81.
411. Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K. & Nychas G. J. E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*. **13(1)**: 65–75.
412. Skoula M., Abidi C. & Kokkalou E. (1996). Essential oil variation of *Lavandulastoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, **24 (3)**: 255-260.
413. Smallfield B. (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, **45**: 4.
414. Sneader W. (1985). Drug discovery: The evolution of modern medicines. *John Wiley & Sons. Inc, Somerset, New Jersey, U.S.A.* 435p.
415. Snyder S. E., Gunupudi N., Sherman P. S., Butch E. R., Skaddan M. B., Kilbourn M. R., Koeppe R. A. & Kuhl D. E. (2001). Radiolabeled cholinesterase substrates: in vitro methods for determining structure-activity relationships and identification of a positron emission tomography radiopharmaceutical for in vivo measurement of butyrylcholinesterase activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**: 132–143.
416. Sokmen A., Gulluce M., Akpulat A. H., Deferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. & Sahin F. (2004). The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, **15**: 627-634.
417. Solomakos N., Govaris A., Koidis P. & Botsoglou N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, **80**: 159–166.
418. Song Y. M., Ding L., Hou Q., Liu J. W. & Zhu Z. L. (2009). Syntheses characterization and biological activities of rare earth metal complexe with curcumin and 1,10-phenanthroline-5,6-dione. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **103(3)**: 396-400.
419. Sosa S., Altinier G., Politi M., Braca A., Morelli I. & Della Loggia R. (2005). Extracts and constituents of *Lavandulamultifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, **12(4)**: 271–277.
420. Srivastava M., Saxena A. & Baby P. (1999). GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copticum* Benth & look. *Acta Alimentaria*, **28**: 291-295.
421. Stahl-Biskup E. & Saez F. (2002). Thyme, the genus *Thymus*. *Published by Taylor & Francis Inc.* 330 pages.
422. Syamsir D. R. B. (2009). Essential oils and biological activities of three selected wild *Alpinia* species. Master thesis, Institute of Biological Sciences, Faculty of Sciences, *University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia*.

-T-

423. **Takahashi M., Uechi S., Takara K., Asikin Y. & Wada K. (2009).** Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 9141–9146.
424. **Tang W. & Eisenbrand G. (1992).** Chinese Drugs of Plant Origin. *Ed. Springer-Verlag*. 401-415.
425. **Teissedre P.L. & Waterhouse, A.L. (2000).** Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 3801–3805.
426. **Tel G., Ozturk M., Duru M. E., Harmandar M. & Topcu G. (2010).** Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 3189–3193.
427. **Telefo P.B., Lemfack M.C., Bayala B., Lienou L.L., Goka C.S., Yemele M.D., Mouokeu C., Tagne S.R. & Moundipa F.P. (2012).** Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine dans les localités de Fossong-Wentcheng et Foto, Cameroun. *Phytothérapie*, **10**: 25–34.
428. **Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M. & Sokmen A. (2004).** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbr et et Aucherex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* **84**: 519–525.
429. **Tepe B., Sarikurkcu C., Berk S. & Akpulat H. A. (2011).** Chemical Composition, Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Record of Natural Products*. **5(3)**: 208-220.
430. **Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Daferera D., Polissiou M. & Sokmen A. (2005).** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, **66** : 447–454.
431. **Teuscher E., Anton R. & Lobstein A. (2005).** plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc editions, Paris.
432. **Thirugnanasampandan R., Jayakumar R. & Prabhakaran M. (2012).** Analysis of chemical composition and evaluation of antigenotoxic, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S1276-S1279.
433. **Thirumalai T., Therasa S. V., Elumalai E. K. & David E. (2011).** Hypoglycemic effect of *Brassica juncea* (seeds) on streptozotocin induced diabetic male albino rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 323-325.
434. **Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A. & Nazemi J. (2010).** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine*. **17**: 142-145.
435. **Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro, V., De Pasquale A. & Saija A. (2005).** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.*, **89**: 549–554.
436. **Toubal O., Djahoudi A. & Henchiri C. (2011).** Phytochemical study and antimicrobial activity of *Ammoides verticillata*, an Algerian endemic species. *Current Opinion in Biotechnology*. **22S**: S15–S152.
437. **Trabut L. C. (1935).** Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. Alger. 355 p. (Collection du centenaire de l'Algérie. Flore du nord de l'Afrique).
438. **Tripathi R., Mohan H. & Kamat J. P. (2007).** Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chem.* **100**: 81–90.
439. **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**: 2474–2478.
440. **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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75(10)**: 1977–1983.

441. **Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T. & Tada K. (1980).** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, **26**: 171-176.

-U-

442. **Ueno H., Nakmuro K., Sayato Y. & Okada S. (1991).** Characteristics of mutagenesis by glyoxal in *Salmonella typhimurium*: contribution of singlet oxygen. *Mutat. Res.*, **251**: 99-107.
443. **Ultee A., Bennink M.H.J. & Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68(4)**: 1561-1568.
444. **Ultee A., Kets E. P. & Smid E. J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 4606-4610.
445. **Ultee A., Slump R. A., Steging G. & Smid E. J. (2000).** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, **63 (5)**: 620-624.
446. **Umezu T. (1999).** Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**: 35-40.
447. **Ündeğer U., Başaran A., Degen G. H. & Başaran N. (2009).** Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.*, **47**: 2037-2043.
448. **Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B. & Sokmen A (2002).** Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae) *J. Ethnopharmacol.* **83**: 117-121.
449. **Upadhyay R. K., Dwivedi P. & Ahmad S. (2010).** Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. *Asian Journal of Medical Sciences*, **2(3)**: 152-158.

-V-

450. **Valnet J. (2001).** La phytothérapie - traitement des maladies par les plantes –Se soigner par les plantes. *Ed. Vigot* .
451. **Vane J. & Botting R. (1987).** Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, **1(2)**: 89-96.
452. **Verma N., Amresh G., Sahu P. K., Rao Ch V. & Singh A. P. (2012).** Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate fraction of *Rhododendron arboreum* Smith flowers in streptozotocin induced diabetic rats and its role in regulating carbohydrate metabolism. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 696-701.
453. **Verpoorte R. (2000).** Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. *J. Pharmacol.* **52**: 253-262.
454. **Viljoen A. M., Denirci B., Baser K. H. C., Potgieter C. J. & Edwards T. J. (2006a).** Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany.* **72**: 99-104.
455. **Viljoen A.M., Moolla A., van Vuuren S.F., van Zyl K.H., Baser K.H.C., Demirci B., Ozek T. & Trinder-Smith T.H., (2006b).** The biological activity and essential oil composition of 17 *Agathosma* (Rutaceae) species. *J. Essent. Oil Res.*, **18**, 2-16.
456. **Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., Abd ElRazik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A. & Sendra E. (2011).** In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, **22**: 1715-1722.
457. **Viuda-Martos M., Navajas Y. R., Zapata E. S., Fernández-López J. & Pérez-Álvarez J. A. (2010).** Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.*, **25**: 13-19.
458. **Viuda-Martos, M., El Gendy, N. G. S., Sendra, E., Fernandez-Lopez, J., El-Razik, K. A. A., El-Sayed, A., & Perez-Alvarez, J. A. (2009).** Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 9063-9070.

459. **Vladimir-Knezevic S., Knezevic B., Kindl M., Vladic J., Lower-Nedza A. D. & Brantner A. H. (2014).** Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*, **19**: 767-782.

-W-

460. **Wan J., Wilcock A. & Coventry M. J. (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 152-158.
461. **Wang B. J., Lien Y. H. & Yu Z. R. (2004).** Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem.*, **86**: 237-243.
462. **Wang C. Y., Wang S. Y., Yin J. J., Parry J. & Yu L. L. (2007).** Enhancing Antioxidant, Antiproliferation, and Free Radical Scavenging Activities in Strawberries with Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 6527-6532.
463. **Wang H., Cao G., & Prior R. L. (1996).** The antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**: 701-705.
464. **Wannes W. A., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M. E. & Marzouk B. (2010).** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1362-1370
465. **Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T. & Thubthimthed S. (2005).** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. **76**: 233-236.
466. **Wei A. & Shibamoto T. (2010).** Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J. Agr. Food Chem.*, **58**: 7218-7225.
467. **Wentrup A., Oertel W. H. & Dodel R. (2008).** Once-daily transdermal rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2**: 245-254.
468. **Werz O. & Steinhilber D. (2005).** Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem. Pharmacol.* **70**: 327-333.
469. **Werz O. (2007).** Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med.*, **73(13)**: 1331-1357.
470. **Werz, O. & Steinhilber, D., (2006).** Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **112**, 701-718.
471. **Wichtl M. & Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques-Tradition, Pratique officinale, science et thérapeutique. *Ed. Tec et Doc* et EMI.
472. **Winblad B. B., Cummings J., Andreasen N., Grossberg G., Onofrj M., Sadowsky C., Zechner S., Nagel J. & Lane R. (2007).** A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease- rivastigmine patch versus capsule. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **22**: 456-467.

-Y-

473. **Yahaya Y. A., Don M. M. & Yahaya A. S. (2014).** The effect of culture conditions on the growth of *T. lactinea* and anti-inflammatory activities via *in vitro* inhibition of hyaluronidase and lipoxygenase enzyme activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **45**: 2054-2059
474. **Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H. & Raneva V.G., (1999).** Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.*, **64**: 59-66.
475. **Yayi E., Gbenou J. D., Ahoussi L. A., Moudachirou M. & Chalchat J. C. (2004).** *Ocimum gratissimum* L., Siège de variation chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie*, **7**: 1013-1018.

-Z-

476. **Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y. & Shan L. (2006).** Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54(19)**: 7277-7286.

477. **Zhao R. J., Koo B. S., Kim G. W., Jang E. Y., Lee J. R., Kim M. R., Kim S. C., Kwon Y. K., Kim K. J., Huh T. L., Kim D. H., Shim I. & Yang C. H. (2005).** The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 2323-2326.
478. **Zheljazkov V.D., Craker L.E. & Xing B. (2005).** Effects of Cd, Pb and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint and basil. *Environmental and experimental botany.*
479. **Zhou J. Y., Tang F. D., Mao G. G. & Bian R. L. (2004).** Effect of α -pinene on nuclear translocation of NF- κ B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin.* **25**: 480–484.
480. **Zhu L. F., Li Y. H., Li B. L., Ju B. Y. & Zhang W.L. (1995).** Aromatic Plants and Essential Constituents (Supplements1). South China Institute of Botany. *Chinese Academy of Sciences, Hai, Feng. Publ. Co.*
481. **Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H. Dassouli A., Serhrouchni M. & Benjelloun W. (1997).** Phytotherapy of hypertension and diabetes in orientai Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, **58**: 45-54.
482. **Zou Y., Lu Y. & Wei, D. (2004).** Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *In vitro.* *J. Agric. Food Chem.* **52**: 5032–5039.
483. **Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Karraya A., Neffai M. & Ayadi M. (2011).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxydant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod. Process.* **89**: 257–265.
484. **Zu Y., Yu H., Liang L., Fu Y., Efferth T., Liu X. & Wu N. (2010).** Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, **15**: 3200–3210.

Publication

RESEARCH ARTICLE

Ammoides pusilla (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities

C. Tefiani^{a,b}, A. Riazi^b, F. Youcefi^{a,b}, S. Aazza^c, C. Gago^c, M.L. Faleiro^d, L.G. Pedro^e, J.G. Barroso^e, A.C. Figueiredo^e, C. Megias^f, I. Cortés-Giraldo^f, J. Vioque^f and M.G. Miguel^{c*}

^aDépartement des Sciences Agronomique et des Forêts, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Tlemcen, Algérie; ^bLaboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie; ^cUniversidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química e Farmácia, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro Biotecnologia Vegetal, Faro, Portugal; ^dUniversidade do Algarve, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Biologia e Bioengenharia, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, CBME, Faro, Portugal; ^eUniversidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Campo Grande, Lisboa, Portugal; ^fInstituto de la Grasa (C.S.I.C.), Sevilla, Spain

(Received 22 April 2014; accepted 8 January 2015)

The chemical composition, and antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of the essential oils of *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae), collected in Algeria, were studied. Cumin alcohol (44%), *p*-cymene (18%), limonene (14%), thymol (11%) and γ -terpinene (7%) predominated in *A. pusilla* essential oil, whereas carvacrol (71%) was dominant in *T. munbyanus* essential oil. The antibacterial activity of *A. pusilla* and *T. munbyanus* essential oils was studied by the agar diffusion method against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The tested bacteria were more susceptible to *T. munbyanus* essential oil. *Ammoides pusilla* essential oil was the most effective for scavenging the free radicals. *Ammoides pusilla* essential oil also had the best reducing power as well as the highest lipid peroxidation inhibition. *Thymus munbyanus* essential oil showed the best anti-proliferative activity of human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).

Keywords: *Ammoides pusilla*; *Thymus munbyanus*; essential oils; biological activities

1. Introduction

Essential oils (EOs), due to their antimicrobial and antioxidant properties, may be used as food preservatives, as bio-preservatives in the cosmetics industry and against several human pathogens and phytopathogenic fungi, among other applications (1).

Ajowan, *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. [= *Ammoides leiocarpa* Lange, *Ammoides pusilla* var. *trachysperma* (Boiss.) Breistr., *Ammoides verticillata* Briq., *Ammoides verticillata* f. *elata* Maire & Weiller, *Ammoides verticillata* var. *pusilla* (Pamp.) Breistr., *Ammoides verticillata* var. *trachysperma* (Boiss.) Maire, *Bunium ammoides* (L.) Ces., *Carum ammoides* (L.) Benth. & Hook. f. ex Arcang., *Petroselinum ammoides* (L.) Rchb. f., *Ptychotis ammoides* (L.) W.D.J. Koch, *Ptychotis ammoides* var. *pusilla* Pamp., *Ptychotis aspera* Pomel, *Ptychotis morisiana* Bég., *Ptychotis trachysperma* Boiss., *Seseli ammoides* L., *Seseli corsicum* Besser, *Seseli pusillum* Brot., *Seseli verticillatum* Desf. -Illegitimate-], is an annual aromatic herbaceous species belonging to the Apiaceae family. It has feather-like leaves and inflorescence compound umbel

with sixteen umbellets, each containing up to sixteen white flowers. The fruits are small, grayish brown and ovoid. It grows up in arid and semi-arid regions in soils containing high levels of salts. It is a native of Egypt and is cultivated in Iraq, Iran, Afghanistan, Pakistan and India. Ajowan can also be found widely in Mediterranean Europe and North Africa (2–4).

Several properties have been attributed to this plant such as antimicrobial and antioxidant; antiparasitic; fumigant and insecticidal; antihypertensive; antidiabetic; gastric antisecretory; relaxant and anticonvulsant; analgesic; and antitussive (3, 4).

The *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet, Lamiaceae family [= *Origanum ciliatum* (Desf.) Kuntze, *Thymbra ciliata* Desf., *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. -Illegitimate-, *Thymus leucostegius* Briq., *Thymus munbyanus* var. *mairei* Sennen, *Thymus munbyanus* var. *maurusius* Maire & Sennen] is an endemic species of North Africa (5). Scientific information about the potentialities of this species as antimicrobial, antioxidant, anti-proliferative or other properties is much scarcer than that known for *A. pusilla*,

*Corresponding author. Email: mgmiguel@ualg.pt

although antimicrobial and antioxidant activities of *T. munbyanus* EOs have been reported (6, 7).

In the course of our ongoing work on the biological activities of aromatic and medicinal plants from Algeria, the main goal of the present work was to evaluate the antimicrobial, antioxidant and anti-proliferative activities of *A. pusilla* and *T. munbyanus* EOs. Leukemia is a hematological disease, which is often lethal. Remission with chemotherapy is possible in many patients; nevertheless, relapse is common and it has a poor long-term survival. Some EOs and their constituents have revealed the capacity to inhibit the proliferation of some types of tumor cells (8, 9). Here we report for the first time the antiproliferative activity of *A. pusilla* and *T. munbyanus* EOs.

2. Experimental

2.1 Plant material

Fresh aerial parts of *T. munbyanus* and *A. pusilla* samples were collected in June 2010 during the flowering stage. *Thymus munbyanus* was collected in the region of Hennaia and *A. pusilla* was collected in the region of Zeddigua, province of Tlemcen, 500 km west of Algiers. Plants were identified by Prof. Bouazza from Tlemcen University. Certified voucher specimens have been deposited in the Herbarium of École Nationale Supérieure 'd'Agronomie, Algiers.

2.2 Isolation of essential oils

The EOs were obtained from the dried aerial parts of plants by hydrodistillation, for 3 hours, using a Clevenger-type apparatus (10). Extracted EOs were stored in darkness between 4° and 6°C.

2.3 Chemical analysis of the essential oils

Gas chromatography (GC) and GC–mass spectrometry (GC–MS) analyses were performed as detailed in (13). The percentage composition of the EOs was computed by the normalization method from the GC peak areas, calculated as mean values of two injections from each EO, using literature response factors, as previously reported (11). The identity of the components was assigned by comparison of their retention indices, relative to C₉–C₁₆ *n*-alkane indices and GC–MS spectra from a home-made library, constructed based on the analyses of reference oils, laboratory-synthesized components and commercially available standards.

2.4 Antibacterial activity

The EOs' antibacterial activity was determined by agar diffusion, as previously described (12). The EOs were

tested against *Escherichia coli* DSM 1077; *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium 14028, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 5) and *Listeria monocytogenes* Scott A, EGD, T8 and A9. The bacterial cells of *E. coli*, *S. Thyphimurium* and *L. monocytogenes* were maintained at –80°C in tryptic soy broth with 25% (v/v) of the cryoprotector, glycerol. The cells of MRSA 5 were maintained also at –80°C but in brain heart infusion (BHI) supplemented with 25% (v/v) glycerol. Prior to the assay, bacteria cells were recovered on tryptic soy agar (TSA) plates, except for the MRSA strain, which was grown on BHI agar for 24 hours at 37°C. Exponential phase cultures were obtained by culturing in the appropriate broth medium. From each culture, 100 µL were used to inoculate the agar plates. To the inoculated plates, sterile filter paper containing EO (3 µL), sterile phosphate buffer (negative control) and 30 µg of the antibiotic chloramphenicol (positive control) were added. The assays were performed in triplicate. Data were analyzed for statistical significance by two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test analysis. SPSS 21.0 software was used for the statistical calculations.

2.5 Antioxidant activities

2.5.1 DPPH free radical scavenging activity

Free radical-scavenging activities of EOs were measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as described by Dandlen et al. (13). All determinations were performed in triplicate. The percentage inhibition of the DPPH radical by the samples was calculated according to the formula: % Inhibition = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$, where A_0 is the absorption of the blank sample ($t = 0$ minutes) and A_1 is the absorption of the tested oil or substance solution ($t = 60$ minutes). Tests were carried out in triplicate. The sample concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was obtained by plotting the inhibition percentage against EO concentrations.

2.5.2 ABTS free radical-scavenging activity

The determination of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical scavenging was carried out as reported by Aazza et al. (14). Tests were carried out in triplicate. The sample concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was obtained by plotting the inhibition percentage against EO concentrations.

2.5.3 Reducing power

The reductive potential of the oils was determined according to that reported previously (15). The assay was carried out in triplicate.

2.5.4 TBARS

The ability of the EOs to inhibit malondialdehyde formation, and therefore lipid peroxidation, was determined by using a modified thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay as previously described (15). The antioxidant capacity measurements were carried out in triplicate.

2.5.5 Liposomes

Liposomes were obtained from 0.4 g lecithin in 80 mL chloroform. This solution was dried and after submitted to nitrogen flux for 30 seconds. Liposomes were then submitted to a vacuum for at least 2 hours until complete dryness. Eighty milliliters of phosphate saline buffer 0.01 M, pH 7.0 were added and kept at 4°C until the assay. For the experiment, a 250- μ L suspension of liposomes was incubated with 25 μ L of the sample, 400 μ L water, 1.5 mL acetic acid 20%, 1.5 mL thiobarbituric acid (TBA) 0.8 M dissolved in a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) 1.1%. This mixture was incubated for 1 hour at 95°C. After cooling at room temperature, the assay was performed as the TBARS method.

2.5.6 ORAC

The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method used, with fluorescein (FL) as the fluorescent probe, was that described by Ou et al. (16) but adapted for lipophilic samples such as EOs and reported by Huang et al. (17), in which these are previously included in 7% methylated β -cyclodextrin (RMCD) solvent 50% acetone–water mixture (v/v). ORAC values are calculated according to that previously reported by some authors (18). Final ORAC values are expressed as μ mol Trolox/g weight. The antioxidant capacity measurements were carried out in triplicate.

2.6 Cell culture

THP-1 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For routine maintenance, THP-1 cells were subcultured every two or three days by resuspension in fresh medium.

2.7 Anti-proliferative activity

Eos' growth-inhibitory effect was measured using the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, adapted from Mosmann (19).

THP-1 cells were seeded in a 96-well plate at $5. \times 10^3$ cells/well and exposed to different concentrations of EOs (1–50 μ g/mL) for one, three and seven days at 37°C in 5% CO₂/95% air in complete medium containing serum. All test substances were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The solvent concentration in the incubation medium never exceeded 0.5%. Control cultures received the equivalent concentration of DMSO. After treatment, cells were incubated for 1 hour in the usual culture conditions after addition of the same volume of medium containing MTT (2 mg/mL). After this incubation, 150 μ L HCl (0.1 M) in isopropanol were added to dissolve the blue formazan crystals formed by the reduction of MTT. Absorbance at 570 nm using a background reference wavelength of 630 nm was measured using a dual-wavelength plate reader. The mean absorbance values for the negative control (DMSO-treated cells) was standardized as 100% absorbance (i.e. no growth inhibition) and the results were displayed as absorbance (% of control) vs. EO concentration.

2.8 Statistical analysis

All measurements were performed in triplicate, and Student's *t*-test was used to determine the difference between mean values ($p < 0.05$) in the assays of antioxidant activity.

3. Results and discussion

3.1 Essential oils

The hydrodistillation of the aerial parts of *A. pusilla* and *T. munbyanus* yielded, respectively, 2.9% and 3% (v/w) of pale yellowish EOs.

Twenty-three and thirty-three compounds were identified respectively in *A. pusilla* and *T. munbyanus* EOs (Figure 1). Identified EO components are listed in Table 1 in the elution order on the DB-1 column.

Oxygen-containing monoterpenes predominated in *A. pusilla* (57%) and *T. munbyanus* (75%) EOs, though they were more pronounced in the latter (Table 1). Cumin alcohol (44%), *p*-cymene (18%), limonene (14%) thymol (11%) and γ -terpinene (7%) predominated in *A. pusilla* oil, whereas in *T. munbyanus* EO, carvacrol was dominant, representing 71% of the total EO.

Thymol has been previously reported as the main component in *A. pusilla* fruit oils (20–23), although the extraction methods and conditions (24), as well as the harvesting location, revealed to have a great influence on the Eos' final composition (27, 28). In those studies, γ -terpinene, *p*-cymene (25), carvacrol (26) and carvone (25) have been reported as the main EO components. When the aerial parts were extracted, thymol,

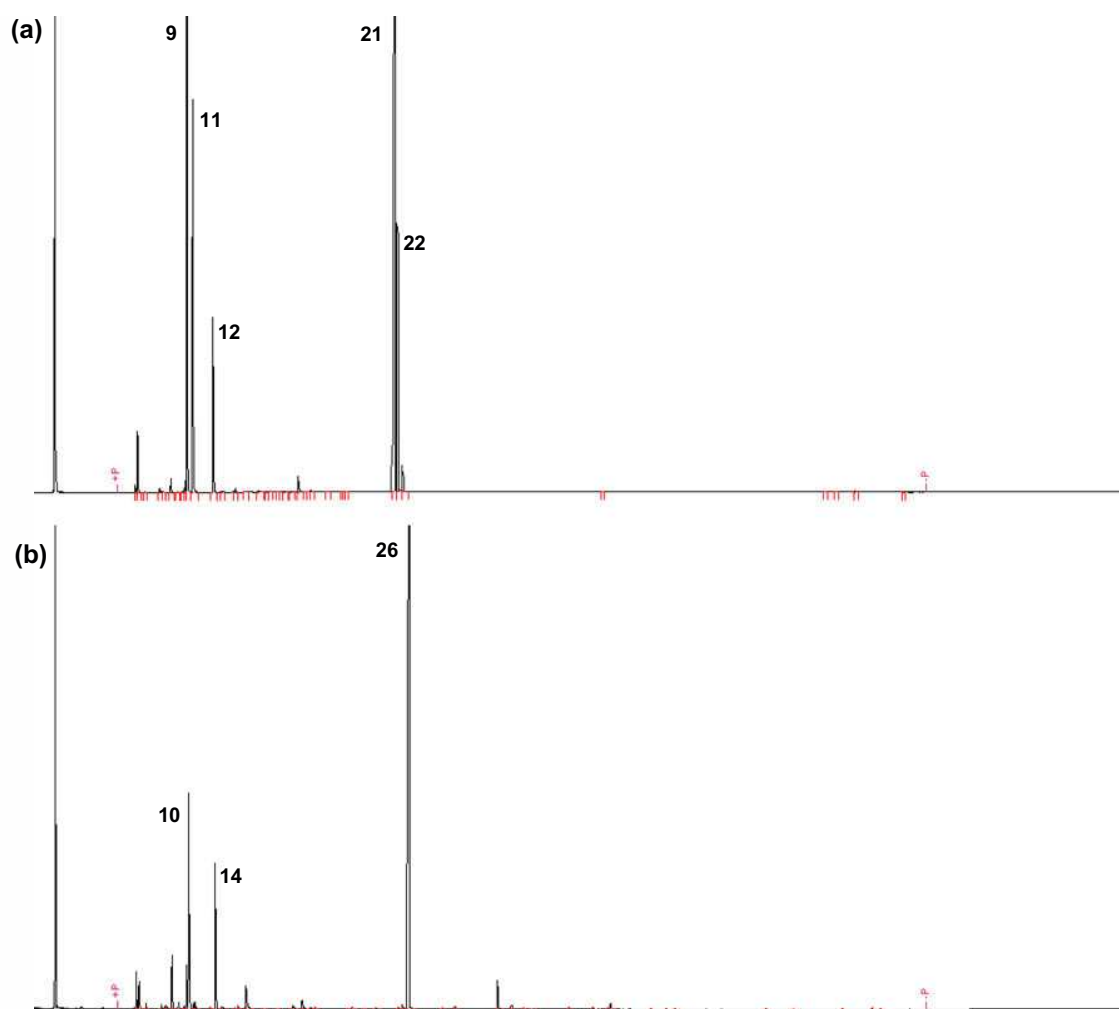


Figure 1. Gas chromatography profile of the essential oil isolated from (a) *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. and (b) *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet. (a) 9: *p*-cymene, 11: limonene, 12: γ -terpinene, 21: cumin alcohol, 22: thymol. (b) 10: *p*-cymene, 14: γ -terpinene, 26: carvacrol.

γ -terpinene, *p*-cymene and isothymol have been reported as the main components of the previously studied EOs (27). Such variability appears to be due primarily to the geographical origin and to the developmental stage of the plant (2, 27–29). In the same country, Algeria, but in different regions (Setif and Oran), two EOs types were reported. The EO isolated from plants collected in Setif was predominantly constituted by thymol and γ -terpinene (28), while in the plants collected at Oran, isothymol prevailed in their EO (30). In the present study, a different cumin alcohol-rich (44%) EO was found, obtained from the aerial parts of *A. pusilla* collected at Tlemcen (north-west of Algeria).

The predominance of carvacrol in *T. munbyanus* EO was in accordance with previous reports (7, 31).

3.2 Antimicrobial activity

Thymus munbyanus EO showed higher antimicrobial activity than *A. pusilla* EO for all bacteria tested (Table 2). Strains MRSA 5, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* T8 showed the highest resistance ($p < 0.05$) to the tested EOs. The most susceptible strains were the clinical isolates, *L. monocytogenes* Scott A and EGD ($p < 0.05$). Both EOs showed lower inhibitory activity ($p < 0.05$) than chloramphenicol. *Thymus munbyanus* EO seems to have potential to combat the food-borne pathogen *L. monocytogenes*.

The higher antibacterial activity of *T. munbyanus* EO may be explained by the higher carvacrol content (71%). This compound disrupts the cellular membrane with the consequent alterations in the membrane properties and functions (30, 30, 32, 33). The high

Table 1. Percentage composition of the essential oils isolated from the aerial parts of *Ammoides pusilla* and *Thymus munbyanus* populations collected in Tlemcen, Algeria.

Components	RI	RI ⁴⁷	<i>Ammoides pusilla</i>	<i>Thymus munbyanus</i>
α -Thujene	924	929	0.2	1.1
α -Pinene	930	937	1.9	0.9
Camphene	938	938		0.2
Sabinene	958	961	t	
1-Octen-3-ol	961	961		0.2
β -Pinene	963	963	0.2	0.3
β -Myrcene	975	975	0.5	2.0
α -Phellandrene	995	1003	t	0.3
δ -3-Carene	1000	1004	t	0.1
α -Terpinene	1002	1005	0.4	1.6
<i>p</i> -Cymene	1003	1008	18.1	8.3
β -Phellandrene	1005	1009	t	0.3
Limonene	1009	1016	14.2	0.2
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1027	1026		0.1
γ -Terpinene	1035	1035	6.8	5.9
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1037	1047	t	0.2
Terpinolene	1064	1064	0.2	0.2
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1066	1081		t
Linalool	1074	1082	0.1	1.7
<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	1099	1095	0.2	
Borneol	1134	1139		0.3
Terpinen-4-ol	1148	1153	0.9	0.7
α -Terpineol	1159	1157	t	0.1
Cumin aldehyde	1200	1200	t	
Neral	1210			0.2
Carvone	1210	1206	t	
Geranial	1240	1249		0.2
Cumin alcohol	1260	1270	44.3	0.2
Thymol	1275	1278	10.8	0.2
Carvacrol	1286	1299	1.1	71.4
Eugenol	1327	1325		0.1
Carvacryl acetate	1348	1348		0.2
(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1414	1415		1.8
α -Humulene	1447	1439		0.2
β -Bisabolene	1500	1511		0.1
(<i>E</i>)- α -Bisabolene	1536			0.1
Caryophyllene oxide	1561	1583		0.5
% of identification			99.9	99.9
Grouped components				
Monoterpene hydrocarbons			42.5	21.5
Oxygen-containing monoterpenes			57.4	75.4
Sesquiterpene hydrocarbons				2.2
Oxygen-containing sesquiterpenes				0.5
Others				0.3

Note: RI, retention index calculated relative to C₉–C₁₆ *n*-alkanes on the DB-1 column; RI⁴⁷, reported literature retention indices on DB-1 or similar phase column (100% dimethylpolysiloxane) not from the authors lab. t, trace (< 0.05%). The percentage composition of the oils was computed by the normalization method from the GC peak areas, calculated as mean values of two injections from each oil, using the response factors reported in literature as detailed in (11).

susceptibility of *L. monocytogenes* strains to carvacrol-rich EOs, such as *T. capitata* oil, has been previously reported (34). In contrast, *A. pusilla* EO was rich in cumin alcohol (44%) with *p*-cymene and limonene in lower amounts. The mode of action of *p*-cymene and limonene is known, acting mainly by disturbing the cellular membrane, including the membrane potential, altering the fatty acid composition and modifying the cell morphology (35–38). The low content of these

compounds may have contributed to the absence of an efficient antibacterial activity of *A. pusilla* EO.

3.3 Antioxidant activity

Both EOs possessed radical scavenging activity, although *A. pusilla* EO was more effective in scavenging DPPH, ABTS and peroxy radicals (ORAC) (Table 3). The capacity for preventing lipid

Table 2. Inhibitory activity of bacteria growth of *Ammoides pusilla* and *Thymus munbyanus* essential oils.

Bacteria	Inhibition zone (mm)*		
	<i>A. pusilla</i>	<i>T. munbyanus</i>	Chloramphenicol
<i>Escherichia coli</i> DSM 1077	12.36 ± 0.76 ^a	14.67 ± 0.29 ^b	27.00 ± 1.50 ^{cd}
<i>Salmonella enterica</i> serovar Thyphimurium ATCC 14028	9.67 ± 2.36 ^a	15.67 ± 1.04 ^b	28.83 ± 2.31 ^{cd}
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	13.00 ± 0.50 ^a	22.50 ± 1.80 ^{bc}	29.67 ± 0.29 ^{cd}
<i>L. monocytogenes</i> EGD	13.67 ± 0.76 ^a	17.00 ± 3.91 ^{bc}	32.83 ± 1.04 ^{cd}
<i>L. monocytogenes</i> A9	12.33 ± 0.76 ^a	16.00 ± 5.22 ^b	30.50 ± 1.00 ^{cd}
<i>L. monocytogenes</i> T8	11.67 ± 3.55 ^a	13.83 ± 0.76 ^{ab}	30.00 ± 2.12 ^{cd}
MRSA 5	11.67 ± 1.53 ^a	13.83 ± 0.29 ^{ab}	21.33 ± 2.52 ^{bc}

Note: *Data are the mean of three independent experiments ± standard deviation. Data in the same column with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) as determined by analysis of variance (ANOVA) with the SPSS 21.0 program (Inc. Chicago IL) using the Tukey's post hoc test.

peroxidation, measured with TBARS and liposome methods, was also better for *A. pusilla* EO. These different activities were statistically significant (Student's *t*-test, $p < 0.05$) in all tests except for Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), in which the activity, although better for *A. pusilla* EO, was not significantly different from *T. munbyanus* activity.

The main EO components, cuminal alcohol in *A. pusilla* and carvacrol in *T. munbyanus*, have been considered weak and moderate antioxidants, respectively (39, 40). The higher activity observed in *A. pusilla* EO, in which cuminal alcohol prevailed, may also be attributed to the relative high percentage of thymol (11%). This phenolic terpene has been considered a better antioxidant than its isomer, carvacrol, either by scavenging free radicals or preventing lipid peroxidation (41–43). Also, cuminal alcohol and thymol may act synergistically contributing to the better activity of *A. pusilla* EO when compared with carvacrol, the main component in *T. munbyanus* EO. The reducing power was also higher in *A. pusilla* EO (Figure 2). Such a result was expected, as a single electron transfer-based reaction is the mechanism involved in this assay, as in those methods of scavenging TEAC and DPPH free radicals in which this EO was also better antioxidant than *T. munbyanus* EO. Figure 2 shows that the reducing power of both oils was concentration dependent.

Free radicals are able to attack the highly unsaturated fatty acids of membrane system inducing lipid peroxidation. An overproduction of TBARS, the end product of the lipid peroxidation process, occurs after

an increase of free radicals. The inhibitory effects of samples on lipid peroxidation in liposomes is generally estimated after the incubation of these liposomes with an Fe³⁺/ascorbate system and then the determination of the amount of TBARS accumulated after an interval of time (44, 45). In the present study, this system of free radical production was replaced by heating liposomes at 100°C for a time. In these conditions, both EOs presented the capability for inhibiting the formation of TBARS, though more significantly by *A. pusilla* EO (Table 3).

3.4 Anti-proliferative activity

The effect of *A. pusilla* and *T. munbyanus* EOs on THP-1 growth using MTT assay is shown in Figures 3A and B, respectively. Cells were treated with the EOs at various concentrations for one, four and seven days. As shown in Figures 3A and B, both EOs inhibited the growth of THP-1 cells, though more pronounced with *T. munbyanus* EO (Figure 2B). In both cases, the anti-proliferative activity was more prominent after four and seven days than after 24 hours of incubation. The growth percentages of THP-1 cells compared with the control at the lowest concentration of *T. munbyanus* oil (10 µg/mL) were 60% and 40% after four and seven days, respectively (Figure 3B). *Ammoides pusilla* EO at this concentration did not inhibit THP-1 grow, but only at higher concentrations (>100 µg/mL). At this concentration and after seven days of incubation, the proliferation percentage of

Table 3. Antioxidant activity of *Ammoides pusilla* and *Thymus munbyanus* essential oils.

Plant	DPPH,	TEAC,	ORAC,	TBARS,	Liposome,
	IC ₅₀ µg/mL ± STE	IC ₅₀ µg/mL ± STE	mmol Trolox/g ± STE	IC ₅₀ µg/mL ± STE	IC ₅₀ µg/mL ± STE
<i>T. munbyanus</i>	444.7 ± 13.9	1.73 ± 0.21	1.19 ± 0.04	110.1 ± 4.2	33.6 ± 9.4
<i>A. pusilla</i>	38.7 ± 7.3	1.21 ± 0.01	3.00 ± 0.13	29.8 ± 4.2	4.3 ± 0.3

Note: DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; STE, standard error; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; TBARS, thiobarbituric acid reactive species.

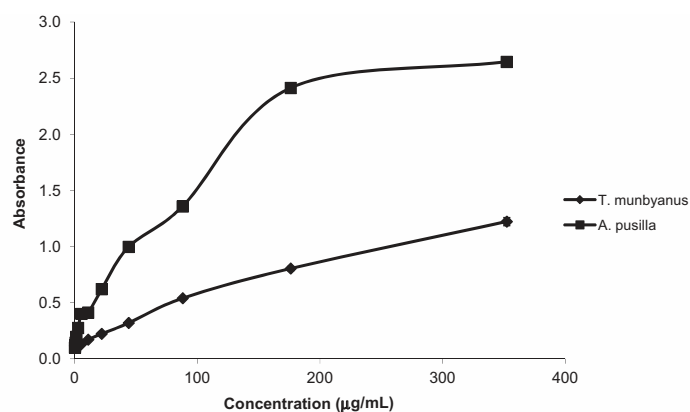


Figure 2. Reducing power of *Ammoides pusilla* and *Thymus munbyanus* essential oils.

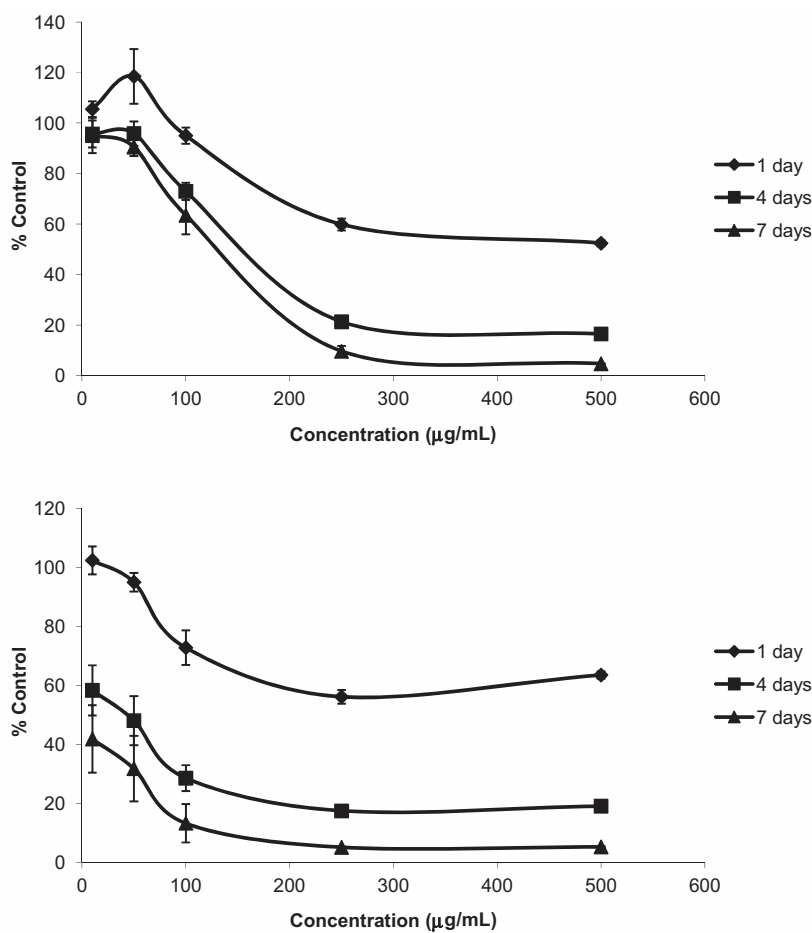


Figure 3. Antiproliferative activity of (A) *Ammoides pusilla* and (B) *Thymus munbyanus* essential oils on THP-1 cell line. The mean absorbance values for the negative control (dimethyl sulfoxide-treated cells) was standardized as 100% absorbance (i.e. no growth inhibition) and results were displayed as absorbance (% of control) vs. essential oil concentration.

THP-1 cells in the presence of *T. munbyanus* EO was 13%, whereas in the presence of *A. pusilla* EO the proliferation percentage was 64%. These results reveal a

remarkable anti-proliferative activity of *T. munbyanus* EO when compared with *A. pusilla* EO. Such high activity may be related to the high levels of carvacrol

in *T. munbyanus* EO. Cumin alcohol, the main constituent of *A. pusilla* oil, along with thymol may be less effective in inhibiting THP-1 cell growth.

The antiproliferative activities of EOs studied in this work were similar to or even higher than that reported by others for oregano EO (46), with thymol, carvacrol and *trans*-sabinene hydrate the main components. Cell viability was 70% with 70 µg/mL of oregano oil, after two days of exposure. In the present study, after four days of exposure of THP-1 cells to 10 µg/mL of *T. munbyanus* EO, the cell viability compared with the control was 60%, and after seven days, the percentage decreased to 40%. For *A. pusilla* EO, higher concentrations were needed to inhibit the growth of THP-1 cells (Figures 3A and B). This loss of cell viability was more evident as the incubation time of cells with EO increased.

4. Conclusion

This study evidenced the richness in cumin alcohol of the *A. pusilla* EO from Algeria. In contrast, *T. munbyanus* EO was predominantly constituted by carvacrol. The capacity for scavenging free radicals or preventing lipid peroxidation was significantly more pronounced in *A. pusilla* EO. In contrast, the antiproliferative activity on THP-1 cells was more evident for *T. munbyanus* EO.

Acknowledgments

The authors thank Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) the financial support under the project FCT PEst-OE/EQB/LA0023/2011.

References

1. G. Lang and G. Buchbauer, *A review on recent researches (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review*. Flavour Fragr. J., **27**, 13–39 (2012).
2. C. Bekhechi, J.B. Boti, F.A. Bekkara, D.E. Abdelouahid, J. Casanova and F. Tomi, *Isothymol in Ajowan essential oil*. Nat. Prod. Commun., **5**, 1107–1110 (2010).
3. E.M. El Ouariachi, P. Tomi, A. Bouyanzer, B. Hammouti, J.-M. Desjobert, J. Costa and J. Paolini, *Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of Ptychotis verticillata from Morocco*. Food Chem. Toxicol., **49**, 533–536 (2011).
4. R. Bairwa, R.S.D. Sodha and B.S. Rajawat, *Trachyspermum ammi*. Pharmacogn. Rev., **6**, 56–60 (2012).
5. A. Belouad, *Plantes Médicinales d'Algérie*, pp. 206–207, Office des Publications Universitaires Algiers (1998).
6. M. Hazzit, A. Baahouamer, M.L. Faleiro and M.G. Miguel, *Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities*. J. Agric. Food Chem., **54**, 6314–6321 (2006).
7. A. Khadir, M. Bendahou, F. Benbelaid, C. Bellahcene, D.-J. Abdelouahid, A. Museili, J. Paolini, J. Desjobert and J. Costa, *Evaluation of the MRSA sensitivity to essential oils obtained from four Algerian medicinal plants*. J. Appl. Pharm. Sci., **3**, 18–24 (2013).
8. Y. Gu, Z. Ting, X. Qiu, X. Zhang, X. Gan, Y. Fang, X. Xu and R. Xu, *Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors*. Toxicology, **268**, 19–24 (2010).
9. M.Y. Dar, W.A. Shah, M.A. Rather, Y. Qurishi, A. Hamid and M.A. Qurishi, *Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of Cymbopogon jawarancusa (Kashmir)*. Food Chem., **129**, 1606–1611 (2011).
10. Council of Europe (COE) European Directorate for the Quality of Medicines. *European Pharmacopoeia*, 6th edn. COE, Strasbourg (2007).
11. A.C. Figueiredo, C. Garcia, M. Sim-Sim, C. Sérgio, L.G. Pedro and J.G. Barroso, *Volatiles from Plicanthus hirtellus (F. Weber) R.M. Schust. and Radula boryana (F. Weber) Nees (Hepaticae) grown in São Tomé e Príncipe Archipelago*. Flavour Fragr. J., **25**, 219–222 (2010).
12. M. Hazzit, A. Baaliouamer, A.R. Veríssimo, M.L. Faleiro and M.G. Miguel, *Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils*. Food Chem., **116**, 714–721 (2009).
13. S.A. Dandlen, A.S. Lima, M.D. Mendes, M.G. Miguel, M.L. Faleiro, M.J. Sousa, L.G. Pedro, J.G. Barroso and A.C. Figueiredo, *Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils*. Flavour Fragr. J., **25**, 150–155 (2010).
14. S. Aazza, B. Lyoussi and M.G. Miguel, *Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols*. J. Med. Plants Res., **5**, 6688–6696 (2011).
15. S. Aazza, B. Lyoussi and M.G. Miguel, *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds*. Molecules, **16**, 7672–7690 (2011).
16. B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. J. Agric. Food Chem., **49**, 4619–4626 (2001).
17. D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan and E.K. Deemer, *Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer*. J. Agric. Food Chem., **50**, 1815–1821 (2002).
18. G.H. Cao and R.L. Prior, *Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Oxidants and antioxidants*. Method. Enzymol., **299**, 50–62 (1999).
19. T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods, **65**, 55–63 (1983).
20. A. Mohagheghzadeh, P. Faridi and Y. Ghasemi, *Carum copticum Benth. & Hook., essential oil chemotypes*. Food Chem., **100**, 1217–1219 (2007).
21. B.Z. Sahaf, S. Moharrampour and M.H. Meshkatsadat, *Chemical constituents and fumigant toxicity of essential oil from Carum copticum against two stored product beetles*. Insect Sci., **14**, 213–218 (2007).

22. S. Paul, R.C. Dubey, D.K. Maheswari and S.C. Kang, *Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogen*. Food Control, **22**, 725–731 (2011).
23. M. Moazeni, M.J. Saharkhiz and A.A. Hosseini, *In vitro lethal effect of ajowan (Trachyspermum ammi L.) essential oil on hydatid cyst protoscolices*. Vet. Parasitol., **187**, 203–208 (2012).
24. M. Khajeh, Y. Yamini, F. Sefidkon and N. Bahramifar, *Comparison of essential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods*. Food Chem., **86**, 587–591 (2004).
25. S. Choudhury, R. Ahmed, P.B. Kanjilal and P.A. Leclercq, *Composition of the seed oil of Trachyspermum ammi (L.) Sprague from Northeast India*. J. Essent. Oil Res., **10**, 588–590 (1998).
26. M. Srivastava, A. Saxena and P. Baby, *GC–MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of Carum copticum Benth & Hook*. Acta Aliment., **28**, 291–295 (1999).
27. N. Kambouche and D. El-Abed, *Composition of the volatile oil from the aerial parts of Trachyspermum ammi (L.) Sprague from Oran (Algeria)*. J. Essent. Oil Res., **15**, 39–40 (2003).
28. H. Laouer, M.M. Zerroug, F. Sahli, A.N. Chaker, G. Valentini, G. Ferretti, M. Grande and J. Anaya, *Composition and antimicrobial activity of Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. essential oil*. J. Essent. Oil Res., **15**, 135–138 (2003).
29. I. Rasooli, M. Hadi Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh and M. Bagher Rezaei, *Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L. essential oils*. Int. J. Food Microbiol., **122**, 135–139 (2008).
30. J.P. De Sousa, R.A. Torres, G.A. Azeredo, R.C.B.Q. Figueiredo, M.A.S. Vasconcelos and E.L. de Souza, *Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of Pseudomonas fluorescens in a vegetable-based broth*. Int. J. Food Microbiol., **158**, 9–13 (2012).
31. A.C. Figueiredo, J.G. Barroso and L.G. Pedro, *Volatiles from Thymbra and Thymus species of the western Mediterranean basin, Portugal and Macaronesia*. Nat. Prod. Commun., **5**, 1465–1476 (2010).
32. A. Ultee, E.P.W. Kets and E.J. Smid, *Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 4606–4610 (1999).
33. A. La Stora, D. Ercolini, F. Marinello, R. Di Pasqua, F. Villani and G. Mauriello, *Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells*. Res. Microbiol., **162**, 164–172 (2011).
34. L. Faleiro, G. Miguel, S. Gomes, L. Costa, F. Venâncio, A. Teixeira, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso and L.G. Pedro, *Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Thymbra capitata L. (Cav.) and Origanum vulgare L.* J. Agric. Food Chem., **53**, 8162–8168 (2005).
35. A. Ultee, M.H.J. Bennik and R. Moezelaar, *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 1561–1568 (2002).
36. R. Di Pasqua, N. Hoskins, G. Betts and G. Mauriello, *Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media*. J. Agric. Food Chem., **54**, 2745–2749 (2006).
37. R. Di Pasqua, G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini and G. Mauriello, *Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils*. J. Agric. Food Chem., **55**, 4863–4870 (2007).
38. S.A. Burt, R. van der Zee, A.P. Koets, A.M. De Graaff, F. van Knapen, W. Gaastra, H.P. Haagsman and E.J.A. Veldhuizen, *Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibit synthesis of flagellin in Escherichia coli O157:H7*. Appl. Environ. Microbiol., **73**, 4484–4490 (2007).
39. P.L. Teissedre and A.L. Waterhouse, *Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties*. J. Agric. Food Chem., **48**, 3801–3805 (2000).
40. S.-J. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto and K.-G. Lee, *Identification of volatile compounds in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties*. Food Chem., **91**, 131–137 (2005).
41. N.V. Yanishlieva, E.M. Marinova, M.H. Gordon and V.G. Raneva, *Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems*. Food Chem., **64**, 59–66 (1999).
42. M. Öztürk, *Anticholinesterase and antioxidant activities of savoury (Satureja thymbra L.) with identified major terpenes of the essential oil*. Food Chem., **134**, 48–54 (2012).
43. M. Ramos, A. Jiménez, M. Peltzer and M.C. Garrigós, *Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging*. J. Food Eng., **109**, 513–519 (2012).
44. P.D. Du, Y.Y. Tu and G.C. Yen, *Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (Chrysanthemum morifolium Ramat)*. LWT-Food Sci. Technol., **32**, 269–277 (1999).
45. T. Şerbetçi, N. Özsoy, B. Demirci, A. Can, Ş. Kültür and K.H. can Başer, *Chemical composition of the essential oil and antioxidant activity of methanolic extracts from fruits and flowers of Hypericum lydium Boiss*. Ind. Crops Prod., **36**, 599–606 (2012).
46. A. Ocaña-Fuentes, E. Arranz-Gutiérrez, F.J. Señorans and G. Reglero, *Supercritical fluid extraction of oregano (Origanum vulgare) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages*. Food Chem. Toxicol., **48**, 1568–1575 (2010).
47. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, Eds., *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, <http://webbook.nist.gov>.