



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la  
Terre et de l'Univers  
Département des Sciences Biologiques  
Laboratoire Caractérisation et Valorisation des Ressources Naturelles



# Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat  
Domaine S.N.V.  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie

INTITULE

**Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. et *Salvia verbenaca* L.**

Présentée par : RIGHI Nadjat

Soutenu le 29/06/2021 Devant le Jury :

<b>Président</b>	M. Boubellouta Tahar	MCA	Université de Bordj Bou Arréridj
<b>Directeur de thèse</b>	Mme. Boumerfeg Sabah	Professeur	Université de Bordj Bou Arréridj
<b>Co-directeur de thèse</b>	M. Baghiani Abderrahmane	Professeur	Université de Sétif-1
<b>Examineur</b>	Mme. Khettal Bachra	Professeur	Université de Béjaia
<b>Examineur</b>	M. Touati Noureddine	MCA	Université de Bordj Bou Arréridj
<b>Examineur</b>	Mme. Zerargui Fatima	MCA	Université de Sétif-1

Année Universitaire : 2020-2021



---

**Ce travail a été réalisé dans les laboratoires suivants :**

- Laboratoire de caractérisation et valorisation des ressources naturelles  
Université de Bordj bou Arreridj
- Laboratoire de biochimie appliquée Université de Sétif-1
- Laboratoire de LAQV-REQUIMTE Université d'Aviero - Portugal

**Dédicace**

**Je dédie ce travail à mes chers parents, mon mari**

**Et à mes chers frères et sœurs pour leurs soutiens et leurs encouragements**

# Remerciements

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

Je voudrais dans un premier temps remercier, Pr. Sabah BOUMERFEG et Pr. Abederrahmane BAGHIANI le directeur et le co-directeur de thèse pour le temps qu'ils ont consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche et surtout pour leurs judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir évaluer et juger ce travail : Pr. KHETTAL Bachra, Dr. BOUBELLOUTA Tahar, Dr. TOUATI Noureddine et Dr. ZERARGUI Fatima.

Mes remerciements vont également aux Pr. Manuel A Coimbra et Pr. Elizabete Coelho, Pedro A fernandes, Susana Cardoso de laboratoire de LAQV-REQUIMTE de l'université d'Aviero (portugal) pour l'analyse HPLC/CG des échantillons, pour leur soutien, leur aide lors de mes recherches

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur contribution dans la réalisation de ce travail

Dr. BENBACHA Faycal, Chef du laboratoire d'anatomie pathologique, Bordj Bou Arreridj. Mr. Rebaai et Mme. Dhamna ingénieurs du laboratoire pédagogique de l'université de Bordj bou Arreridj. Mes plus vifs remerciement à Deghima Amirouche, BAALI Faiza et Ghedjmis Amina pour leurs soutien et leurs aide lors de ma recherche.

Un grand merci également à toute l'équipe pédagogique de l'université de Bordj bou Arreridj et les intervenants professionnels responsables de ma formation.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي، ملامح السمية، النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط المضاد للالتهاب للمستخلصات الهيدروميثانولية والزيوت الأساسية من نبتة الزعيترة (*Thymus algeriensis*) والمريمية (*Salvia verbenaca*) واللذان تستخدمان على نطاق واسع في الطب الشعبي الجزائري. كان مردود الاستخلاص الهيدروميثانولي متماثلاً لكلا النبتتين، بينما احتوى مستخلص الزعيترة على كميات أعلى من المركبات الفينولية ( $303.8 \pm 2.5$  ميكروغرام / مغ) وكان حمض الروزمارينيك المركب الرئيسي في كلا المستخلصين. مردود الزعيترة كان 1.7 % من الزيوت الأساسية التي تميزت بغناها بمركبات من نوع المونوترربينول وخاصة الفا تربينول واللينالول. أظهر مستخلص الزعيترة التأثير الأفضل ضد DPPH\* ( $0.3 \pm 7.4 = IC_{50}$  ميكروغرام/ مل)، ABTS\*+ ( $3.0 \pm 206.6 = IC_{50}$  ميكروغرام/ مل)، بيروكسيد الهيدروجين ( $3.5 \pm 192.2 = IC_{50}$  ميكروغرام / مل) وانحلال الدم التأكسدي ( $72.6 \pm 7.5$  ميكروغرام / مل) بالإضافة الى قدرته على تثبيط اكسدة البيتا - كاروتين بنسبة  $90.3 \pm 2.5$  % وقدرته الارجاعية الجيدة ( $0.0 \pm 5.3$  ملي مول معادل لـ  $FeSO_4$  / مغ) مع قوة اجمالية مضادة للأكسدة قدرت ب  $267.7 \pm 3.5$  ميكروغرام معادل لحمض الاسكوربيك / مغ، في حين أن مستخلص المريمية اظهر أفضل النتائج في اختبار استخلاص الحديد ( $7.9 \pm 189.3$  ميكروغرام / مل). الزيوت الأساسية من الزعيترة كانت اكثر فعالية ضد بيروكسيد الهيدروجين ( $20.4 \pm 500.4$  ميكروغرام/ مل) مع قدرة اجمالية مضادة للأكسدة قدرت  $2.6 \pm 313.9$  ميكروغرام معادل لحمض الاسكوربيك/ مغ، ومع ذلك، كانت أقل فعالية ضد DPPH\* ، و ABTS\*+ بالإضافة الى قدرتي استخلاص و ارجاع ضعيفتين مقارنة بمستخلصي الهيدروميثانول. لم تُلاحظ أي علامات سمية أثناء دراسة السمية الحادة على الفئران حيث قدرت الجرعة الوسطية المميتة بقيمة أعلى من 2000 مغ / كغ من وزن الجسم. أدى العلاج اليومي للفئران باستخدام مستخلصي الهيدروميثانول للزعيترة والمريمية إلى تحسين قدرة مضادات الأكسدة في البلازما وحالة الأكسدة في الكبد عن طريق رفع مستويات الكاتلاز والجلوتاثيون وتقليل بيروكسيد الدهون. علاوة على ذلك، فإن كل من المستخلصين بتركيز 400 ميكروغرام / مل، يثبطان انحلال الدم الناجم عن خفض التوتر بنسب  $75 \pm 4$  و  $69 \pm 5$  % على التوالي، وانحلال الدم الناجم عن ارتفاع الحرارة بنسب  $85 \pm 1$  و  $78 \pm 2$  % على التوالي. بالإضافة الى فاعليتهما في تثبيط وذمة الأذن التي يسببها الزيلين بنسبة 50% تقريباً لكل من المستخلصين. بينما كانت الزيوت الأساسية اكثر فاعلية في تثبيط وذمة الأذن بنسبة  $57.5 \pm 7.5$  % بنفس الجرعة (600 مغ / كغ من وزن الجسم). في الختام، يمكن استنتاج أن كل من الزعيترة والمريمية نبتتان امنيتين بجرعة محدودة بلغت 2000 مغ / كغ. احتوت المستخلصات والزيوت الأساسية المختبرة لنبتة الزعيترة والمريمية على خصائص قوية مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات سواء في المختبر أو في الجسم الحي بسبب مركباتها النشطة بيولوجياً، مما يجعلهما مرشحين ممتازين لتطوير عقاقير جديدة، أو كجزء من تركيبات الطعام لتطوير الأطعمة الوظيفية .

**الكلمات المفتاحية:** *Thymus algeriensis*؛ *Salvia verbenaca*؛ مضادات الأكسدة؛ مضاد الالتهاب؛ السمية؛ حمض روزمارينيك؛ الفا- تربينول

## Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer la composition chimique, les profils toxicologiques, l'activité antioxydants et anti-inflammatoire des extraits hydrométhanoliques et des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et de *Salvia verbenaca*, largement utilisées dans la médecine traditionnelle Algérienne. L'extraction hydrométhanolique a donné des rendements similaires pour les deux plantes. L'extrait de *Thymus algeriensis* (TACE) a montré des quantités plus élevées des composés phénoliques ( $303,8 \pm 2,5 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ ) avec l'acide rosmarinique comme composé majeur dans les deux extraits. *Thymus algeriensis* a donné 1.7 % d'huiles essentielles qui ont été caractérisé par leur richesse en monoterpénols, en particulier l' $\alpha$ -terpinéol et le linalol. Les tests *in vitro*, TACE a montré les meilleurs effets contre DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et hémolyse oxydative avec IC<sub>50</sub> =  $7,4 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $206,6 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$ ,  $192,2 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$  et  $72,6 \pm 7,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivement. Les résultats du test de  $\beta$ -carotène/acide linoléique ont révélé que le TACE a inhibé le blanchiment du  $\beta$ -carotène à  $90,3 \pm 2,5\%$ . En outre, il a eu un bon pouvoir réducteur ( $5,3 \pm 0,0 \text{ mmol FeSO}_4/\text{mg}$ ) et une capacité antioxydants totale ( $26,7 \pm 3,5 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ ). Tandis que l'extrait de *Salvia verbenaca* (SVCE) a présenté une meilleure activité de chélation du fer ( $189,3 \pm 7,9 \mu\text{g/mL}$ ). Les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* (TAHE) ont été efficaces contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $500,4 \pm 20,4 \mu\text{g/mL}$ ) avec une capacité antioxydants totale estimée à  $313,9 \pm 2,6 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ . Cependant, ils ont été moins efficace contre le DPPH<sup>\*</sup>, l'ABTS<sup>\*\*</sup>, et ils ont eu une faible capacité de chélation et de réduction par rapport aux extraits hydrométhanoliques. Dans l'étude *in vivo*, aucun signe de toxicité n'a été observé au cours des études de toxicité aiguë et la DL<sub>50</sub> a été estimé à plus de 2000 mg/kg pc. Le traitement quotidien avec TACE et SVCE a amélioré la capacité antioxydants du plasma et l'état redox hépatique en augmentant les niveaux de catalase et de glutathion réduit et en diminuant la peroxydation lipidique. De plus, la TACE et la SVCE, à une concentration de  $400 \mu\text{g} / \text{mL}$ , ont inhibé l'hémolyse induite par l'hypotonie avec des pourcentages de  $75 \pm 4$  et  $69 \pm 5\%$ , respectivement, et l'hémolyse induite par l'hyperthermie avec des pourcentages de  $85 \pm 1$  et  $78 \pm 2\%$ , respectivement. TACE et SVCE ont réduit l'œdème auriculaire induit par le xylène de près de 50 % pour les deux extraits. Alors que les huiles essentielles ont donné la meilleure inhibition de l'œdème de l'oreille avec  $57,5 \pm 7,5\%$  à la même dose ( $600 \text{ mg} / \text{kg}$  de poids corporel). En conclusion, on peut déduire que *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca* sont sans danger à la dose limite de 2000 mg / kg. Les extraits et huiles essentielles testés ont eu de puissantes propriétés antioxydants et anti-inflammatoire à la fois *in vitro* et *in vivo* en raison de leurs composés bioactifs, ce qui en fait d'excellents candidats pour le développement de nouveaux médicaments ou dans le cadre de formulations alimentaires pour le développement d'aliments fonctionnels.

**Mots clés :** *Thymus algeriensis*, *Salvia verbenaca*, antioxydants, anti-inflammatoire, toxicité, acide rosmarinique,  $\alpha$ -terpinéol.

**Abstract**

The aim of this study is to determine the chemical composition, toxicological profiles, antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydromethanolic extracts and essential oils of *Thymus algeriensis* and *Salvia verbenaca*, which are widely used in Algerian folk medicine. The hydromethanolic extraction gave comparable yields for both plants. *Thymus algeriensis* extract (TACE) contained higher amounts of phenolic compounds ( $303.8 \pm 2.5 \mu\text{g GAE/mg}$ ) with rosmarinic acid as major compound in both extracts. *Thymus algeriensis* yielded 1.7 % of essential oils that were characterized by their richness with monoterpenoids especially  $\alpha$ -terpineol and linalool. *In vitro* assays, TACE showed the best effects against DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative hemolysis with IC<sub>50</sub> of  $7.4 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ ,  $206.6 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $192.2 \pm 3.5 \mu\text{g/mL}$  and  $72.6 \pm 7.5 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Result of  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay revealed that TACE inhibited the  $\beta$ -carotene bleaching with  $90.3 \pm 2.5 \%$ . Also, it had good reducing power ( $5.3 \pm 0.0 \text{ mmol FeSO}_4/\text{mg}$ ) and total antioxidant capacity ( $267.7 \pm 3.5 \mu\text{g AAE/mg}$ ). Whereas, *Salvia verbenaca* extract (SVCE) presented a better iron chelating activity ( $189.3 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ ). The essential oils of *Thymus algeriensis* (TAHE) were effective against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $500.4 \pm 20.4 \mu\text{g / mL}$ ) with an estimated total antioxidant capacity of  $313.9 \pm 2.6 \mu\text{g EAA/mg}$ . However, it was less effective against DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, and it had poor chelating and reducing ability compared to hydromethanolic extracts. *In vivo* study, no signs of toxicity were observed during acute toxicity studies and LD<sub>50</sub> was estimated to be higher than 2000 mg/kg bw. Daily treatment with TACE and SVCE improved the plasma antioxidant capacity and the hepatic redox state by increasing the levels of catalase and reduced glutathione and reducing lipid peroxidation. Moreover, both TACE and SVCE, at a concentration of 400  $\mu\text{g / mL}$ , inhibited hypotonic-induced hemolysis with percentages of  $75 \pm 4$  and  $69 \pm 5\%$ , respectively, and hyperthermia-induced hemolysis with percentages of  $85 \pm 1$ . and  $78 \pm 2\%$ , respectively. TACE and SVCE reduced xylene-induced ear edema by nearly 50% for both extracts. Whereas, essential oils gave the best inhibition in ear edema with  $57.5 \pm 7.5\%$  at the same dose (600 mg/kg BW). In conclusion, it can be deduced that *Thymus algeriensis* and *Salvia verbenaca* are safe at the limit dose of 2000 mg/Kg. The tested extracts and essential oils had potent antioxidant and anti-inflammatory properties both *in vitro* and *in vivo* owing to their bioactive compounds, which make them excellent candidates for the development of new drugs, or as part of food formulations for the development of functional foods.

**Keywords:** *Thymus algeriensis*; *Salvia verbenaca*; antioxidant; anti-inflammatory; toxicity; rosmarinic acid;  $\alpha$ -terpineol



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des espèces réactives et non-réactives .....	5
<b>Tableau 2.</b> Classification botanique de <i>T. algeriensis</i> .....	36
<b>Tableau 3.</b> Classification botanique de <i>S. verbenaca</i> .....	39
<b>Tableau 4.</b> Rendements des extraits de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> .....	61
<b>Tableau 5.</b> Composition glucidique et composés phénoliques totaux de l'extrait hydrométhanolique de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> .....	62
<b>Tableau 6.</b> Teneur des composés phénoliques et triterpènes des extraits hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> .....	64
<b>Tableau 7.</b> Identification des composés phénoliques de l'extrait de <i>T. algeriensis</i> par UHPLC-DAD-ESI-MS <sup>n</sup> .....	67
<b>Tableau 8.</b> Identification des composés phénoliques de l'extrait de <i>S. verbenaca</i> par UHPLC-DAD-ESI-MS <sup>n</sup> .....	71
<b>Tableau 9.</b> Composition chimique en huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> .....	73
<b>Tableau 10.</b> Activités antioxydants in vitro de l'extrait hydrométhanolique de <i>T. algeriensis</i> .....	75
<b>Tableau 11 :</b> Activités antioxydants in vitro de l'extrait hydrométhanolique de <i>S. verbenaca</i> .....	77
<b>Tableau 12 :</b> Activités antioxydants in vitro de l'huile essentielle de <i>T. algeriensis</i> .....	79
<b>Tableau 13.</b> Effet des différentes concentration et concentration létale (CL <sub>50</sub> ) des extrait hydrométhanolique de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> sur <i>Artemia salina</i> .....	81
<b>Tableau 14.</b> Poids des souris traitées par les huiles essentielles <i>T. algeriensis</i> , les extraits hydrométhanoliques de <i>S. verbenaca</i> et <i>T. algeriensis</i> à une dose limite (2000 mg/kg pc).....	83
<b>Tableau 15.</b> Paramètres biochimiques du plasma des souris traitées par les huiles essentielles <i>T. algeriensis</i> , les extraits hydrométhanoliques de <i>S. verbenaca</i> et <i>T. algeriensis</i> à une dose limite (2000 mg/kg pc).....	84
<b>Tableau 16.</b> Poids corporel, poids relatif du foie et des reins des souris traitées par l'acide ascorbique, les extraits hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> à différentes doses.....	88
<b>Tableau 17.</b> Paramètres biochimiques des souris traitées par l'acide ascorbique et différentes doses de l'extrait hydrométhanolique de <i>T. algeriensis</i> , et du groupe non traité.....	89
<b>Tableau 18 :</b> Paramètres biochimiques des souris traitées par l'acide ascorbique et différentes doses de l'extrait hydrométhanolique de <i>S. verbenaca</i> , et du groupe non traité.....	90
<b>Tableau 19 :</b> Effet anti-hémolytique des extrait hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> , et des témoins (Acide acétylsalicylique).....	100

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Principales cibles moléculaires et conséquences biologiques du stress oxydant. ....	13
<b>Figure 2.</b> Système de défense cellulaire enzymatique et non enzymatique.....	18
<b>Figure 3.</b> Déclenchement de l'inflammation et activation de l'inflammasome. ....	21
<b>Figure 4.</b> Classification de l'inflammation par durée et fonctions immunitaires. ....	26
<b>Figure 5.</b> Interaction entre les ROS, le stress oxydant, l'inflammation et la physiologie/la pathologie cellulaire .....	28
<b>Figure 6.</b> Classification et structure de base des composés phénoliques.....	31
<b>Figure 7.</b> Unité isoprénique (h) et quelques structures des mono et sesquiterpènes . ....	34
<b>Figure 8.</b> <i>Thymus algeriensis</i> au stade de floraison .....	36
<b>Figure 9.</b> <i>Salvia verbenaca</i> L. en pleine floraison .....	38
<b>Figure 10.</b> Chromatogramme de l'extrait récupéré de <i>T. algeriensis</i> à 280 nm.....	66
<b>Figure 11.</b> Chromatogramme de l'extrait récupéré de <i>S. verbenaca</i> à 280 nm. ....	70
<b>Figure 12.</b> Chromatogramme des huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> .. ....	74
<b>Figure 13.</b> Coupes histologiques du foie et des reins des souris traitées par les huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> , des extraits hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> à une dose unique (2000 mg / kg pc), et le contrôle (× 40).....	86
<b>Figure 14.</b> Activité antioxydant plasmatique du DPPH et la capacité de réduction ferrique FRAP des souris traitées par les extraits hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S.verbenaca</i> respectivement, l'acide ascorbique, et du groupe non traité (témoin). ....	92
<b>Figure 15.</b> Estimation de l'activité de la catalase (Cat), du taux de glutathion réduit (GSH) et du malondialdéhyde (MDA) dans l'homogénat hépatique des souris traitées par l'extrait hydrométhanolique de <i>T. algeriensis</i> , <i>S. verbenaca</i> , l'acide ascorbique et du groupe témoin. ....	96
<b>Figure 16.</b> Effet des extraits hydrométhanoliques de <i>T. algeriensis</i> et <i>S. verbenaca</i> , et les huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> sur l'œdème auriculaire induit par le xylène.. ....	102

## Liste des abréviations

**Ab** : Amyloïde-b

**GalA** : acide galacturonique

**ALP** : phosphatase alcaline

**ALT** : alanine aminotransférase

**AST** : aspartate amino transférase

**CAT** : catalase

**CLR** : récepteurs de lectine de type C

**COX-2** : cyclooxygénase-2

**CRP** : protéine C-réactive

**DAMP** : motifs moléculaires associés aux dégâts ou aux dangers

**GC-MS** : chromatographie gazeux/  
spectroscopie de mass

**GPx** : glutathion peroxydase

**GRx** : glutathion réductase

**GSH** : glutathion réduit

**GVHD** : maladie du greffon contre l'hôte  
(Graft versus Host disease)

**HMGB1**: High mobility group box 1

**HOCl** : hypochlorite

**ICAM** : Inter-Cellular Adhesion Molecule

**IL-1 $\beta$**  : l'interleukine-1-bêta

**JAK-STAT** : Janus kinases et les  
transducteurs de signaux et  
activateurs de transcription

**CL<sub>50</sub>** : concentration létal médiane

**DL<sub>50</sub>** : dose létal médiane

**LPS** : lipopolysaccharides

**MA** : maladie d'Alzheimer

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases

**MBP** : protéine de liaison au mannose

**MCT** : transporteurs monocarboxylique

**MCV** : maladies cardiovasculaires

**MDA** : malondialdéhydes

**MPO** : myéloperoxydase

**NF- $\kappa$ B** : le facteur nucléaire kappa-B

**NLR** : récepteurs intracellulaires de type NOD  
(NOD-like receptors)

**NOS** : oxyde nitrique synthases

**NOX4**: NADPH oxydase 4

**Nrf2**: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-  
like 2

**PAMP** : motif moléculaire associé aux  
pathogènes

**PLA2**: phospholipase A2

**PMN**: poly morpho nucléaire

**PRR** : récepteur de reconnaissance de motifs  
moléculaires

**RLR** : récepteurs du gène inductible par  
l'acide rétinoïque (RIG-I-like  
receptor RIG)

**RONS** : espèces réactive de l'oxygène et de  
nitrogène

**SOD** : superoxyde dismutase

**SVCE** : extrait brut de *Salvia verbenaca*

**SPE** : extraction à phase solide (solide phase  
extraction)

**TLR** : Récepteurs de type Toll (Toll-like  
receptors)

**TNF- $\alpha$**  : facteur de nécrose tumorale alpha

**TXN**: thiorédoxine

**UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>**: ultrahigh  
performance liquid chromatography

**VCAM** : vascular cell adhesion molecule

Table de matière

Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Liste des abréviations.....	
Introduction .....	1
Chapitre I. Rappels bibliographiques.....	4
1. Stress oxydant et inflammation.....	4
1.1. Stress oxydant .....	4
1.1.1. Radicaux libres et espèces réactives.....	4
1.1.2. Sources des radicaux libres.....	8
1.1.3. Rôles physiologiques des radicaux libres .....	9
1.1.4. Notion de Stress oxydant.....	10
1.1.5. Cibles moléculaires et pathologies des radicaux libres .....	11
1.1.6. Antioxydants .....	14
1.2. Inflammation .....	19
1.2.1. Mécanismes d'inflammation.....	19
1.2.2. Types d'inflammation .....	24
1.2.3. Interrelation inflammation-Stress oxydant.....	26
2. Composés phénoliques et huiles essentielles.....	28
2.1. Composés phénoliques .....	28
2.1.1. Polyphénols non flavonoïdes .....	29
2.1.2. Flavonoïdes .....	30
2.1.3. Propriétés des composés phénoliques.....	32
2.2. Huiles essentielles .....	33
2.2.1. Mono et sesquiterpènes.....	33
2.2.2. Propriétés des huiles essentielles .....	34
3. Plantes d'intérêt .....	35
3.1. La famille des Lamiaceae .....	35
3.2. <i>Thymus algeriensis</i> Boiss et Reut.....	35
3.2.1. Description .....	35
3.2.2. Classification systématique.....	36
3.2.3. Usages traditionnels .....	37
3.2.4. Composition chimique .....	37
3.3. <i>Salvia verbenaca</i> L. ....	38
3.3.1. Description .....	38

## Table de matière

3.3.2. Classification systématique.....	38
3.3.3. Usages traditionnels .....	39
3.3.4. Composition chimique .....	39
Chapitre II. Matériel et méthodes.....	42
1. Matériel végétal .....	42
2. Produits chimiques.....	42
3. Animaux.....	42
4. Préparation des extraits.....	43
5. Composition chimique .....	44
5.1. Analyse quantitative et qualitative des glucides .....	44
5.2. Dosage des polyphénols totaux.....	44
5.3. Dosage des flavonoides totaux (TFC) et flavonols (FOL).....	45
5.4. Dosage des tanins totaux (TT).....	45
5.5. Dosage des triterpènes .....	46
5.6. Analyses chromatographiques .....	46
5.6.1. Analyse UHPLC-DAD-ESI-MS <sup>n</sup> .....	46
5.6.2. Analyse des huiles essentielles par CG/MS.....	47
6. Activités biologiques.....	48
6.1. Activités antioxydants <i>in vitro</i> .....	48
6.1.1. Pouvoir réducteur .....	48
6.1.2. Activités antiradicalaires .....	49
6.1.3. Test de Blanchiment du $\beta$ -carotène .....	51
6.1.4. Chélation du fer.....	52
6.2. Test de toxicité sur l' <i>Artemia Salina</i> (BSLA).....	52
6.3. Toxicité aigue.....	53
6.4. Toxicité subaiguë et statut antioxydants <i>in vivo</i> .....	54
6.4.1. Analyse des paramètres biochimiques .....	54
6.4.2. Effet sur la capacité antioxydant du plasma.....	55
6.4.3. Effet des extraits sur l'état redox hépatique.....	55
6.5. Activité anti-inflammatoire .....	56
6.5.1. Stabilisation membranaire .....	56
6.5.2. Œdème auriculaire induit par le xylène.....	57
7. Analyses statistiques.....	58
Chapitre III. Résultats et discussions .....	60
1. Rendement des extraits.....	60
2. Analyse quantitative et qualitative des glucides .....	62
3. Dosage des composés phénoliques .....	62

## Table de matière

<b>4. Caractérisation des extraits.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Identification des composés phénoliques par UHPLC-ESI-MS<sup>n</sup> .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2. Analyse des huiles essentielles par CG/MS.....</b>	<b>73</b>
<b>5. Activités antioxydants <i>in vitro</i> des extraits des deux plantes.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1. Activités antioxydants de l'extrait hydrométhanolique de <i>T.algeriensis</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>5.2. Activités antioxydants de l'extrait hydrométhanolique de <i>S. verbenaca</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3. Activités antioxydants des huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>6. Activités biologiques <i>in vivo et ex vivo</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>6.1. Effet larvicide sur les larves <i>Artemia salina</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>6.2. Toxicité aiguë.....</b>	<b>81</b>
<b>6.3. Toxicité subaiguë.....</b>	<b>86</b>
<b>6.4. Capacité antioxydant du plasma.....</b>	<b>91</b>
<b>6.5. Etat redox hépatique.....</b>	<b>92</b>
<b>6.6. Activité anti-inflammatoire .....</b>	<b>98</b>
<b>6.6.1. Stabilisation membranaire .....</b>	<b>98</b>
<b>6.6.2. Œdème auriculaire induit par le xylène.....</b>	<b>100</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>105</b>

# **Introduction**

### Introduction

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans l'alimentation humaine et une consommation élevée de ces composés est un biomarqueur d'une alimentation saine . Les polyphénols et les huiles essentielles sont dotés d'un large éventail de bioactivités, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anticarcinogènes, antiviraux et cardioprotecteurs. Les composés phénoliques et les huiles essentielles peuvent également jouer un rôle critique en tant qu'agents antimicrobiens, une propriété qui a fait l'objet d'une attention accrue en raison de leurs effets potentiel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Leur utilisation est également bien établie dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Grâce à leurs multiples effets sur la santé, la demande sur les composés d'origines végétales augmente et leur marché a atteint 1,28 milliard USD en 2018 avec un taux de croissance annuel composé de 7.2% de 2019 à 2025 (**Grand View Research, 2019**). De ce fait, les aliments d'origine végétale suscitent un intérêt croissant en raison de leur innocuité et de leurs propriétés médicinales liés à la présence de composés phénoliques et/ou des huiles essentielles.

Les plantes appartenant au genres *Thymus* et *Salvia*, sont largement utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques. Les bienfaits pour la santé de ces espèces comprennent la diminution des symptômes liés à la pharyngite aiguë et à la maladie d'Alzheimer (**Silva et al, 2020**), amélioration du profil lipidique, des défenses antioxydants et des marqueurs immunomodulateurs entre autres avantages (**El-Boshy et al, 2019**). Compte tenu de cela, les espèces *Thymus* et *Salvia* ont toujours suscité l'intérêt des industries alimentaires et pharmaceutiques dans le but de développer de nouveaux médicaments à base de composés naturels ou dans le cadre de formulations alimentaires pour le développement d'aliments



fonctionnels. Les études menées sur plusieurs espèces *Thymus* et *Salvia* ont permis d'identifier des composés qui pourraient expliquer leurs effets bénéfiques pour la santé (Silva et al, 2020). Cela comprend les tri terpénoïdes (*T. persicus*) (Mirjalili et al, 2015), les diterpénoïdes (*S. greggii*) (Kawahara et al, 2004), les huiles essentielles de *T. marschallianus* (Jia et al, 2010) et *S. pilifera* (Kaya et al, 2016) ou les composés phénoliques de *T. zygis* (Afonso et al, 2018) et *S. officinalis* (Kolac et al, 2017).

Parmi les espèces *Thymus* et *Salvia*, on trouve *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca*. *Thymus algeriensis* est largement utilisé à des fins culinaires et médicinales comme antiseptique, antispasmodique, antibactérien, antifongique et anti-abortif. Elle est également utilisée pour traiter les troubles infectieux tels que la dysenterie, le rhume et la diarrhée (Ziani et al, 2019). Alors que *S. verbenaca* est consommée sous forme de salade et de légume bouilli, et traditionnellement utilisé pour guérir les plaies et les ulcères (González et al, 2010). La plupart des études sur *T. algeriensis* (Guesmi et al, 2017) et *S. verbenaca* (Belkhiri et al, 2017) se concentrent sur leurs compositions chimiques et leurs activités *in vitro*. Malgré, leurs utilisations extensive les données sur leurs toxicités et leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants *in vivo* restent rares. Dans ce contexte, s'inscrit l'objectif de notre travail qui vise à fournir des données scientifiques sur le profile toxicologique, l'activité anti-inflammatoires des plantes *T. algeriensis* et *S. verbenaca*. Ce qui va permettre la valorisation des deux espèces sur le plan pharmacologique.

Ce travail est divisé en deux grande parties : Une première partie dédiée à une recherche bibliographique traitant les phénomènes du stress oxydant et de l'inflammation ainsi que des généralités sur les polyphénols et les plantes d'interets.

Une deuxième partie est dédiée à l'aspect experimentale de ce travail et dans la quelle 4 grands axes ont été élaborés :

- Une extraction et une étude phytochimique ont été réalisés sur les parties aériennes de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*.
- Une étude de l'activité antioxydants *in vitro* est réalisée.
- Une détermination du profil toxicologique des extraits ainsi que leurs effets sur l'état antioxydants du plasma et du foie.
- En fin, une étude a été menée pour déterminer l'activité anti-inflammatoire des extraits en utilisant des méthodes *ex-vivo* et *in-vivo*.

# **Chapitre I**

## **Rappels Bibliographiques**

## Chapitre I. Rappels bibliographiques

### 1. Stress oxydant et inflammation

L'inflammation et le stress oxydant sont deux phénomènes qui ont un rôle physiologique dans l'organisme vivant et qui sont fortement liés. Un déséquilibre entre la production d'espèces réactives et leurs éliminations par les mécanismes de protection, peut conduire à une inflammation chronique et vice versa. Ils peuvent endommager les cellules et conduire à plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose, la carcinogenèse et les maladies neurodégénératives (Chaterjee, 2016).

#### 1.1. Stress oxydant

##### 1.1.1. Radicaux libres et espèces réactives

L'oxygène est indispensable aux organismes vivants et permet de produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons comme celle existant dans les mitochondries des cellules. Pourtant, lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (conditions de stress oxydant), il y a production excessive de ROS (Reactive Oxygen Species) qui sont susceptibles de générer des dommages oxydatifs au niveau de cibles moléculaires (lipides, protéines, acides nucléiques). Les RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) désignent les dérivés réactifs radicalaires et non radicalaires de l'oxygène et de l'azote. Ils sont classés en deux grandes catégories qui comprennent les radicaux libres et les espèces non réactives (Tableau 1) (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Engwa, 2018). Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome ou molécule) hautement réactives avec un ou plusieurs électrons non appariés dans leurs couches externes (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Ligouri *et al.*, 2018). Cette caractéristique les rend instable et leur procure une grande réactivité vis-à-vis des molécules environnantes. Un radical libre se stabilise au détriment de la molécule voisine qui devient à son tour un radical libre et ainsi de suite (Engwa, 2018).

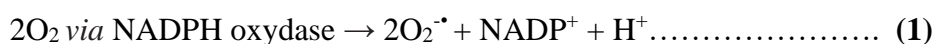
Cependant, les espèces non réactives ne sont pas vraiment des radicaux libres mais peuvent conduire à des réactions radicalaires et générer d'autres espèces réactives dans les organismes vivants (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Ozcan & Ogun 2015 ; Jha *et al.*, 2017).

**Tableau 1** : Classification des espèces réactives et non-réactives (Engwa, 2018).

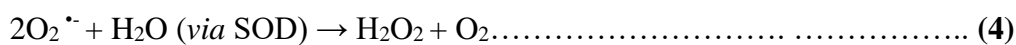
Espèces réactives	Nom	Symbole
<b>Radicaux libres</b>	Oxygène (bi-radical)	$O_2^{\cdot}$
	Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
	Ion hydroxyle	$OH^{\cdot}$
	Le radical pyroxyde	$ROO^{\cdot}$
	Le radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
	L'oxide nitrique	$NO^{\cdot}$
<b>Espèces non-reactives</b>	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
	Peroxyde Organique	$ROOH$
	Acide hypochloreux	$HOCL$
	Aldéhydes	$HCOR$
	Ozone	$O_3$
	Oxygène Singlet	$^1O_2$
	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

Les radicaux libres sont générés par divers processus physiologiques dans les organismes vivants et parmi lesquels, on trouve :

- **L'anion superoxyde** : Est un sous-produit de la chaîne respiratoire mitochondriale qui peut se former par un processus enzymatique (1) (NADPH, cytochrome C, oxydoréductase, dihydrofolate déshydrogénase, aldéhyde oxydase et xanthine oxydase), une réaction d'auto oxydation (2) (oxydation de l'hème) ou par des réactions non enzymatiques de transfert d'électrons (3) (Halliwell, 2006 ; Lobo *et al.*, 2010 ; Phaniendra *et al.*, 2015 ; Ozcan & Ogun, 2015).



- **Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** : Est la molécule la moins réactive parmi les ROS et qui est stable à pH et à température physiologique, et aussi en l'absence d'ions métalliques. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est produit par dismutation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, une réaction catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (4) ou par réduction directe d'O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est relativement inactif et capable de diffuser facilement à travers les membranes phospholipidiques, mais sa dangerosité est en réalité liée à sa conversion en radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) toxique par interaction avec les métaux de transition comme le fer ferreux (Weidinger & Kozlov, 2015 ; Phaniendra *et al.*, 2015)



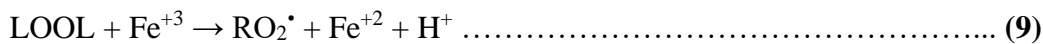
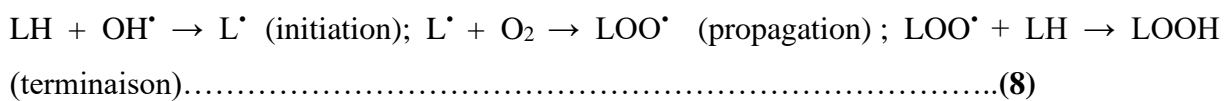
- **Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)** : Est l'un des ROS les plus réactifs qui se forme à partir de l'anion superoxyde et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via la réaction Haber Weiss (5) ou en présence d'ions métalliques par la réaction de Fenton (6). *In vivo*, il a un demi vie très court et peut fortement réagir avec les molécules organiques (l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides), causant des dommages importants aux cellules plus que tout autre ROS (Weidinger et Kozlov, 2015 ; Phaniendra *et al.*, 2015).



- **L'oxygène singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)** : C'est une espèce non radicalaire qui est produite *in vivo* par l'activation des neutrophiles et des éosinophiles (Phaniendra *et al.*, 2015). Il peut se former par décomposition spontanée du trioxyde d'hydrogène dans l'eau ou par la réaction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec l'hypochlorite (7) (Ozcan & Ogun, 2015) ou par des enzymes tels que les lipoxygénases, les dioxygénases et le lactopéroxydase (Phaniendra *et al.*, 2015). L'oxygène singlet peut oxyder directement les biomolécules (les protéines, l'ADN et les lipides) et il est impliqué dans l'oxydation du cholestérol via la réaction de Dielse-Alder (Halliwell, 2006)



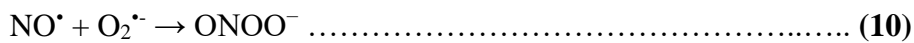
- **Les radicaux peroxyde et alcoyle** : Sont des antités lipidiques qui participent aux réactions de la peroxydation lipidique (8). Ils sont produits en présence d'oxygène par addition de doubles liaisons aux lipides (auto-oxydation) ou par abstraction d'hydrogène par des radicaux OH<sup>•</sup> sur une liaison C-H conduisant à un radical carboné qui réagit rapidement avec O<sub>2</sub> pour donner un radical peroxyde (LOO<sup>•</sup>) (Lobo *et al.*, 2010). Les ions métalliques peuvent également provoquer l'oxydation des peroxydes pour produire des radicaux peroxyde et alcoyle (9) (Ozcan et Ogun, 2015).



- **L'Oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>)** : Est une molécule lipophile non chargée contenant un seul électron non apparié. Elle est plus stable et diffusable que l'hydroxyle OH<sup>•</sup>, capable de former d'autres intermédiaires réactifs (Ozcan et Ogun, 2015). L'oxyde nitrique est généré dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui catalyse la conversion de l'arginine en citrulline et NO<sup>•</sup>. Ce radical libre est soluble dans les milieux aqueux et lipidique et peut diffuser à travers le cytoplasme et les membranes plasmiques, mais a un court demi vie dans l'environnement aqueux (Valko *et al.*, 2007).

- **Le Peroxynitrite** : Est une espèce non radicalaire, mais extrêmement réactive qui peut directement altérer de nombreuses molécules biologiques telles que l'ADN et provoquer l'oxydation des lipides. La formation du peroxynitrite nécessite la présence de deux radicaux libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et NO<sup>•</sup> qui sont modérément toxiques individuellement, mais lorsqu'ils se combinent immédiatement pour former une espèce non radicalaire existant physiologiquement à l'état d'anion (ONOO<sup>-</sup>) (10) (Valko *et al.*, 2007 ; Lobo *et al.*, 2010). Sa grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires, en fait un oxydant puissant impliqué dans les dommages des tissus au niveau des sites d'inflammation, est aussi à

l'origine de divers troubles neurodégénératifs et plusieurs maladies rénales (**Ozcan & Ogun, 2015**).



- **L'hypochlorite** : Dans les neutrophiles, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est converti par l'enzyme myéloperoxydase (MPO) en hypochlorite (HOCl) selon la réaction (11). Cette espèce est associée aux dommages intensifs des tissus hôtes (**Nimse & Pal, 2015**).



Les radicaux  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{NO}^\bullet$  sont de puissants agents oxydants qui participent à la génération de radicaux libres très réactifs. Le fait que les RONS primaires sont bien contrôlés par rapport aux RONS secondaires qui ne sont pas étroitement contrôlés (**Weidinger et Kozlov, 2015**), indique que les dommages cellulaires sont principalement liés aux RONS secondaires tels que  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  et HOCl (**Lushchak, 2014 ; Weidinger & Kozlov, 2015**).

## 1.1.2. Sources des radicaux libres

### 1.1.2.1. Sources exogènes

Certains composés organiques dans l'atmosphère peuvent réagir de manière non enzymatique avec l'oxygène pour générer des radicaux libres. Une production exogène peut survenir en raison de l'exposition à des polluants environnementaux comme les métaux lourds (Cd, Hg, Pb, Fe et As), certains médicaments (cyclosporine, tacrolimus, gentamycine et bléomycine), et les solvants chimiques. La formation des radicaux libres est inévitable au sein de l'organisme et peut être exacerbé par les nombreuses agressions extérieures que le corps subit. Le tabac, la pollution, les radiations, une nutrition trop riche en graisse, mais aussi la prise d'alcool sont autant de facteurs qui favorisent la formation des radicaux libres (**Pizzino et al., 2017 ; Engwa, 2018 ; Sies, 2019**).



### 1.1.2.2. Sources endogènes

L'inflammation, l'ischémie, l'infection, le cancer, l'exercice excessif, le stress mental et le vieillissement sont tous responsables de la production endogène des radicaux libres. Cela comprend les réactions enzymatiques pour générer ces radicaux libres. Il s'agit notamment des réactions impliquées dans la chaîne respiratoire, le système cytochrome P450, les phagocytes, les réactions impliquant le fer et d'autres métaux de transition, les peroxysomes et la xanthine oxydase (**Pizzino *et al.*, 2017 ; Sies, 2019**).

### 1.1.3. Rôles physiologiques des radicaux libres

A concentration modérée non cytotoxique, les radicaux libres peuvent intervenir dans le contrôle d'un certain nombre de fonctions cellulaires importantes. Ils sont impliqués notamment dans l'adéquation de l'approvisionnement en oxygène ou encore dans la réponse inflammatoire/immunitaire. Cependant, lorsque ces espèces oxydantes sont produites de manière excessive, elles favorisent l'activation de l'autophagie, l'apoptose et la nécrose (**He *et al.*, 2017**).

Les radicaux libres sont largement impliqués dans la signalisation cellulaire pour maintenir une homéostasie cellulaire et permettre la communication de la cellule avec le milieu extérieur. Les RONS en particulier  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$  et le  $NO^{\bullet}$  sont les principales molécules de signalisation, en dépit de la capacité à traverser la membrane cellulaire, leurs réactions réversibles avec les cibles moléculaires sont moins néfastes par rapport aux RONS secondaires (**Weidinger & Kozlo, 2015**). Ainsi, le radical  $NO^{\bullet}$  joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie vasculaire en induisant une vasodilatation endothéliale lorsqu'il est produit (en faible quantité) par la NO-synthase (NOS) constitutive endothéliale (NOS-3), alors qu'il devient un agent toxique lorsqu'il est produit en grande quantité par la NOS inductible macrophagique (NOS-2). Le  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$  jouent un rôle dans la physiologie vasculaire normale en réponse à des facteurs tels que les contraintes mécaniques (**Volk *et al.*,**

2007 ; Alfadda et Sallam, 2012). Les radicaux libres sont également impliqués dans les systèmes de défense immunologique (Alfadda & Sallam, 2012 ; Rahal *et al.*, 2014 ; Pizzino *et al.*, 2017). Il a été montré qu'une grande quantité de ROS est produite par les cellules immunitaires, plus particulièrement les cellules phagocytaires. Ces cellules produisent du  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  et du  $H_2O_2$  pour éliminer les microorganismes pathogènes et les cellules cancéreuses. Dans les neutrophiles activés, le radical  $HOCl$  et le  $ONOO^-$  sont nécessaires en raison de leurs propriétés bactéricides (Pohanka, 2013 ; Jha *et al.*, 2017).

Actuellement, les radicaux libres et leurs métabolites sont supposés avoir d'importantes activités de modulation et une capacité de régulation dans les processus de transduction du signal dans diverses voies (Rahal *et al.*, 2014, Jha *et al.*, 2017 ; He *et al.*, 2017). Ils sont capables d'affecter les processus physiologiques vitaux tels que la régulation du cycle cellulaire, la réponse aux dommages d'ADN, la régulation du métabolisme, l'apoptose et l'autophagie (dans les cas des taux physiologique).

#### 1.1.4. Notion de Stress oxydant

Au cours de la respiration, les cellules réduisent l'oxygène en eau, mais une partie de cet oxygène échappe parfois au métabolisme cellulaire normal et produit en permanence des radicaux libres à partir des diverses réactions chimiques dans l'organisme.

Une perturbation de l'équilibre oxydants/antioxydants due à une surproduction des RNS et/ou un déficit en antioxydants, est à l'origine du stress oxydant. Ces molécules instables en excès peuvent causer des dommages cellulaires importants pouvant aller jusqu'à provoquer la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Rahal *et al.*, 2014 ; Sies, 2019). Il convient de souligner que si les systèmes antioxydants sont capables de baisser rapidement les niveaux des RNS à des niveaux normaux, ce déséquilibre peut être appelé « stress oxydant aigu » (Lushchak, 2014). Dans certains cas, la cellule ne peut pas neutraliser l'excès des RNS, ce qui mène à un état de « stress oxydant chronique » induisant de graves dommages à

l'organisme (**Carocho et Ferreira, 2013 ; Lushchak, 2014**). De plus, on parle d'un état d'eustress lorsque l'organisme est exposé à de faibles concentrations de RONS qui réagissent avec des cibles spécifiques afin d'assurer un rôle physiologique comme la signalisation redox. Par contre, l'état de distress est causé par l'exposition de l'organisme à des taux élevés de RONS qui réagissent avec des cibles non spécifiques et sont responsables de la perturbation de la signalisation redox et/ou l'altération des biomolécules (**Sies, 2019**).

### **1.1.5. Cibles moléculaires et pathologies des radicaux libres**

#### **a. Les protéines**

Les protéines sont sensibles aux attaques des radicaux libres principalement par les modifications oxydatives d'acides aminés spécifiques, le clivage des peptides et la formation d'une réticulation protéique due à la réaction avec les produits de peroxydation lipidique (**figure 1**). Ces dommages oxydatifs peuvent affecter l'activité des enzymes, des récepteurs et le transport membranaire conduisant à l'altération du mécanisme de transduction du signal, des activités enzymatiques, la stabilité thermique et de la sensibilité à la protéolyse (**Lobo et al., 2010 ; Carocho et Ferreira, 2013 ; Engwa, 2018**).

#### **b. Acide désoxyribonucléique (ADN)**

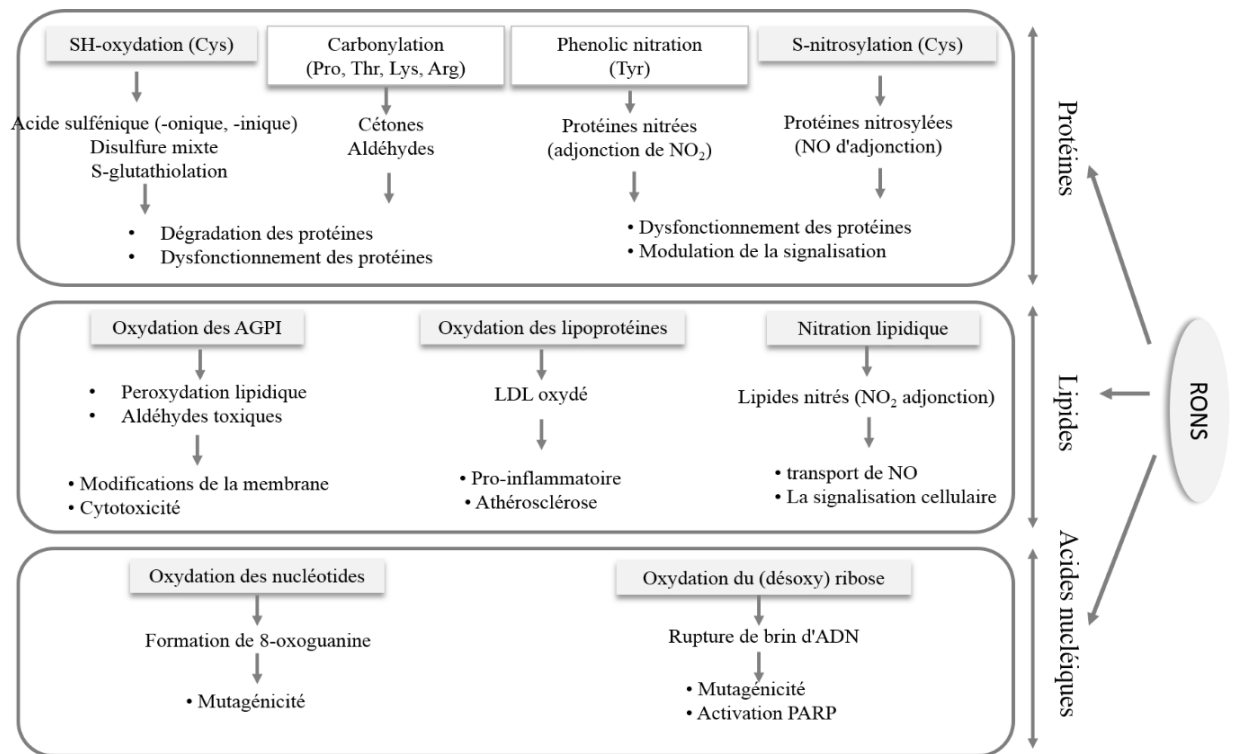
L'ADN est très vulnérable à l'attaque par les radicaux libres et subit donc différents dommages oxydatifs. Les radicaux  $\text{OH}^{\bullet}$  et  $\text{LOO}^{\bullet}$  sont les espèces réactives les plus impliquées dans l'altération de l'ADN car ils peuvent réagir avec tous ses composants (**Carocho et Ferreira, 2013 ; Engwa, 2018**). Le radical  $\text{OH}^{\bullet}$  peut réagir avec le résidu 2'-désoxyribose dans l'ADN en retirant un hydrogène ( $\text{H}^{\bullet}$ ) de tous ses atomes de carbone en formant cinq radicaux centrés sur le carbone, le radical C4' C-centré. Ces radicaux subissent d'autres réactions et produisent une variété de 2'-désoxyribose oxydants. L' $\text{OH}^{\bullet}$  peut aussi réagir avec les bases de l'ADN et principalement la guanine qui est le meilleur donneur d'électrons étant donné qu'elle possède le plus faible potentiel de réduction (1.29 V) (**Moussa et al., 2019**). Le

Malondialdéhyde (MDA) qui est le produit final de la peroxydation lipidique est capable de réagir directement avec la guanine dans l'ADN et peut conduire au cancer, en particulier le cancer colorectal (**Rašić *et al.*, 2018**). Les altérations du matériel génétique, si elles ne sont réparées, peuvent engendrer la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (**figure 1**), ainsi que certaines pathologies telles que l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer (**Engwa, 2018**). Le tabagisme, les polluants environnementaux et l'inflammation chronique sont des sources de dommages oxydatifs de l'ADN qui pourraient contribuer au cancer dans les cellules somatiques ou à des malformations dans les cellules germinales (**Sharma *et al.*, 2014 ; Pizzino *et al.*, 2017**).

### c. Les lipides

La peroxydation lipidique est l'altération la plus courante des lipides (**Figure 1**). Les acides gras polyinsaturés constituent une cible privilégiée par le OH• en raison de leurs nombreuses doubles liaisons. Ils peuvent être dégradés par un mécanisme en chaîne appelé peroxydation lipidique qui comprend trois phases. La première est une phase d'initiation avec formation d'un radical lipidique (L•) (**14**) par l'intermédiaire d'un radical hydroxyle. Puis au cours de la propagation, le radical lipidique réagit avec de l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO•) (**15**). Ce dernier réagit avec un autre acide gras en formant un hydroperoxyde (LOOL) (**16**) et qui peuvent se dissocier pour donner d'autres espèces radicalaires et des aldéhydes tels que le MDA (**17**), un sous-produit de la peroxydation lipidique et un bio marqueur du stress oxydant (**Nimse & Pal, 2015 ; Moussa *et al.*, 2019**). Ce mécanisme de dégradation des acides gras au sein de la membrane provoque la formation d'hydroperoxydes instables qui induisent une diminution de la fluidité membranaire et donc une modification de différents récepteurs et de la transduction des signaux.





**Figure 1.** Principales cibles moléculaires et conséquences biologiques du stress oxydant. Cys : cystéine, Pro : proline, Thr : thréonine, Lys : lysine, Tyr : tyrosine, AGPI : acides gras polyinsaturés, LDL : lipoprotéines de faible densité, PARP : poly (ADP-ribose) polymérase (Lugrin *et al.*, 2014).

Les radicaux libres joueraient un rôle important dans la pathogenèse d'un certain nombre de maladies cardiovasculaires (MCV) telles que l'athérosclérose, l'ischémie et l'hypertension (Chatterjee *et al.*, 2007). Le stress oxydant est également impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, Huntington, la sclérose amyotrophique latérale et la sclérose en plaques. Dans la maladie de Parkinson, les niveaux élevés de Fe<sup>+3</sup> médient la production de OH<sup>•</sup>, entraînant des lésions aux neurones dopaminergiques (Phaniendra *et al.*, 2013). La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par l'accumulation du peptide Amyloïde-b (Ab) qui peut se lier aux ions

de métaux de transition et générer du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical OH<sup>•</sup> toxique via la réaction de Fenton conduisant à des dommages intensifs. La peroxydation lipidique chez les patients atteints de la MA, peut induire la mort neuronale en altérant le fonctionnement des pompes ioniques (à la fois Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> - ATPase et Ca<sup>+2</sup>-ATPase), des transporteurs de glucose...ect (**Phaniendra et al., 2013 ; Di Meo et al., 2016**). D'autres maladies comme le diabète, le cancer, et la polyarthrite rhumatoïde sont étroitement liées à la production exagérée des RONS (**Phaniendra et al., 2013**).

### 1.1.6. Antioxydants

Dans des conditions normales, il existe un équilibre entre les taux de production des radicaux libres et leurs taux d'élimination par les divers antioxydants. Les cellules possèdent donc différentes stratégies antioxydants afin de réguler les concentrations des radicaux libres et maintenir l'état redox en équilibre. Les antioxydants sont des molécules stables, à des concentrations relativement faibles capables de neutraliser les radicaux libres et d'inhiber la réaction d'auto-oxydation en chaîne (**Sharma, 2014 ; Tan et al., 2018**). Les antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

#### 1.1.6.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxyrédoxine, qui sont les principales enzymes antioxydants, alors que la glutathion réductase (GRx) et d'autres enzymes sont des enzymes antioxydants secondaires. Toutes ces enzymes sont ingénieusement conçues pour maintenir les concentrations des radicaux libres sous contrôle (**Carocho & Ferreira, 2013**).

La SOD est situées dans le cytosol et les mitochondries, elle convertit l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en oxygène et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'ions métalliques tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn) ou le manganèse (Mn) (**figure 2**) (**Nimes et al., 2015 ; Engwa, 2018**).

La CAT se trouve dans les peroxysomes, est l'une des principales protéines présentes dans le corps humain. Cette enzyme est capable de convertir 6 milliards de molécules  $H_2O_2$ /seconde en eau et en oxygène (Nimes et al., 2015), et sa surexpression rend les cellules plus résistantes à la toxicité de  $H_2O_2$  et aux dommages d'origine oxydatifs (Adwas et al. 2019).

Le GPx se trouve à la fois dans le cytoplasme de presque toutes les cellules humaines ainsi que dans l'espace extracellulaire et convertit le  $H_2O_2$  en eau (figure 2) (Nimes et al., 2015).

L'enzyme peroxyredoxine est une famille hautement conservée de peroxydases dépendantes de la cystéine et qui réduisent le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes lipidiques et le  $NOO^-$  (Vazquez-Medina, 2017).

Enfin, la GR catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) (Figure 2). Cette enzyme permet à la cellule de maintenir des niveaux adéquats de GSH cellulaire (Engwa, 2018). La GR appartient au système de défense protégeant l'organisme contre le stress oxydant et la carence en GR est caractérisée par une hémolyse due à une sensibilité élevée des membranes érythrocytaires au radical  $H_2O_2$  et une prévalence accrue au stress oxydant qui joue un rôle clé dans la pathogenèse de nombreuses maladies (figure 2) (Adwas et al., 2019).

#### 1.1.6.2. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont généralement des composés de faible poids moléculaires capables de prévenir les dommages oxydatifs soit en interagissant directement avec les RONS en les rendant stables, soit indirectement en chélatant les métaux de transitions et empêchant de ce fait la propagation de la réaction Fenton (Engwa, 2018). Les antioxydants non-enzymatiques peuvent être endogènes ou exogènes (Carocho et Ferreira, 2013).

**a. Antioxydants non enzymatiques endogènes****- La vitamine A :**

La vitamine A ou rétinol est un caroténoïde produit dans le foie et résulte de la dégradation du  $\beta$ -carotène, son activité antioxydants est attribuée à sa capacité de se combiner avec les radicaux peroxyde avant de se propager aux lipides (Carocho et Ferreira, 2013). Elle a un rôle vital dans la protection des LDL humains contre l'oxydation stimulée par le cuivre dans le cas des maladies cardiovasculaires (Nimes *et al.*, 2015).

**- Le glutathion réduit**

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide présent dans toutes les cellules végétales et animales. C'est un antioxydants hydrosoluble présent à des concentrations cellulaires élevées (1 à 10 mM) dans le noyau, les mitochondries et le cytoplasme. Le GSH prévient les dommages cellulaires induits par les RONS, notamment les peroxydes et les métaux lourds. Il peut détoxifier les oxydants et les électrophiles via des réactions enzymatiques avec ses enzymes apparentées (GR et GPx) (Engwa, 2018), en plus de son implication dans les métabolismes hormonaux (tels que les œstrogènes), la transduction du signal pour la transcription et la régénération d'antioxydants oxydés comme la vitamine C et la vitamine E (Figure 2) (Carocho & Ferreira, 2013 ; Moussa, 2019). Toute altération des niveaux de glutathion réduit peut entraîner des effets néfastes sur la santé tels que la dérégulation de la prolifération cellulaire, la transcription des enzymes de détoxification et l'apoptose (Tan *et al.*, 2018).

**- L'acide urique**

L'acide urique est un antioxydants hydrophile généré lors du métabolisme des nucléotides puriques. C'est un puissant donneur d'électrons et un piègeur sélectif de  $\text{ONOO}^-$ , et est un puissant piègeur d' $^1\text{O}_2$  singulet, de  $\text{HO}^\bullet$ , de peroxydes lipidiques et  $\text{HOCl}$ . Il empêche



également la lyse des érythrocytes causée par la peroxydation lipidique (**Carocho et Ferreira, 2013 ; Moussa, 2019**).

#### **b. Antioxydants non enzymatiques exogènes**

Malgré son efficacité, le système antioxydants endogène ne suffit pas en cas d'excès de production des ROS, et l'organisme humain a besoin d'antioxydants non enzymatiques exogènes qui sont apportés par l'alimentation. Ils agissent en piégeant les radicaux libres ou en captant leurs électrons célibataires pour les transformer en molécules ou ions stables (**Nmise et al., 2015**).

##### **- Les vitamines E et C**

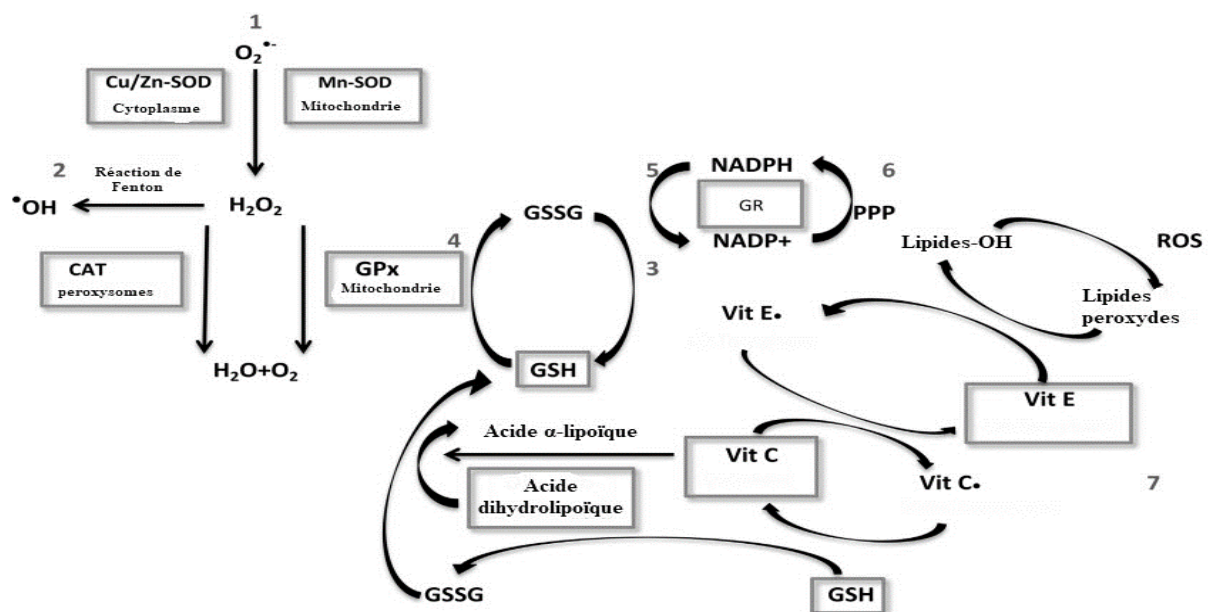
La vitamine E et la vitamine C sont des antioxydants liposoluble et hydrosoluble, respectivement. La vitamine E existe sous huit formes différentes dont la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol qui est considéré comme un puissant antioxydant reconnu pour son effet protecteur contre la peroxydation lipidique. Lors de la peroxydation lipidique, l' $\alpha$ -tocophérol est converti en radical en cédant un hydrogène labile à un radical lipide ou peroxyde qui est à son tour réduit par la vit C en vitamine E (**figure 2**) (**Ligouri et al., 2018; Tan et al., 2018**).

##### **- Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des pigments organiques naturels qui sont produits par les plantes et les algues. Ce sont les antioxydants liposolubles les plus abondants ayant la capacité de piéger particulièrement les  $\text{LOO}^\bullet$  et  $^1\text{O}_2$  (**Moussa et al., 2019**). Ils jouent un rôle crucial dans la protection des lipoprotéines et des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique. Les seuls radicaux libres qui détruisent complètement ces pigments sont les radicaux peroxydes (**Carocho et Ferreira, 2013**).

### - Les polyphénols

Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits et légumes. Ce type d'antioxydants naturels renforcent les défenses des antioxydants endogènes contre les RONS et rétablissent l'équilibre optimal en neutralisant les espèces réactives et mettent ainsi fin à la réaction en chaîne avant que la viabilité cellulaire ne soit affectée (Hussain *et al.*, 2016 ; Adwas *et al.*, 2019). La structure chimique aromatique des polyphénols permet une délocalisation électronique importante, en stabilisant les formes radicalaires ou bien en chélatant les ions métalliques (Adwas *et al.*, 2019). Ils protègent l'ADN contre les dommages induits par les radicaux  $\text{OH}^\bullet$  et inhibent la peroxydation lipidique résultant de l'attaque de différents radicaux libres (Nmise *et al.*, 2015). L'acide férulique, l'acide caféïque, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique sont connus pour protéger les LDL de l'oxydation et prévenir ainsi les maladies coronariennes et l'athérosclérose (Engwa, 2018).



**Figure 2.** Système de défense cellulaire enzymatique et non enzymatique. SOD (superoxyde ismutase) ; CAT (Catalase) ; GPx (Glutathion peroxydase). GSH (Glutathion réduite) ; GSSG (Bisulfure de glutathion) ; PPP (voie pentose phosphate) ; ROS (espèces réactives au l'oxygène) ; Vit C (Acide ascorbique) (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

## 1.2. Inflammation

L'inflammation est la première réponse des tissus face à une agression telle qu'une infection, une brûlure, une plaie...etc. C'est un processus bénéfique pour l'organisme permettant la mise en place d'une réponse immunitaire rapide pour éliminer l'agent en cause et réparer les tissus lésés (**Chen *et al.*, 2018**). Lors d'une réaction inflammatoire, le flux sanguin augmente au niveau de la zone de lésion et une multitude de médiateurs chimiques est produite (**Ashly *et al.*, 2012; Khanna *et al.*, 2014; Minihane *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018**). Les vaisseaux sanguins deviennent plus perméables, ce qui permet la migration de cellules du sang vers les tissus. Ces altérations entraînent des signes comme la chaleur, les rougeurs, l'enflure, la douleur et la perte de fonction de la zone touchée (**Nadipelly, 2017**).

### 1.2.1. Mécanismes d'inflammation

#### 1.2.1.1. Récepteurs de reconnaissance

La première étape de la cascade inflammatoire implique la reconnaissance de l'infection ou des dommages des cellules hôtes via des récepteurs transmembranaires spécifiques, appelés récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) exprimés par les cellules immunitaires et non immunitaires (**figure 2**) (**Chen *et al.*, 2018**). Les PRR sont responsables de la détection des molécules ou motifs d'origine microbiens connus sous le nom de (PAMP) comme les lipopolysaccharides (LPS), flagelline des bactéries gram-négatives, acide lipotéichoïque de bactéries gram-positives et ARN viral ; en plus d'autres molécules externes comme les allergènes et d'autres polluants. Les PRR détectent également les molécules dérivées de blessures internes appelées les motifs moléculaires associés aux dégâts ou aux dangers (DAMP) telles que les molécules intracellulaires (les protéines de choc thermique, les protéines S-100, la protéine HMGB1 (High mobility group box 1), l'ATP et l'ADN et les molécules extracellulaires (les peptide dérivé du collagène, la fibronectine,

l'acide hyaluronique... ect) (Ashley *et al.*, 2012 ; Lugin *et al.*, 2014; Mihai *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018).

Il existe plusieurs familles de PRR transmembranaires tel que les Récepteurs de type Toll (Toll-like receptors : TLR), les récepteurs de lectine de type C (CLR), les récepteurs du gène inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I-like receptor RIG : RLR), les récepteurs intracellulaires de type NOD (NOD-like receptors : NLR), et plus récemment, les récepteurs HIN-200 (Afsal, 2011 ; Mihai *et al.*, 2018).

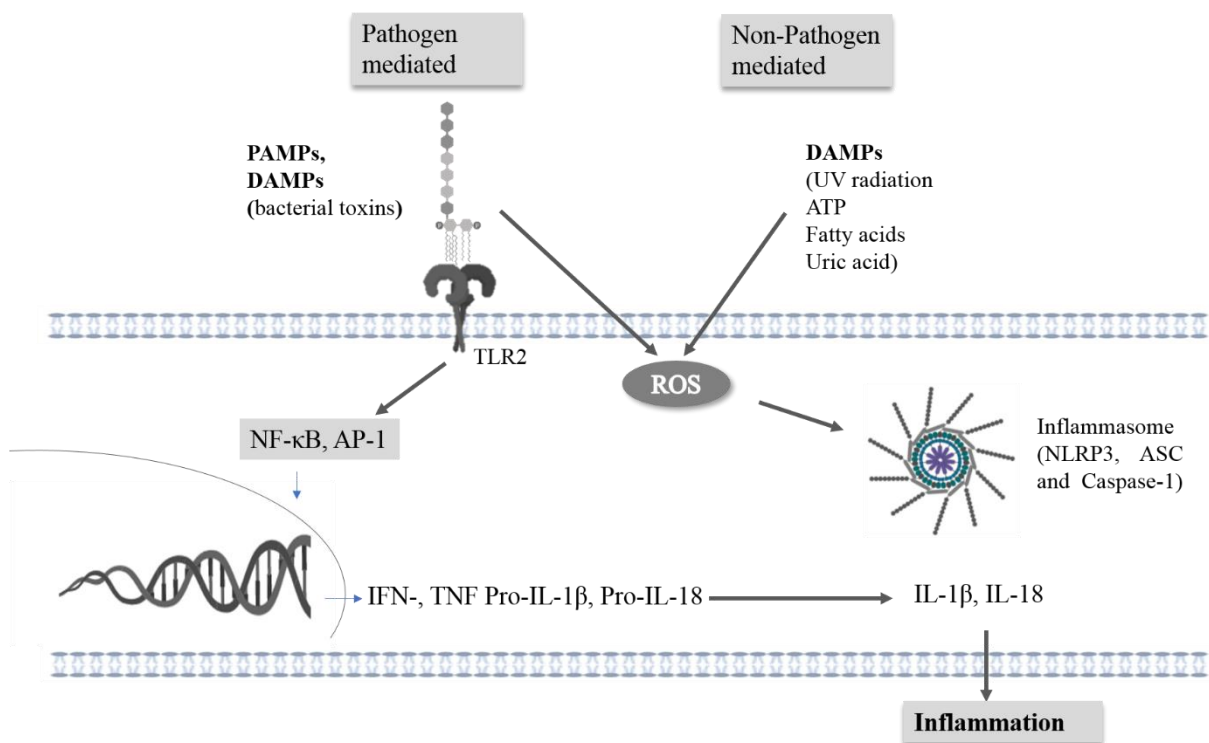
### 1.2.1.2. Transduction de signal

Une fois la reconnaissance des ligands effectuée, les PRR , tel que les récepteurs TLR, activent des voies de signalisation intracellulaires importantes comme celle des Mitogen-activated protein kinases (MAPK), le facteur nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B), la voie de protéines Janus kinases (JAK), les transducteurs de signaux et activateurs de transcription STAT. La voie la mieux caractérisé est celle du NF- $\kappa$ B (Ashley *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2018).

Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription primaire à action rapide et c'est le premier facteur identifié avec une séquence de liaison spécifique à l'ADN, induit uniquement par un stimulus approprié (Afsar, 2011). Pour cette raison, le NF- $\kappa$ B est parmi les premiers à répondre aux stimuli cellulaires et exogènes, notamment les antigènes bactériens ou viraux, la phyto-hémagglutinine, les cytokines, l'irradiation ultraviolette, les rayonnements ionisants, et les LDL oxydés (Benedetti *et al.*, 2017). Le stress oxydant ou le statut redox intracellulaire est également impliqué dans l'activation de l'NF- $\kappa$ B en particulier le peroxyde d'hydrogène (Biswas, 2016). Le NF- $\kappa$ B existe dans un état inactivé lié à une protéine inhibitrice I $\kappa$ B. Lors de la transduction du signal, ce facteur est libéré d' I $\kappa$ B et est transloqué vers le noyau, où la transcription est régulée par la liaison aux gènes cibles (Figure 3) (Ashley *et al.*, 2012 ; Biswas, 2016). La transcription et la traduction des gènes conduisent au troisième stade de la cascade inflammatoire caractérisé par l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que

l'interleukine-1-bêta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ). Ces derniers accélèrent rapidement la progression de l'inflammation par la modification de la perméabilité endothéliale vasculaire en induisant l'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM. Ils facilitent aussi le recrutement des cellules effectrices qui contribuent à la réponse inflammatoire (Afsar, 2011 ; Benedetti *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2018).

Les NLR intracellulaires répondent à l'augmentation des DAMP et activent l'inflammasome (figure 3), celui-ci active à son tour la caspase-1 pour convertir les cytokines en formes actives (IL-1 $\beta$  et IL-18), provoquant alors une inflammation après leur libération de la cellule (Ashley *et al.*, 2012).



**Figure 3.** Déclenchement de l'inflammation et activation de l'inflammasome. DAMP (les motifs moléculaires associés aux dégâts ou aux dangers) ; PAMP (motifs d'origine microbiennes connus sous le nom de) ; ROS (espèces réactives au l'oxygène) ; NLR (les récepteurs intracellulaires de type NOD) (Chaterjee, 2016).

### 1.2.1.3. Médiateurs inflammatoires

L'inflammation est médiée par de nombreux médiateurs inflammatoires qui jouent un rôle important dans la régulation de diverses réactions du processus inflammatoire. Les médiateurs chimiques libérés comprennent : 1) les amines vasoactives telles que l'histamine et la sérotonine. L'histamine est libérée en petites quantités par les basophiles pour maintenir la réponse en phase aiguë pendant le processus inflammatoire et agit comme un élément chimiotactique pour les neutrophiles, et régule la synthèse des cytokines dans certains processus d'inflammation tels que les allergies. 2) les peptides tels que la bradykinine peuvent augmenter la synthèse des prostaglandines et causer localement la douleur. 3) les eicosanoïdes tels que les thromboxanes, les leucotriènes et les prostaglandines produite par la lipoxigénase et la cyclooxygénase (métabolites des acides gras insaturés en C20 tels que l'acide arachidonique résultant de la dégradation de la bicouche membranaire par la phospholipase A2), jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire. Les prostaglandines peuvent favoriser la perméabilité vasculaire et renforcer l'effet des médiateurs inflammatoires tels que la kinine, la sérotonine et l'histamine et ainsi contribuer à la rougeur. Les cytokines pro-inflammatoires constituent une autre classe de médiateurs inflammatoires et ont des effets importants dans la régulation du système immunitaire. Les cytokines telles que les interleukines ont un effet puissant sur les cellules hépatiques et sont capable de les stimulés à produire une classe des protéines nommées les protéines de la phase aiguë comme le composant C3 du complément, la protéine C-réactive (CRP), l'haptoglobine, le fibrinogène et la protéine de liaison au mannose (MBP). La CRP et la MBP sont des protéines centrales au cours de la phase aiguë qui fonctionnent comme des opsonines pour aider les phagocytes à identifier les agents pathogènes (Abdulkhaleq *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2018 ; Nunes, 2020).

Dans le site inflammatoire, les phagocytes sont la forme prédominante de leucocytes destinés à nettoyer le site de la blessure, détruire les bactéries et les éléments étrangers, et

éliminer les débris cellulaires produits pendant la progression de la blessure. Les neutrophiles sont la première classe des globules blancs impliqués dans l'inflammation en cas de dommages locaux et faibles, circulant en quantité suffisante. Cependant, des neutrophiles générés par la moelle osseuse sont constamment sollicités pour agir au niveau du site lésé en tant qu'agents précoces dans le cas des dommages importants. Les monocytes sont également présents dans la zone inflammée (**Abdulkhaleq et al., 2018 ; Nunes, 2020**).

#### 1.2.1.4. Résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est une phase au cours de laquelle les agents nuisibles qui ont déclenché la réponse inflammatoire sont éliminés. Ce qui conduit à la restauration de l'homéostasie et la fonction des tissus. Les cytokines telles que l'IL-4, IL-10 et IL-12 en faibles concentrations sont de puissants facteurs anti-inflammatoires qui régulent la réponse inflammatoire aiguë en stabilisant I $\kappa$ B qui bloque l'activation du facteur NF- $\kappa$ B (**Ward, 2010**), inhibant ainsi la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires. Dans ce processus, tous les médiateurs pro-inflammatoires sont efficacement antagonisés et catabolisés, arrêtant ainsi le recrutement de PMN et la formation d'œdèmes (**Fullerton et Gilroy, 2016**). De plus, les enzymes antioxydants telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase neutralisent les radicaux libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•</sup>) générés au cours de la réponse inflammatoire. Les prostaglandines et les leucotriènes sont remplacées par les lipoxines et les résolvines qui ont des actions anti-inflammatoires très puissantes, tandis que les kinines telles que la bradykinine sont hydrolysées par les kininases (**Ward, 2010**). Les cellules immunitaires sont éliminées des tissus et les leucocytes inflammatoires peuvent réintégrer la circulation systémique. De nombreux PMN, des éosinophiles et des lymphocytes subissent ensuite une apoptose ou une nécrose locale, ou bien sont éliminés par éférocytose. Au cours de ce processus, les neutrophiles apoptotiques sont rapidement engloutis par les macrophages.

Ensuite, les macrophages peuvent quitter le site d'inflammation, mais une petite population peut subir une apoptose locale (Fullerton et Gilroy, 2016 ; Schett & Neurath, 2018).

### 1.2.2. Types d'inflammation

Il existe deux types différents d'inflammation : aiguë et chronique, en fonction de la durée de leur processus ainsi que divers facteurs immunitaires (figure 4).

#### 1.2.2.1. Inflammation aiguë

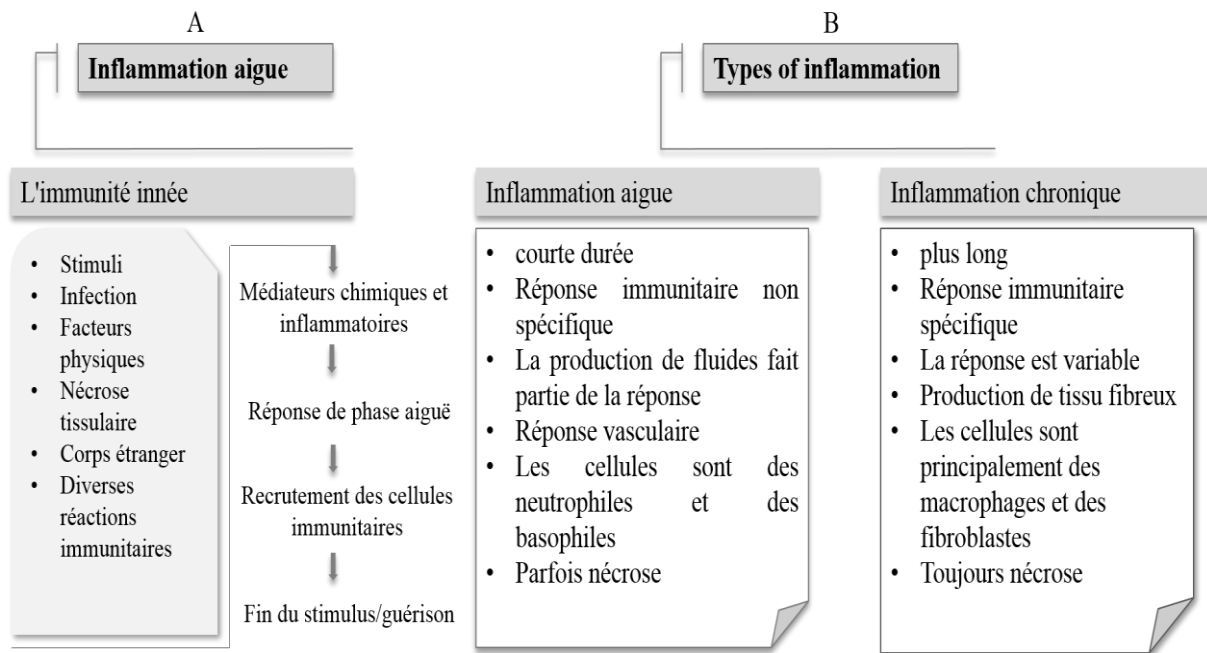
La réponse inflammatoire aiguë est initiée dans les premières minutes qui suivent la reconnaissance d'un signal de danger (presque immédiat) (Figure 4), et ce processus dure de quelques minutes à quelques jours, puis diminue progressivement. Elle est caractérisée par les quatre signes d'inflammation accompagnés d'une infiltration par des neutrophiles activées (transmigration via les molécules d'adhésion : P-sélectine, E-sélectine et ICAM-1) (Ward, 2010 ; Yasutomo, 2016). Dans la plupart des cas, les changements survenus au cours de la réponse inflammatoire aiguë sont réversibles. Dans ce cas, il y a remplacement des cellules endommagées par une architecture qui ressemble au tissu d'origine non blessé (par exemple : blessure au foie). Dans d'autres tissus comme le myocarde, les tissus détruits doivent être renouvelés rapidement. Etant donné que la capacité de régénération du myocarde est très limitée, cela peut mener à une rupture cardiaque et un remplissage de la cavité péricardique par le sang (Ward, 2010).

#### 1.2.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique dans les tissus se produit généralement lorsque les réponses inflammatoires surviennent en l'absence d'un stimulus réel (figure 4). Cela peut arriver lors d'infections par des agents microbiens résistants aux défenses de l'hôte, ou bien des expositions continues à certains agents physiques ou chimiques (ward, 2010 ; Arulselvan *et al.*, 2016). Une inflammation aiguë récurrente ou bien lorsque la résolution de l'inflammation



aigue échoue pour une raison quelconque, l'inflammation aiguë persiste et se transforme en stade chronique (**Fullerton et Gilroy, 2016 ; Antonelli et Kushner, 2020**). Le début de l'inflammation chronique est souvent caractérisé par le remplacement des neutrophiles par des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes (transmigration en interagissant avec VCAM) (**Ward, 2010**), donc par l'engagement de réponses immunitaires innées et acquises. Ce phénomène n'est pas accompagné par les signes classiques de l'inflammation et se manifeste par une réponse protéique de la phase aiguë avec des niveaux presque normaux de CRP (**Ashly et al., 2012 ; Antonelli & Kushner, 2020**). L'inflammation chronique est caractérisée par une réaction prolongée avec des régions fibreuses globales ou dispersées, durant des mois et des années (**ward, 2010 ; Yasutomo, 2016**). Les principaux dommages causés à l'hôte sont médiés par la réponse inflammatoire elle-même et non pas par les envahisseurs étrangers tels que les agents pathogènes. De ce fait, elle est impliquée dans plusieurs maladies telles que la maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus Host disease ; GVHD), l'asthme allergique, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, les troubles neuro-inflammatoires (jouent un rôle majeur dans le développement de la maladie d'Alzheimer), la sclérose en plaques, l'uvéite, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. L'inflammation chronique peut aussi prédisposer au cancer dans environ 20% des cas chez l'homme (**Arulselvan et al., 2016 ; Hussain et al., 2016 ; Neurath, 2019**), comme c'est le cas de l'inflammation pancréatique qui peut jouer un rôle clé dans le développement précoce de la malignité pancréatique (**Sesti et al., 2012**).



**Figure 4.** Classification de l'inflammation par durée et fonctions immunitaires.  
A : Inflammation aigue; B : type d'inflammation (Arulselvan *et al.*, 2016).

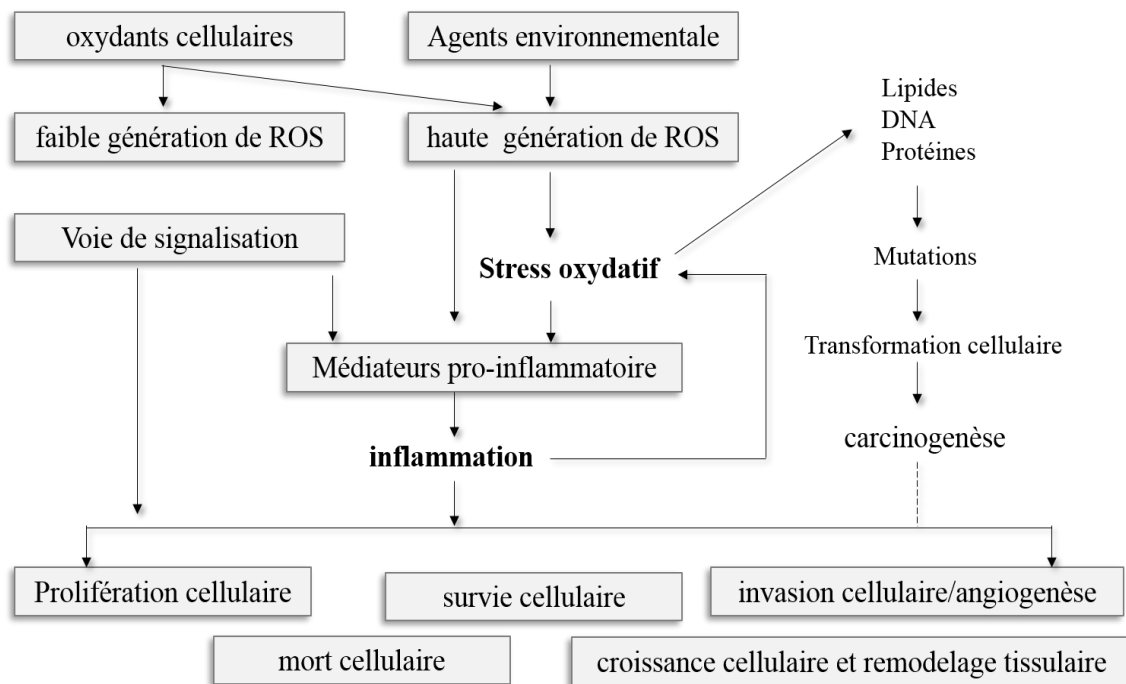
### 1.2.3. Interrelation inflammation-Stress oxydant

L'inflammation et le stress oxydant sont des processus physiopathologiques indépendants et étroitement liés (**figure 5**). Les facteurs qui provoquent l'inflammation et son amplification conduisent au stress oxydant, et vice versa (**Chatterjee, 2016**). Ils contribuent tous les deux à de nombreuses maladies chroniques comme les complications du diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, les maladies hépatiques et rénales chroniques (**Biswas *et al.*, 2016**).

Les ROS tels que  $H_2O_2$  sont capables d'induire l'inflammation en activant la voie inflammatoire du NF- $\kappa$ B qui mène à l'expression de plusieurs gènes codant des protéines inflammatoires (**Chatterjee, 2016 ; Biswas *et al.*, 2016 ; San *et al.*, 2018**). Les RONS peuvent également activer d'autres cellules inflammatoires conduisant à une production accrue des radicaux libres tels que le  $NOO^{\cdot}$  responsable de la nécrose cellulaire et associé à la libération de grandes quantités de HMGB1. La molécule HMGB1 est une molécule DAMP qui déclenche l'inflammation par interaction avec TLR (**Lugrin *et al.*, 2014**). Les oxydants

dérivés du MPO comme l'hypochlorite sont également indirectement impliqués dans l'exacerbation de l'inflammation et des lésions pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique. L'ADN mitochondrial oxydé par les radicaux libres peut aussi activer le complexe NLRP3 qui constitue l'inflammasome, conduisant à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et une inflammation localisée (**Lugrin *et al.*, 2014 ; Biswas *et al.*, 2016**).

La génération exagérée d'espèces réactives au cours de la réponse inflammatoire et leur diffusion hors des cellules phagocytaires, peuvent également induire des lésions tissulaires dans le site inflammatoire. Ainsi, les cellules non phagocytaires peuvent aussi produire des espèces réactives en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine IL-6 dans le cas de cancer du poumon. Cette interleukine provoque une expression accrue de la NADPH oxydase 4 (NOX4) qui provoque une surproduction des ROS (**Biswas *et al.*, 2016**). De plus, l'angiotensine II et le TNF- $\alpha$  (facteurs pro-inflammatoire) peuvent aussi activer le NADPH oxydase et une surproduction des ROS. Ce qui augmente le stress oxydant, entraînant une réponse inflammatoire qui propage davantage cet état oxydatif et vice versa (**San *et al.*, 2018**).



**Figure 5.** Interaction entre les ROS, le stress oxydatif, l'inflammation et la physiologie/la pathologie cellulaire (Chatterjee, 2016).

## 2. Composés phénoliques et huiles essentielles

Les études sur les métabolites secondaires des plantes ont connu un regain d'intérêt au cours de ces dernières années, en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Rasouli *et al.*, 2017). Ils ont un rôle essentiel dans l'adaptation des plantes à leur environnement et sont également une source importante de composés bioactifs ayant fourni la base scientifique de l'usage des plantes à des fins médicales, qui est une pratique ancestrale retrouvée dans toutes les civilisations à travers le monde (Hussein & El-Anssary, 2018). Les métabolites secondaires sont subdivisés selon leurs structures chimiques en plusieurs classes notamment les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes et les huiles essentielles.

### 2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes

hydroxyyles. Ces molécules sont les plus abondantes chez les végétaux, notamment dans les fruits et les légumes, les graines, les fleurs et les écorces des arbres (**Cutrim & cortez, 2018**). Ces composés jouent un rôle majeur dans l'attraction des pollinisateurs, la protection des plantes contre les rayons ultraviolets, les herbivores et les invasions microbiennes (**Yahfoufi et al., 2018**). Cette famille de composés est très diversifiée et comprend plusieurs groupes, classés en fonction de leurs structures chimiques en flavonoïdes et non-flavonoïdes. Les non-flavonoïdes comprennent les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes et d'autres polyphénols (**Moga et al., 2016 ; Tan et al., 2018**).

### 2.1.1. Polyphénols non flavonoïdes

#### 2.1.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C1–C6) et les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C3–C6) (**figure 6**). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (e. g : acide gallique et ellagique) sont très rare dans l'alimentation humaine comparé aux dérivés de l'acide hydroxycinnamique (e. g : acide coumarique, caféique, férulique et sinapique). Certains acides phénoliques se trouvent sous forme libre dans les légumes et les fruits, et sous forme liée dans les fibres et les graines (**Taso, 2010 ; Abbas et al., 2017**).

#### 2.1.1.2. Autres composés non flavonoïdes

En plus des acides phénoliques, il existe d'autres composés phénoliques non-flavonoïdes importants pour la santé humaine et parmi lesquels :

Les **stilbènes** qui ont une structure en C6-C2-C6 et sont des phytoalexines produites par les plantes en réponse aux blessures et infections (**figure 6**). Ils sont présents dans l'alimentation humaine en faibles quantités comme le resvératrol, un composé abondant dans les raisins et le vin rouge (**Moga et al., 2016 ; Mrduljaš et al., 2017**).

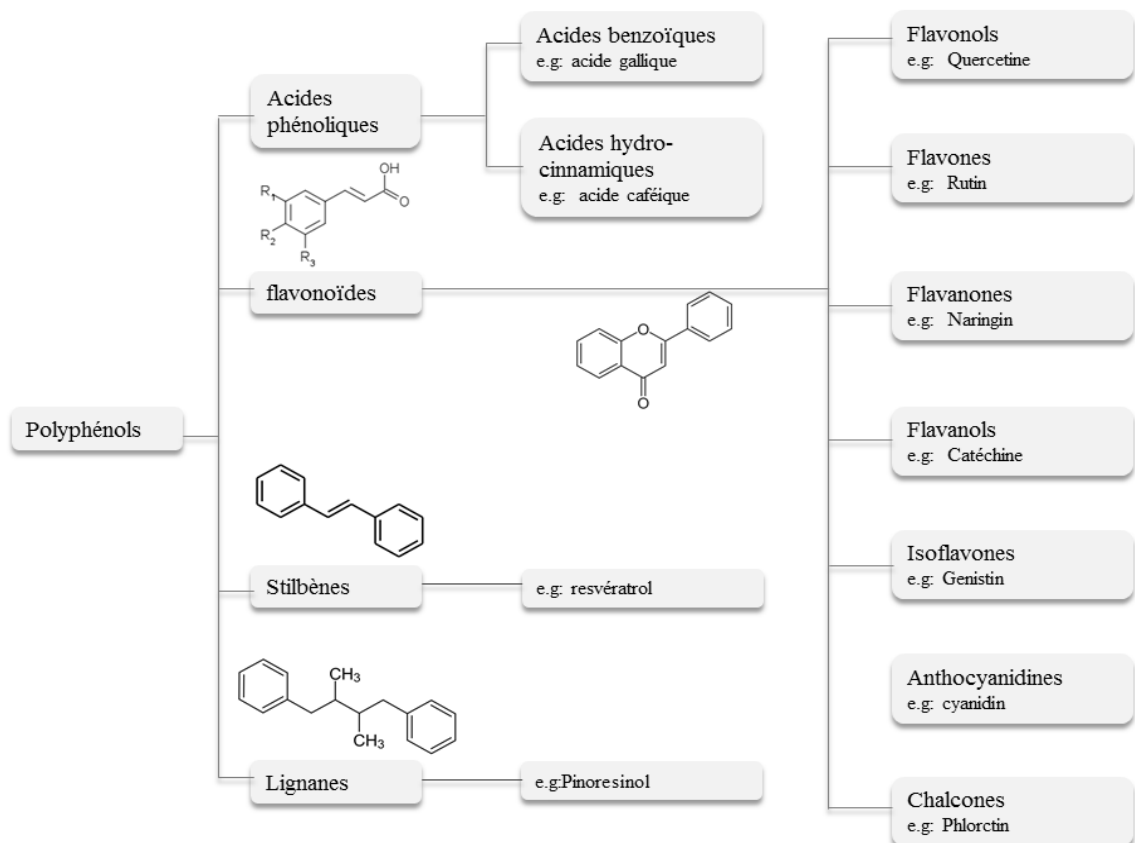
Les **lignines** sont les principaux composants du bois, composés des dimères formés essentiellement par la condensation d'unités de phénylpropanes (C6-C3) conduisant à de nombreuses structures chimiques différentes présentes sous forme de glycosides (**figure 6**) (**Mrduljaš et al, 2017 ; Hussein & El-Anssary, 2018**). La plus grande quantité de ces composés se trouve dans les graines de lin, et d'autres sources comme les céréales et certains légumes.

Les **tanins** regroupent des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines. Les tanins sont utilisés par l'homme depuis l'antiquité pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. On distingue 2 groupes de tanins différents par leurs structures : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucose de l'acide ellagique ou gallique. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) et possèdent des propriétés anti-nutritionnelles (**Taso, 2010**). A la différence, les tanins non hydrolysables sont des dimères, des oligomères ou des polymères de flavonoïdes, spécifiquement des flavan-3-ols (catéchol ou épicatechol) et/ou de flavan-3,4-diols (proanthocyanidols).

### 2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le groupe le plus abondant des composés phénoliques, possédant des structures chimiques variées et considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils présentent le même squelette de base C6-C3-C6 (système cinnamoyle), formé de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un pont à trois atomes de carbone (cycle C) (**figure 6**). Généralement, le noyau B est lié à la position 2 du noyau C, mais certains d'entre eux sont attachés aux positions 3 ou 4. Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. Ces composés se distinguent par le nombre, la position et la nature des

substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. Majoritairement, ces composés sont des pigments hydrosolubles existant sous forme d'hétérosides portant un ou plusieurs résidus osidiques liés en position C3, ou lipophiles (aglycones) (Taso, 2010 ; Moga *et al.*, 2016 ; Abbas *et al.*, 2017 ; Tan *et al.*, 2018).



**Figure 6.** Classification et structure de base des composés phénoliques (Carocho et Ferreira, 2013).

### 2.1.3. Propriétés des composés phénoliques

L'activité antioxydante est la principale activité des polyphénols et peut être exercée par plusieurs mécanismes tels que la neutralisation directe des radicaux libres, la chélation des métaux de transition impliqués dans leur génération et par la surexpression des éléments du système de défense antioxydants (SOD, CAT, GSH). Certains polyphénols comme la quercétine peuvent même supprimer la formation des ROS par inhibition des enzymes qui les génèrent comme la NOS et la xanthine oxydase (XO) (**Hussain *et al.*, 2016 ; Adwas *et al.*, 2019**). En supprimant le stress oxydant, les composés phénoliques jouent un rôle important dans la prévention de nombreuses maladies chroniques comme l'athérosclérose, le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de fatigue chronique et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (**Liguori *et al.*, 2018**). Les polyphénols possèdent également des propriétés anti-inflammatoires qui s'expriment par l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, des médiateurs pro-inflammatoires et des enzymes pro-inflammatoires comme le MPO (**Asakura & Kitahora, 2018**). Ce qui leur donne la capacité de combattre plusieurs maladies inflammatoires comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. L'activation du facteur de transcription Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 (Nrf2) par les polyphénols joue un rôle clé dans la protection cellulaire contre le stress oxydant et l'inflammation (**Hussain *et al.*, 2016**). Une alimentation riche en polyphénols (thé, légumes, fruits et cacao) peut prévenir les maladies cardiovasculaires, retarder l'apparition de la maladie d'Alzheimer et réduire également les occurrences de la maladie de Parkinson et du vieillissement (**hussain *et al.*, 2016**). La consommation des fruits et légumes riches en polyphénols peut aussi prévenir le développement du cancer, en particulier dans le tractus gastro-intestinal (cancer du côlon).



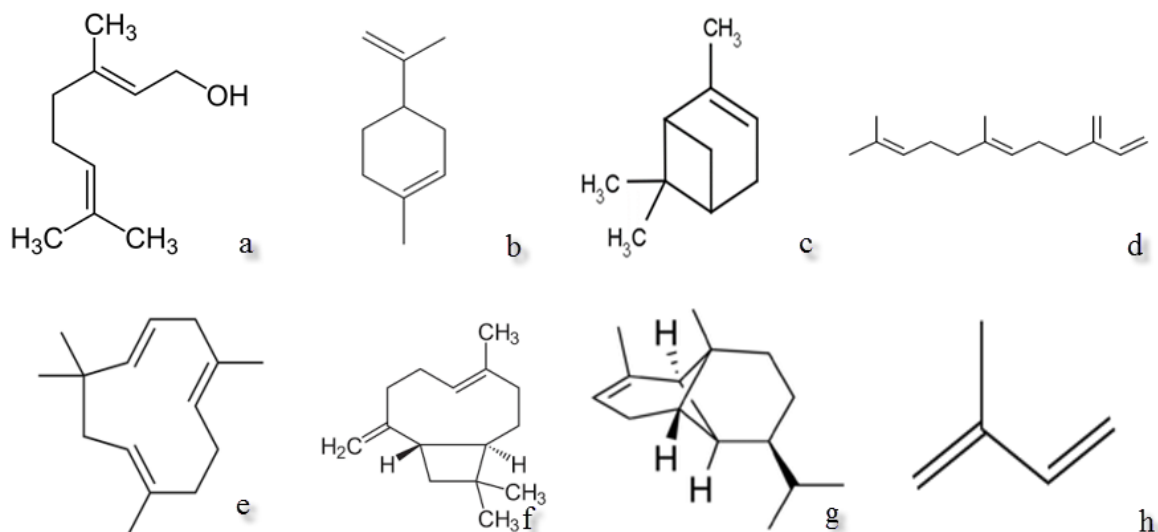
## 2.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des métabolites secondaires, connue par leurs diversités, propriétés biologiques et usages en thérapeutique. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits. Dans la plupart des cas, la teneur totale en huiles essentielles est très faible et dépasse rarement les 1%. Ce sont des substances hydrophobes, solubles dans l'alcool, les solvants organiques, les cires et les huiles non polaires ou faiblement polaires, mais peu solubles dans l'eau (Djilani et Dicko, 2012). Certaines espèces peuvent contenir environ 20 à 60, même plus de 100 composés individuels dans leurs huiles essentielles. Ces composés sont distribués dans les familles des *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae* et *Verbenaceae*. Ils sont utilisés comme des agents anti-inflammatoires, antioxydants et antimicrobiens (Elshafie & Camele, 2017). La composition chimique des HE est principalement représentée par les monoterpènes (C10 : deux unités isoprène) et les sesquiterpènes (C15 : trois unités isoprène), les hydrocarbures et les dérivés oxygénés, ainsi que les aldéhydes aliphatiques, les alcools ou bien les esters.

### 2.2.1. Mono et sesquiterpènes

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont connus comme des métabolites secondaires dérivant du précurseur isoprénique à cinq carbones, et représentent les constituants majeurs des huiles essentielles. Les monoterpènes sont constitués de deux unités d'isoprène (10 atomes de carbone) ayant une formule moléculaire :  $C_{10}H_{16}$  (figure 7.h) et peuvent être divisés en composés acycliques (figure 7.a), monocycliques (figure 7.b) et bicycliques (figure 7.c). Ces molécules sont très utilisées dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique en raison de leur arôme et forte odeur. La plupart de ces composés sont biologiquement actifs et sont considérés comme les agents antimicrobiens les plus efficaces. D'autre part, les sesquiterpènes, sont caractérisés par l'association de trois unités isopréniques ( $C_{15}H_{24}$ ) sous forme linéaire (figure 7.d), cyclique (figure 7.e), bicyclique (figure 7.f) et

tricyclique (**figure 7.g**), ce sont de puissants agents antimicrobiens et insecticides (**Djilani & Dicko, 2012 ; Perveen, 2018**).



**Figure 7.** Unité isoprénique (h) et quelques structures des mono et sesquiterpènes : **a** : géraniol ; **b** : limonène ; **c** :  $\alpha$ -pinène ; **d** : Farnésène ; **e** : Humulène ; **f** : caryophyllène ; **g** : copaène, (**Djilani, & Dicko, 2012**).

### 2.2.2. Propriétés des huiles essentielles

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre ces composants. Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés afin de soigner ou prévenir certaines pathologies, et aussi dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie. Les huiles essentielles possèdent différentes propriétés, comme les propriétés antiseptiques, antimicrobiennes, analgésiques, sédatives, anti-inflammatoires, spasmolytiques et localement anesthésiques. Elles sont également utilisées dans la conservation des aliments (**Hussein et El-Anssary, 2018**). Les hydrocarbures contenus dans les huiles essentielles (le pinène, le sabinène, le cymène, le myrcène) ont été associés à diverses activités thérapeutiques : antivirale, antitumorale, décongestionnante, antibactérienne et hépatoprotectrices. D'autres composés comme le linalol possède des effets anti-inflammatoires,

expectorant et stimulant ; alors que les phénols tels que le thymol, l'eugénol et le carvacrol ont un effet antimicrobien, spasmolytique, anesthésique et immunostimulant (**Djilani & Dicko, 2012**).

### 3. Plantes d'intérêt

#### 3.1. La famille des Lamiaceae

La famille des Lamiacées connue également sous le nom des Labiées, comprend environ 258 genres et plus de 6000 espèces. Ce sont des plantes odorantes et herbacées à tige quadrangulaire pouvant devenir des arbrisseaux, leurs feuilles sont opposées par 2 et leurs fleurs sont bisexuées. C'est est une famille importante dont plusieurs espèces sont des plantes aromatiques très appréciées pour leurs vertues médicinales et parmi les genres les plus importants : *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Nepeta* et *Thymus*. (**Carović-Stanko et al., 2016**). Les espèces de cette famille sont très diversifiées ayant une distribution cosmopolite et dont la plupart comme la lavande, le romarin, le thym et les sauges qui forment le genre *Salvia* se concentrent dans le bassin méditerranéen (**Carović-Stanko et al., 2016**).

Dans la présente étude, notre choix c'est porté sur deux espèces appartenant à cette famille : *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca*, sur la base de leur chimio-taxonomie (composition chimique et activités biologiques des espèces du même genre) et leurs ethnopharmacologie (utilisation traditionnelle de ces plantes médicinales).

#### 3.2. *Thymus algeriensis* Boiss et Reut

##### 3.2.1. Description

*Thymus algeriensis* est une espèce endémique de l'Afrique du nord très répandue en Algérie, Tunisie, Maroc et Lybie (**Ben El Hadj Ali et al., 2010 ; 2012**), caractérisée par une forte odeur aromatisante très agréable. Elle peut atteindre 20 à 50 cm de hauteur et possède

des petites feuilles opposées et linéaires ou lancéolées de 6 à 12 mm, des petites fleurs de 5 à 7 mm avec des bractées ovales et une corolle rose violacée (**figure 8**). C'est une espèce vivace dont la floraison a lieu entre avril et juin.



**Figure 8.** *Thymus algeriensis* au stade de floraison (**Righi, Taglait, Bordj Bou Arerridj, 2017**).

### 3.2.2. Classification systématique

La classification botanique de l'espèce *Thymus algeriensis* selon **Quezel et Santa (1963)** est représentée dans le **tableau 2** :

**Tableau 2.** Classification botanique de *T. algeriensis*

<b>Embranchement</b>	<b>Spermaphytes</b>
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Eudicotes
<b>Sous classe</b>	Astérides
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thymus algeriensis</i> Boiss. & Reut
<b>Nom commun</b>	Hamra rass (حمراء الرأس), Zaitra (الزعيرة). Thym

### 3.2.3. Usages traditionnels

*Thymus algeriensis* est couramment utilisée fraîche ou sèche à des fins culinaires comme épice. En médecine traditionnelle, cette plante est connue pour ces vertues médicinales dans le traitement des troubles respiratoires, contre l'avortement, et ses propriétés antispasmodiques qui en font un bon remède pour soigner les troubles gastro-intestinaux (**Giweli et al., 2013 ; Ziani, 2019**). Elle est également utilisée dans le traitement de plusieurs maladies infectieuses, la dysentérie, la diarrhée, le rhume et l'adénome de la prostate (**Ziani et al., 2019**). Cette plante agit comme un stimulant pour la circulation sanguine et est un aphrodisiaque (**Benkiniouar et al., 2007**).

### 3.2.4. Composition chimique

Etant donné l'importance médicinale, culinaire et économique de cette espèce, plusieurs études se sont intéressées à sa composition chimique. Les études phytochimiques ont rapporté la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des flavonols et des huiles essentielles. **Ziani et al. (2019)** a rapporté la présence d'apigénine-6,8-C-dihexoside, de lutéoline-7-O-glucuronide, d'acide rosmarinique, et d'acide salvianolique B. Cette plante aromatique riche en huiles essentielles a suscité plus l'attention des chercheurs pour déterminer la composition chimique et ses activités biologiques (**Giwali et al., 2013 ; Guesmi et al., 2014 ; Guesmi et al., 2017 ; Bendjabeur et al., 2018**). Cela a permis de montrer une variation dans la composition de cette plante d'une région à une autre et même au sein de la même région (**Haziit et al., 2009**) et par conséquent ses huiles essentielles sont classées en différents chémotype notamment les huiles riches en Thymol,  $\alpha$ -Pinène, Camphre, 1,8-Cineole, Terpinène-4-ol (**Haziit et al., 2009 ; Guesmi et al., 2014 ; Bendjabeur et al., 2018**).

### 3.3. *Salvia verbenaca* L.

#### 3.3.1. Description

*Salvia verbenaca* est un arbuste de courte durée de vie caractérisée par une tige dressée de 0.15 à 0.4 m de hauteur, une racine pivotante ligneuse et des feuilles brièvement pétiolées (**figure 9**). Ses fleurs sont espacées en dessous et plus denses au-dessus, de couleur allant du bleu clair au violet dont la lèvre inférieure est généralement légèrement plus courte, et ses fruits sont à coque contenant 1 à 4 graines. La floraison commence à mi-avril et se termine vers la fin de mois de Mai (**Quezel et Santa, 1963 ; Canzoneri et al., 2015**). Cette espèce est une plante indigène dans les pays du pourtour méditerranéen et des îles Canaries et s'est également répandu plus loin en Europe et en Asie (**Afzal-Rafii, 1979 ; Ben Farhat et al., 2015 ; Canzoneri et al., 2015**).



**Figure 9.** *Salvia verbenaca* L. en pleine floraison (**Righi, Bordj Bou Arerridj, 2017**).

#### 3.3.2. Classification systématique

La classification botanique de l'espèce *Salvia verbenaca* selon **Quezel et Santa (1963)** est représentée dans le **tableau 3** :

**Tableau 3.** Classification botanique de *S. verbenaca*.

<b>Embranchement</b>	Spermatophyta
<b>Sous-embranchement</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Salvia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Salvia verbenaca</i>
<b>Nom commun</b>	Sauge verveine, Sauge fausse-verveine, Zargtoun (الزرقطون), خياطة الجراح (Yabrir <i>et al.</i> , 2018)

### 3.3.3. Usages traditionnels

Les feuilles de *S. verbenaca* sont consommées comme des légumes ou utilisées pour préparer des soupes ou des tisanes (Allen & Hatfield, 2004 ; Guarrera & Savo, 2016). Cette plante est traditionnellement utilisée pour la cicatrisation des plaies et dans le traitement des piqûres d'insectes (Di Tizio *et al.*, 2012), des infections respiratoires (Canzoneri, 2011) et des problèmes auditifs. Les graines de cette plante sont utilisées comme nettoyant pour les yeux pour soigner les problèmes oculaires (Allen & Hatfield, 2004 ; González *et al.*, 2010) et les huiles essentielles comme agents antibactériens (Ben Taarit *et al.*, 2010). Les feuilles fraîches mâchées ou en décoction sont un remède efficace pour les calculs rénaux.

### 3.3.4. Composition chimique

Des travaux antécédents sur *Slavia verbenaca* ont mis en évidence la présence d'acides phénoliques (acide gallique, caféique, *p*-coumarique et rosmarinique), de flavanones (naringénine et naringine), de flavones (lutéoline, apigénine et genkwanine) et d'une flavone glycosylée (apigénine-7-glucoside). Les huiles essentielles sont caractérisées par la présence du viridiflorol, camphène, méthyleugénol, b-caryophyllène, tricyclène, terpinolène, b-thujone et alpha-pinène (Ben taarit *et al.*, 2010).

# **Chapitre II**

## **Matériel Et Méthodes**



## Chapitre II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Thymus algeriensis* Boiss& Reut et de *Salvia verbinaca* L. ont été collectés à Taglait, Bordj Bou Arreridj (Est de l'Algérie : 35 ° 46 ' 18 " nord, 4 ° 59 ' 59 " est) en avril 2017. Le matériel végétal a été identifié par **Dr. Sari** de l'Université de M'sila (Algérie) selon **Quezel et Santa (1963)**. Un spécimen de référence AB-109 et AB-84 pour *T. algeriensis* et *Salvia verbinaca*, respectivement, a été déposé à la collection personnelle du **Pr. Boudjelal A.** à la faculté des Sciences à l'Université de M'sila (Algérie). Les plantes une fois récoltées sont nettoyées, séchées à l'obscurité à température ambiante pendant au moins 15 jours, puis réduites en poudre avant le processus d'extraction.

### 2. Produits chimiques

Le méthanol, l'acétonitrile et l'acide formique sont de qualité HPLC et fournis par Lab-Scan (Lisbonne, Portugal). Tous les autres produits chimiques utilisés sont également de haute qualité analytique obtenus auprès de Sigma-Aldrich.

### 3. Animaux

Des souris *Swiss albino* mâles et femelles pesants entre 25 et 30 g ont été achetés auprès de l'institut Pasteur (Algérie). Les souris ont été placés dans une animalerie à température ambiante, soumis à des cycles naturels de lumière et d'obscurité. Les souris sont adaptées aux conditions du laboratoire au moins 10 jours en ayant accès libre à la nourriture et l'eau avant de réaliser toute expérience.

#### 4. Préparation des extraits

L'extraction solide-liquide est la procédure la plus courante pour analyser les fractions phénoliques d'origines végétales, en raison de sa simplicité, de son efficacité élevée et de sa facilité. Les composés phénoliques sont extraits de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* en utilisant un mélange hydro-alcoolique selon le protocole décrit par **Markham (1982)**. 100 g de poudre végétale sont macérés dans 1 L de solution hydrométhanolique (85 : 15, v/v) pendant 24 heures. Après filtration sur papier filtre (n° 102, diamètre moyen 150 mm), le résidu végétal est soumis à une deuxième macération en utilisant un mélange hydrométhanolique (50 : 50, v/v) pendant 24 heures supplémentaires. Les deux filtrats sont mélangés et le méthanol est éliminé à basse pression à 40 °C en utilisant un rotavapor. Les extraits bruts de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* obtenus sont ensuite séchés et conservés jusqu'à leurs utilisations.

La séparation des composés phénoliques à partir des extraits bruts est effectuée par chromatographie sur colonne en utilisant des cartouches Sep-Pak C18 (5 g, Waters, Milford, MA, USA). L'extrait brut est d'abord mis en suspension dans une solution d'acide acétique à 97.5 % avec un rapport de 1 :5 (p/v ; mg/mL) et centrifugé à 20 000 g. Le surnageant est ensuite fractionné par extraction en phase solide, des cartouches préalablement activées avec du méthanol, de l'eau et préconditionnées avec de l'eau/acide acétique 97.5 %. L'élution des composés hydrophiles est réalisée avec 100 mL d'acide acétique 97.5 %, puis les composés hydrophobes ont été récupérés avec un éluant d'un mélange méthanol/acide acétique (97.5 : 2.5, v/v). La matière retenue constitue la fraction des composés phénoliques, est éluee, concentrée sous pression réduite, puis congelée (-80 °C) et lyophilisée (**Fernandes et al., 2019**).

L'hydrodistillation par un montage Clevenger a été utilisée pour l'extraction des huiles essentielles de la plante *T. algeriensis* et *S. verbenaca*. Une quantité de 100 g de poudre

végétale a été soumise à une hydrodistillation dans un ballon de 500 mL pendant 4 heures. La procédure est répétée jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante pour l'expérimentation. Ensuite, le distillat volatil (TAHE) est récupéré, pesé et conservé dans des flacons sombres bien fermé à 4 °C jusqu'à utilisation.

## 5. Composition chimique

### 5.1. Analyse quantitative et qualitative des glucides

L'analyse quantitative et qualitative des glucides des extraits hydrométhanoliques des deux plantes est réalisée en adoptant la procédure générale de **Fernandes *et al.* (2019)**. Les sucres neutres sont soumis à une hydrolyse acide avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12 M) pendant 3 h à 25 °C, suivie d'une hydrolyse dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) durant 2 h 30 min à 100 °C. L'hydrolysate subit ensuite une réduction avec NaBH<sub>4</sub> (15% p / v dans NH<sub>3</sub> 3 M) pendant 1 h à 30 °C ; et une acétylation avec l'anhydride acétique en présence de 1-méthylimidazole pendant 30 min à 30 °C. Les acétates d'alditol générés sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'ionisation de flamme (CG/FID) et utilisant le 2-désoxy glucose comme étalon interne. Les acides uroniques sont quantifiés par la méthode colorimétrique au 3-phénylphénol en utilisant l'acide galacturonique (GalA) comme standard (**Fernandes *et al.*, 2019**). Les sucres libérés sont identifiés sans effectuer une hydrolyse préalable.

### 5.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (TPC) dans les extraits de *T. algerinsis* et *S. verbenaca* est déterminée selon la méthode décrite par **Singleton et Rossi (1965)**. La réaction des groupes hydroxyles des composés phénoliques avec le réactif de Folin-Ciocalteu produit une couleur bleue mesurable à 765 nm. L'intensité de cette coloration est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans les extraits.

Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de l'échantillon est mélangé avec 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée) et incubé pendant 4 min. Puis, 800  $\mu\text{L}$  de carbonate du sodium (7.5 %, p/v) sont ajoutés. Le mélange résultant est incubé pendant 2 h et l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc de la réaction ne contenant pas d'extrait. Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant l'acide gallique (5-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans les mêmes conditions et les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique/mg d'extrait sec (mg de EAG/mg).

### 5.3. Dosage des flavonoïdes totaux (TFC) et flavonols (FOL)

Le trichlorure d'aluminium est utilisé pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes dans les deux extraits de *T. algerinsis* et *S. verbenaca* par la méthode de **Djeridane et al. (2006)**. Le complexe flavonoïde-aluminium apparaît jaunâtre à 430 nm. Un volume de 0.5 mL de chaque extrait est mélangé avec le même volume de trichlorure d'aluminium (2 % dissous dans le méthanol), puis incubé pendant 15 min et l'absorbance est mesurée à 430 nm. La quercétine est utilisée pour établir une courbe d'étalonnage (10-45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et la teneur totale en flavonoïdes a été exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalents de quercétine/mg d'extrait sec ( $\mu\text{g}$  EQ/mg).

Pour les flavonols, la quantité de ces composés est mesurée selon la méthode de **Mbaebie et al. (2012)**. Un volume de 1 mL d'échantillon et 1 mL de trichlorure d'aluminium (2 %, p/v) sont mélangés avec 1.5 mL d'acétate de sodium aqueux à 5 % (p/v) et incubés à 25 °C pendant 2h 30 min. L'absorbance est ensuite enregistrée à 440 nm. La rutine est utilisée pour établir une courbe d'étalonnage (10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalents de rutine/mg d'extrait sec ( $\mu\text{g}$  ER/mg).

### 5.4. Dosage des tanins totaux (TT)

La capacité des tanins à précipiter les protéines est utilisée pour estimer leurs teneurs dans les extraits des deux plantes selon la méthode de **Hagerman et Butler. (1978)**. Un

volume d'échantillon est mélangé avec deux volumes de BSA (1 mg/mL), Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante puis centrifugé pendant 15 min à 3000 g et le surnageant est éliminé. Ensuite, les plaques restantes dans le tube sont dissoutes dans 4 mL de solution SDS/TEA (SDS 1 %, TEA 5 %, v/v dans l'eau distillée), et 1 mL de FeCl<sub>3</sub> est ajouté. Le mélange est alors incubé de nouveau pendant 15 min et l'absorbance est mesurée à 510 nm contre un blanc préparé en mélangeant 1 ml de FeCl<sub>3</sub> et 4 mL de solution SDS/TEA. Les résultats sont exprimés en µg équivalents d'acide tannique/mg d'extrait (µg EAT/mg) en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique (25-1200 µg/mL).

### **5.5. Dosage des triterpènes**

Pour la quantification des triterpènes, 30 µL d'extrait de plante, 50 µL de vanilline (5 % préparée dans de l'acide acétique) et 100 µL de l'acide perchlorique sont mélangé et incubé à 60 °C pendant 45 min. Puis, le mélange est refroidi dans un bain d'eau glacée. Ensuite, 450 µL d'acide acétique sont ajoutés et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 548 nm. L'acide ursolique est utilisé comme standard pour préparer une courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en µg équivalents d'acide ursolique par mg d'extrait sec (µg EAU/mg) (Chang *et al.*, 2012).

### **5.6. Analyses chromatographiques**

#### **5.6.1. Analyse UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>**

L'analyse des composés phénoliques individuels est effectuée par une UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> en utilisant un instrument Ultimate 3000 (Dionex Co., Sunnyvale, Californie, USA) équipé d'un détecteur de barrette de diodes ultimes 3000 (DAD) (Dionex Co.) et couplé à un spectromètre de masse comme décrit par Afonso *et al.* (2018). La séparation des phytoconstitunats des extraits est réalisée sur une colonne Hypersil Gold C18 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) de 100 mm de longueur et un diamètre de 2.1 mm. Cette

colonne est constituée de particules de 1.9  $\mu\text{m}$  de diamètre et, maintenue à 30 °C. La phase mobile consistait en deux systèmes de solvant : eau/acide formique (99 : 1, v/v) (solvant A) et acétonitrile / acide formique (99 : 1, v/v) (solvant B). L'élution est réalisée selon un gradient de 5-40 % de B (0-15 min) et de 40-100 % de B (15-19 min) avec un débit de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , suivi du retour aux conditions initiales avec une durée totale de 34 min. La détection est entre 200 et 500 nm à l'aide d'un spectromètre de masse (Thermo LTQ XL (Thermo Scientific) en mode d'ionisation négative avec une source d'électrospray (ESI). Les composés sont identifiés à l'aide de leurs spectres d'absorption UV-visible et de masse en comparaison avec les données de la littérature.

### **5.6.2. Analyse des huiles essentielles par CG/MS**

Les composés volatils ou les huiles essentielles sont identifiés par une chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CG-MS). La colonne capillaire utilisée (Agilent Technologies Network 6890N Network GC) a une dimension de 30 m  $\times$  0.32 mm avec une épaisseur du film de 0.25  $\mu\text{m}$  DB-FFAP (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) et couplée directement au spectromètre de masse (Agilent Technologies détecteur de masse sélectif quadripôle réseau 5973). L'analyse a été réalisée avec un programme de température comme suit : la température initiale était 60 °C avec une augmentation linéaire de 2 °C/min jusqu'à 180 °C, suivie d'une augmentation linéaire de 5 °C/min jusqu'à 220 °C, une température maintenue ainsi jusqu'à la fin de l'analyse (70 min). 1  $\mu\text{L}$  d'une dilution appropriée des huiles essentielles préparée dans du dichlorométhane est introduit manuellement dans le port d'injection du CG. Le débit du gaz vecteur (He) était de 1.7 mL/min avec une pression en tête de la colonne de 24.5 psi. Les spectres de masse sont obtenus sur impact électronique à 70 eV et comparés avec ceux de la bibliothèque de base des données (logiciel MSD Chem Station (G1701DA ; version D.00.00.38; Hewlett-Packard,

Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). Pour la quantification des échantillons, 1.684 g/L d'étalon interne de 3-octanol sont ajoutés avant l'analyse (Santos *et al.*, 2019).

## 6. Activités biologiques

### 6.1. Activités antioxydants *in vitro*

#### 6.1.1. Pouvoir réducteur

Le Fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le phosphomolybdène sont utilisés pour estimer le pouvoir réducteur des extraits de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, ainsi que les l'huiles essentielles.

##### A- Capacité antioxydants totale

La méthode du phosphomolybdène (Prieto *et al.*, 1999) est une méthode simple et rapide pour évaluer la capacité antioxydant totale (TAC) d'un extrait de plante. Elle est basée sur la formation du complexe de phosphomolybdène Mo (V) réduit de couleur verdâtre mesurable à 695 nm en présence d'un agent réducteur. Un volume d'échantillon de 0.1 mL est mélangé avec 1 mL de réactif (0.6 M d'acide sulfurique, Phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM) et incubé à 95 °C pendant 90 min. L'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. La capacité antioxydants totale est exprimé en  $\mu\text{g}$  équivalents d'acide ascorbique/mg d'extrait sec ( $\mu\text{g}$  EAA/mg).

##### B- Le test FRAP

Le test FRAP est utilisé pour mesurer la capacité réductrice des ions de fer de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* (Pulido, 2000). Cette méthode est basée sur la réduction de tripyridyltriazine ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) en tripyridyltriazine ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) à pH faible en présence d'un agent réducteur. Le réactif FRAP est préparé en mélangeant 1.25 mL de solution TPTZ (10 mM dans HCl 40 mM) avec 1.25 mL de 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  et 12.5 mL de tampon acétate (300 mM acétate de sodium, pH 3.6 ajusté avec de l'acide acétique),

préchauffé à 37 °C avant utilisation. Le mélange réactionnel contenait 900 µL de réactif FRAP, 70 µL d'eau bidistillée et 30 µL d'extrait ou d'huile essentielle avec une dilution appropriée. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37 °C et l'absorbance est lue à 593 nm. Les résultats sont exprimés en µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/mg d'extrait.

### 6.1.2. Activités antiradicalaires

L'activité antiradicalaire de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est évaluée par différentes méthodes tels que le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>, Sigma Aldrich), le radical 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS<sup>•+</sup>, Sigma Aldrich), le radical peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Aldrich) et le radical pyroxyde généré par le 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) (AAPH, Sigma Aldrich). Les antioxydants synthétiques (BHT, BHA et l'acide ascorbique) et naturels (la quercétine) sont utilisés comme des standards de référence.

#### A- Piégeage du radical DPPH

La méthode de **Shen et al. (2010)** est utilisé pour estimer l'activité des extraits contre le radical DPPH<sup>•</sup>. Un mélange de 0.5 mL de solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> (0.1 mM) et 1.5 mL d'extrait ou d'huile essentielle sont incubés dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé suivant l'équation (1) :

$$\text{Inhibition (\%)} = ((\mathbf{Ac}-\mathbf{As}) / \mathbf{Ac}) \times 100 \dots \dots \dots \text{équation (1)}$$

**As:** absorbance des échantillons, **Ac :** absorbance du contrôle (tous les réactifs sauf l'échantillon).

Les courbes des inhibitions en fonction des concentrations sont utilisées pour calculer la concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) définie comme étant la concentration des échantillons qui réduit 50% des radicaux libres dans le milieu et les résultats sont exprimés en µg/mL.



**B- Piégeage du radical ABTS<sup>+</sup>**

Le pouvoir antioxydant vis à vis du radical ABTS<sup>+</sup> est estimé en utilisant la méthode de **Re et al. (1999)**. Ce radical est généré en mélangeant une solution d'ABTS (7 mM) avec 13.24 mg de persulfate de potassium pendant 16 h. La solution résultante est réfrigérée, puis diluée pour atteindre une absorbance de  $0.70 \pm 0.02$  à 734 nm. Un volume de 100  $\mu$ L d'extraits ou d'huile essentielle est mélangé avec 1.9 mL de solution ABTS<sup>+</sup>, puis incubé pendant 7 min. L'absorbance est mesurée à 734 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé suivant l'équation (1). Les IC<sub>50</sub> sont exprimées en  $\mu$ g/mL.

**C- Piégeage du peroxyde d'hydrogène**

L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits et des huiles essentielles est évaluée par la méthode de **Ruch et al. (1989)**. Un volume de 0.5 mL d'extrait ou d'huile essentielle à différentes concentrations est dissous dans du PBS (pH 7.4) et mélangé avec 1 mL d'une solution fraîchement préparée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 40 mM dans du PBS. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 10 min, puis l'absorbance est enregistrée à 240 nm. Un blanc est préparé pour chaque concentration et le contrôle contenait du PBS au lieu de l'extrait. Le BHA, l'acide gallique et l'acide ascorbique sont utilisés comme des standards de référence. Les pourcentages d'inhibitions du peroxyde d'hydrogène sont calculés selon l'équation (1) et les IC<sub>50</sub> sont exprimées en  $\mu$ g/mL.

**D- Inhibition de l'hémolyse oxydative**

L'AAPH est utilisé comme initiateur de radicaux peroxydes pour évaluer la capacité des deux plants à protéger la membrane des globules rouges contre l'hémolyse oxydative provoquée par ce radical libre (**Miki et al., 1987**). Les érythrocytes prélevés de souris saines ont été séparés du plasma et de la couche leucocytaire en effectuant trois lavages avec 10 volumes de PBS (pH 7.4). Les globules rouges sont centrifugés à 2000 g pendant 10 min au premier lavage et 5 min pour les deux derniers. Ces cellules sont ensuite mises en suspension

dans du PBS pour obtenir un hématoците de 20 %. 500 µL de dilution appropriée d'extrait dans du PBS sont mélangés avec 500 µL de suspension d'érythrocytes et 500 µL d'AAPH (200 mM), puis le mélange est doucement agité et incubé pendant 3 heures à 37 °C. Après incubation, le mélange est dilué avec 8 volumes de PBS, puis centrifugé pendant 10 min à 2000 g. L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation (1).

### 6.1.3. Test de Blanchiment du β-carotène

Cette méthode est utilisée pour évaluer la capacité antioxydants de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* en utilisant le système lipidique β-carotène/acide linoléique (Aslan *et al.*, 2006). Les radicaux libres linoléates produits dans le mélange réactionnel par auto-oxydation de l'acide linoléique, provoquent la rupture de la double liaison (C=C) du β-carotène et induisent sa décoloration qui peut être inhibée en présence d'un autre antioxydant dans ce mélange. L'émulsion de β-carotène est préparée en mélangeant 0.5 mg de β-carotène, 1 mL de chloroforme, 25 µL d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite et 100 mL d'eau saturée en oxygène sont ajoutés au mélange qui est vigoureusement agité. Un volume de 2.5 mL de la solution de β-carotène préalablement préparée est ajouté dans des tubes contenant 350 µL d'extrait (2 mg/mL) ou d'huile essentielle (5 mg/mL). La même procédure est appliquée aux standards (le BHA, le BHT et l'acide gallique) utilisés comme témoins positifs, et les témoins négatifs 5méthanol et eau). Après incubation à l'obscurité et une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 490 nm à différents intervalles de temps (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h). L'inhibition du blanchiment du β-carotène après 24 h est calculée selon l'équation (2) :

$$\% \text{ d'inhibition (24 h)} = (AE / AB) * 100 \dots \dots \dots (2)$$

**AE** est l'absorbance en présence des extraits ou standards au temps 0 et **AB** est l'absorbance en présence des extraits ou standards après 24 h.

#### 6.1.4. Chélation du fer

Le fer est l'un des métaux de transition qui jouent un rôle important en tant que catalyseur des processus d'oxydation via la réaction de Fenton et qui peut initier la peroxydation des lipides dans les aliments ou le corps humain en raison de sa forte réactivité. La capacité de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca* à chélater les ions fer est déterminée en utilisant la ferrozine qui forme un complexe avec les ions  $Fe^{+2}$  (Le *et al.*, 2007). Les composés phénoliques ou l'huile essentielle entrent en compétition avec la ferrozine pour la formation de ce complexe. Un volume de 500  $\mu$ L d'extrait ou d'huile essentielle est mélangé avec 100  $\mu$ L de  $FeCl_2$  (0.6 mM) et 900  $\mu$ L de méthanol. Après 5 min, un volume de 100  $\mu$ L de ferrozine (5 mM) est ajouté au mélange. Le mélange réactionnel est ensuite agité et incubé pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc préparée en suivant la même procédure et ne contenant pas d'extrait ou d'huile essentielle. Le composé EDTA est utilisé comme un standard de référence et le pourcentage de chélation sont calculées en utilisant l'équation (1). Les concentrations inhibitrices ( $IC_{50}$ ) sont calculées et exprimées en  $\mu$ g/mL.

#### 6.2. Test de toxicité sur l'*Artemia Salina* (BSLA)

L'effet larvicide de l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est déterminé vis-à-vis des larves d'*Artemia Salina*. Les œufs d'*Artemia salina* ont été obtenus chez Waterlife® et ont éclos dans de l'eau de mer artificielle (38 g de sel de mer dans 1L d'eau distillée) à 28 °C après 48 heure. Un mL de dilutions appropriées d'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est ajouté à chaque tube à essai (en triplicatas) contenant 10 nauplie, puis le volume est ajusté avec de l'eau de mer artificielle à 5 mL. Après incubation pendant 24 heures, les nauplii

vivants sont comptés à l'aide d'une loupe et ils sont considérés comme morts s'ils ne présentaient aucun mouvement pendant 10-30 secondes d'observation. Les critères de mortalité étaient comme suit :

- Mortalité <50 % (Effet non larvicide), mortalité de 50 à 75 % (Effet légèrement larvicide) ;
- Mortalité > 75 % (effet hautement larvicide) ;
- Mortalité de 100 % (effet extrêmement larvicide) (**Choi, 2017**).

Le pourcentage de mortalité est déterminé selon **Meyer *et al.* (1982)** et la concentration létale 50 (DL<sub>50</sub>) est calculée en utilisant l'analyse probit décrite par **Finney (1971)**.

### 6.3. Toxicité aigue

La toxicité aiguë de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* a été réalisée conformément aux directives de l'organisation de coopération et de développement économiques (**OCDE N° 423**). C'est une procédure par étapes qui utilise un nombre minimum d'animaux. La toxicité aiguë des deux plantes dépend de la mortalité et / ou du statut moribond des animaux, il peut être nécessaire de passer par 2 à 4 étapes pour estimer la DL<sub>50</sub>. Trois souris femelles *Suisse albinos* à jeun ont reçu l'extrait à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel, tandis que le groupe témoin a reçu le solvant (Tween 20, 5 % dans une solution saline normale). Les animaux ont ensuite été observés pour les signes visuels de toxicité clinique ou de mortalité, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures, puis quotidiennement, pendant une période totale de 14 jours. Après la période de traitement (14 jours), les souris ont été sacrifiées par décapitation et des échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes héparinisés. Le plasma été séparé par centrifugation pendant 10 min (1640 g) et a été utilisé pour analyser les paramètres biochimiques tels que la phosphatase alcaline (ALP), Alanine aminotransférase (ALT), aspartate aminotransférase (AST), urée et créatinine à l'aide des kits

commerciaux (Spinreact ; Madrid, Espagne). Une étude histologique des foies et des reins a aussi été réalisée.

### 6.4. Toxicité subaiguë et statut antioxydants *in vivo*

La toxicité subaiguë de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* (extraits) est déterminée selon **Baghiani et al. (2013)**. Des souris *albinos* mâles (25 à 30g) sont divisées en cinq groupes de 7 individus et traitées quotidiennement pendant 3 semaines par voie orale en utilisant une sonde de gavage en acier inoxydable, comme suit :

Groupe 1 : Témoin négatif qui a reçu le Tween 5% dans une solution saline normale ;

Groupe 2 : Acide ascorbique à une dose de 100 mg/kg de poids corporel ;

Groupe 3 : *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à une dose de 200 mg/kg de poids corporel ;

Groupe 4 : *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à une dose de 400 mg/kg de poids corporel ;

Groupe 5 : *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à une dose de 800 mg/kg de poids corporel.

#### 6.4.1. Analyse des paramètres biochimiques

Après une durée de traitement de 21 jours, les souris ont été sacrifiées par decapitation et le sang a été collecté dans des tubes héparinés. Le plasma est séparé par centrifugation pendant 10 min (1640 g) et dont une partie est utilisée pour analyser les paramètres biochimiques tels que ALP, ALT, AST, l'urée et la créatinine à l'aide des kits commerciaux (Spinreact ; Madrid, Espagne). Le reste du plasma a servi à analyser sa capacité antioxydants par le test de piégeage du DPPH<sup>•</sup> et la méthode FRAP. Par ailleurs, les foies sont prélevés, nettoyés et pesés pour préparer un homogénat de 10 % en utilisant du KCl glacé (0.15 %), puis centrifugé pendant 10 min à 4 °C (2915 g). Le surnageant résultant est recueilli et stocké à -20 °C pour évaluer l'activité de la catalase (CAT), du glutathion réduit (GSH) et de la peroxydation lipidique (MDA), comme détaillé dans la section suivante. La teneur en

protéines totales hépatiques est déterminée à l'aide des kits commerciaux (Spinreact, Madrid, Espagne).

### 6.4.2. Effet sur la capacité antioxydant du plasma

L'effet antioxydants des deux extraits sur le plasma a été évalué par le test de piégeage du DPPH<sup>•</sup> selon **Cuendet *et al.* (1997)** en mélangeant 25 µL de plasma avec 625 µL de DPPH<sup>•</sup> (0.1M). Le pourcentage d'inhibition a été déterminé comme décrit dans la section **7.1.2. (A)**, alors que son pouvoir réducteur a été estimé comme décrit dans la section **7.1.1. (B)** Les valeurs ont été exprimés en µmol équivalents FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/mL.

### 6.4.3. Effet des extraits sur l'état redox hépatique

L'effet des extraits sur l'état redox du tissu hépatique est déterminé en évaluant l'activité de la CAT, ainsi que les taux de GSH et MDA. Pour la CAT, un volume de 0.05 mL du surnageant tissulaire est mélangé avec 2.95 mL de 19 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du PBS (50 mM, pH 7.4) et l'absorbance est mesurée à 240 nm pendant 2 min. Le coefficient d'extinction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (43.6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 240 nm) est utilisé pour calculer l'activité de la CAT et les résultats sont exprimés en µmole de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommé/min/mg de protéine (UI/mg de protéine) (**Claiborne, 1986**).

Pour déterminer le taux de glutathion réduit, un volume de 25 µL du surnageant tissulaire est dilué dans 5 mL de tampon PBS (0.1 M, pH = 8), puis 1.5 mL de ce mélange est ajouté à 10 µL de 5,5 -dithiobis- (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB, 0.01 M) et l'apparition d'un chromophore jaune est mesurée à 412 nm. La teneur en GSH est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du GSH  $1.36 \times 10^4$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 412 nm et les résultats sont exprimés en nmol de GSH/g de tissu hépatique (**Ellman, 1959**).

Enfin, Selon la méthode décrite par **Okhawa *et al.* (1979)**, le test TBARS est utilisé pour évaluer le niveau du malonaldéhyde (MDA) dans le foie. Cette méthode est basée sur la

détection du MDA résultant de l'oxydation des lipides lors de la réaction avec l'acide thiobarbiturique. Brièvement, 0.25 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) dilué (0.67 %) et 0.125 mL d'acide trichloracétique (TCA) dilué (20 %) sont ajoutés à 0.125 mL d'homogénat tissulaire du foie. Le mélange est vigoureusement agité et incubé dans un bain pendant 20 min à 100 °C. Après refroidissement, 1mL de butanol est ajouté et bien mélangé, puis centrifugé pendant 15 min (1640 g) et l'absorbance du surnageant rosâtre est mesurée à 532 nm. Le coefficient d'extinction de MDA ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 530 nm) est utilisé pour calculer la concentration du MDA dans l'homogénat du foie et les résultats sont exprimés en nmol MDA/g de tissu.

## 6.5. Activité anti-inflammatoire

### 6.5.1. Stabilisation membranaire

Une étude préliminaire du potentiel anti-inflammatoire de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est réalisé en utilisant deux modèles *ex-vivo* de stabilisation membranaire et protection des membranes cellulaires des érythrocytes contre l'hémolyse induite par un effet d'hypotonie et d'hyperthermie. L'acide acétylsalicylique est utilisé comme médicament anti-inflammatoire standard.

Une hémolyse induite par hypotonie a été réalisée selon **Seeman & Weinstein. (1966)**, où 1 mL de diverses concentrations d'extrait / acide acétylsalicylique (PBS 10 mM pH 7.4) a été ajouté à 5 mL de PBS hypotonique (NaCl, 50 mM) puis 500 µL de suspension érythrocytaire à 10 % ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation l'absorbance a été mesurée après une centrifugation de 10 min (1300 g). Le contrôle contient tous les réactifs sauf l'extrait ou l'étalon, Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation (3)

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = (\text{Ac-At} / \text{Ac}) * 100 \dots\dots\dots(3)$$

**Ac** est l'absorbance du témoin dans une solution hypotonique et **At** est l'absorbance de l'échantillon d'essai dans une solution hypotonique.

Le test d'hémolyse induite par hyperthermie est effectué selon la méthode décrite par **Shinde et al. (1999)**. Un volume de 5 mL de différentes concentrations d'extrait préparé dans du PBS (PH 7.4) en duplicata, est mélangé avec 30 µL de suspension érythrocytaire à 40 %. Les tubes du premier et deuxième essai sont incubés, respectivement à 54 et 4°C pendant 20 min. Après incubation, les tubes sont centrifugés pendant 3 min (1300 g) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm. L'inhibition de l'hémolyse est calculée avec l'équation (4) comme suit :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = [1 - (\text{At2} - \text{At1} / \text{Ac} - \text{At1})] * 100 \dots \dots \dots (4)$$

**At1** est l'absorbance de l'échantillon dans une solution non chauffée, **At2** est l'absorbance de la solution chauffée de l'échantillon et **Ac** est l'absorbance du témoin dans une solution non chauffée.

### 6.5.2. Œdème auriculaire induit par le xylène

L'activité anti-inflammatoire de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est évaluée en utilisant le modèle d'œdème auriculaire induit par un agent irritant (le xylène). Dans ce test, trente souris SWISS *albino* pesant entre 25 et 30 g sont divisés en cinq groupes de 6 individus. Trois groupes de souris sont traités avec de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* aux doses 200, 400 et 600 mg, tandis que le quatrième et le cinquième groupe ayant servi de témoin négatif et positif, et ont reçu respectivement de l'eau physiologique et un anti-inflammatoire (1 et 10 mg/kg de poids corporel d'indométacine et de dexaméthasone). Une heure après le traitement oral, 30 µL de xylène sont appliqués sur la face interne et externe de l'oreille droite, tandis que l'oreille gauche a servi de témoin. Après une heure, les souris sont sacrifiées et un morceau de 8 mm est retiré de l'oreille droite est pesé (**Ibrahim et**



*al.*, 2012). L'augmentation du poids de celle-ci en comparaison avec l'oreille gauche, reflète le développement d'un œdème. Cependant, une valeur faible du poids de l'oreille droite indique un meilleur effet anti-inflammatoire de l'extrait et le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé à l'aide de l'équation (5):

$$\text{inhibition(\%)} = \left( \frac{\text{poids de l'oreille (control)} - \text{Poids de l'oreille (test)}}{\text{Poids de l'oreille (control)}} \right) \times 100 \dots (5)$$

## 7. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type (SD) dans l'étude *in vitro* et en moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne (SEM) dans les études *in vivo*. Pour déterminer la différence entre les échantillons et les témoins, t-test ou une analyse de variance (ANOVA unidirectionnelle) suivie du test de Tukey ont été réalisées avec GraphPad Prism version 7 (les différences entre les échantillons et les groupes sont considérées comme significatives à  $p \leq 0.05$ ).

# **Chapitre III**

## **Résultats Et Discussions**

## Chapitre III. Résultats et discussions

### 1. Rendement des extraits

La sélection d'un solvant approprié pour l'extraction est une étape très importante et plusieurs facteurs à prendre en considération incluent la polarité du solvant, la taille des particules d'échantillon et le rapport solide/liquide, ainsi que d'autres conditions d'extraction comme le temps, la température et l'agitation mécanique (**Sang-aroon et al., 2019**).

Le mélange hydrométhanolique est le solvant le plus utilisé pour extraire les polyphénols et les flavonoïdes (**Spigno et al., 2007**). En plus de son efficacité, ce mélange est choisi pour éviter la génération de produits formés par dérivatisation d'un constituant végétal avec le méthanol pur. C'est le cas de l'addition de  $\text{CH}_2$  (par exemple, estérification d'un groupe carboxylique) ou  $\text{CH}_3\text{OH}$  (par exemple, dans une addition de Michael à un composé carbonyle  $\alpha, \beta$ -insaturé). Les ratios de 85 % (**Alberti et al., 2014 ; Dailey & Vuong, 2015**) et 50 % (**Sauerschnig et al., 2017**) d'un mélange hydrométhanolique se sont révélés très efficaces pour l'extraction des composés phénoliques. Les flavonoïdes sont habituellement présents sous forme glycosylée et que la présence du fragment sucre tend à rendre le flavonoïde plus soluble dans l'eau, la combinaison de l'eau et du méthanol augmente leur solubilité. La première extraction à 85% de méthanol a permis d'extraire les flavonoïdes les moins solubles, tandis que la seconde extraction, à 50% de méthanol, a permis de récupérer les flavonoïdes glycosylés plus solubles dans l'eau (**Garg, 2012**).

*Thymus algeriensis* a donné un rendement de  $22.6 \pm 4.6$  % (p/p) de la matière végétale sèche (**tableau 4**), plus important que celui de l'extarite hydrométhanolique ( $17.0 \pm 1.2$  %) obtenu par **Khaled Khoudja et al. (2014)**, ainsi que l'extrait acétonitrile/eau ( $15.2 \pm 1.5$  %) et aqueux ( $16.0 \pm 2.4$  %) rapportés par **Guesmi et al. (2017)** pour la même espèce de thym. En ce qui concerne *S. verbenaca*, le rendement est de  $23.5 \pm 1.4$  % (p/p) de la matière végétale séchée (**tableau 4**), et qui est supérieur à celui obtenu par **Blekhiri (2018)** en utilisant le même

procédé extractif. Cette différence pourrait s'expliquer par le polymorphisme des espèces (existent sous plusieurs formes différentes) (Afzel-Raffi, 1979), ainsi que la région et la période de récolte de la plante. D'après nos résultats, la méthode d'extraction que nous avons utilisée a permis l'obtention de rendements très élevés.

Quant aux huiles essentielles de *T. algeriensis*, leur rendement est de  $1.7 \pm \%$  (v/p) (tableau 4) inférieur à celui correspondant à 2.3, 2.67 et 2.25 % qui est rapporté par Hazzit *et al.*, (2009), Bendjabeur *et al.*, (2018) et Zouari *et al.*, (2011) respectivement. En effet, le rendement en huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs notamment l'emplacement géo-climatique, les conditions de croissance, la période de récolte et la méthode d'extraction (Djilani & Dicko, 2012). En ce qui concerne *S. verbenaca*, après 4 heures d'hydrodistillation la teneur en huile essentielle n'était pas mesurable et il ne suffisait pas pour étudier leurs activités biologiques. Ceci est probablement dû à la perte de ces composés volatils lors du séchage de la plante ou bien d'autres facteurs. Les études effectuées sur cette espèce ont rapporté de rendements très faibles en huiles essentielles de l'ordre de 0.15 % (v/p) (Pitarokili *et al.*, 2006) et 0.09 à 0.12 % (v/p) (Ben Taarit *et al.*, 2010). Ces résultats ont confirmé que *S. verbenaca* appartenant à la famille des Lamiaceae est une espèce pauvre en huile essentielle (Ben Taarit *et al.*, 2010).

**Tableau 4.** Rendements des extraits de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*.

Extraits	Apparence	Couleur	Rendement (g ou mL)/100g
TACE	Poudre hygroscopique	vert foncé	$22.6 \pm 4.6$
SVCE	Poudre hygroscopique	Marron	$23.5 \pm 1.4$
TAHE	Liquid	Jaune claire	$1.7 \pm 0.1$

TACE : extrait brut de *T. algeriensis* ; SVCE : extrait brut de *S. verbenaca* ; TAHE : huile essentielle de *T. algeriensis*. les résultats sont exprimés en mouenne  $\pm$  SD (n=3).

## 2. Analyse quantitative et qualitative des glucides

Les résultats de l'analyse des glucides des deux plantes étudiées sont illustrés dans le **tableau 5**. L'extrait de *S. verbenaca* renfermait 15% de glucides composés principalement de glucose (Glc) (48% molaire : mol%), de galactose (Gal) (28 mol%) et d'acide Galacturonique (GalA) (18 mol%). Cependant, *T. algeriensis* en contenait 13% dont les coposés majeurs sont le Glc (65 %), le GalA (23 %) et le Gal (12 %).

Compte tenu de la faible solubilité des polysaccharides dans le méthanol les principaux sucres présents dans les deux extraits peuvent être des glucides à courte chaîne (Coelho et al., 2014), L'absence des polysaccharides dans les extraits, exclue le fait qu'ils soient responsables d'éventuelles activités biologiques.

**Tableau 5.** Composition glucidique et composés phénoliques totaux de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*.

	Carbohydrates (molar %)									Polysacc. (g/kg)	PC Totaux (GAE/kg)
	d-Rib	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Fru	Gal	Glc	GalA		
<b>ST <i>Salvia</i></b>	-	-	-	2	2	-	28	48	18	142±12	205.6±1.6
<b>SL <i>Salvia</i></b>	-	-	2	1	10	39	2	44	-	190±18	
<b>ST <i>Thymus</i></b>	-	-	-	-	-	-	12	65	23	131±14	303.8 ± 2.5
<b>SL <i>Thymus</i></b>	-	-	-	-	-	49	-	51	-	137±11	

ST: sucre totaux ; SL: sucre libre ; Rha: Rhamnose ; Ara: arabinose ; Xyl: Xylose ; Fru : Fructose ; Gal: Galactose ; Glc: Glucose ; GalA: Galacturonic acid. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$ SD (n=3).

## 3. Dosage des composés phénoliques

L'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* a présenté une teneur totale en polyphénols de  $303.8 \pm 2.5$  µg EAG/mg d'extrait sec et qui sont composés de  $15.8 \pm 0.6$  µg EQ/mg de flavonoïdes,  $59.6 \pm 2.3$  µg ER/mg de flavonols et  $105.2 \pm 2.4$  µg EAT/mg de tanins totaux (**tableau 6**). Ce qui correspond à 70 g EAG/kg de la matière végétale, pour ces composés phénoliques et dont le taux est supérieur à celui de l'extrait métholique des feuilles

(8.0-34.4 g EAG/kg de la matière végétale) issues de 12 populations de la même espèce provenant de zones géographiques et bioclimatiques différentes en Tunisie (**Jaouadi et al., 2019**). Les teneurs obtenues dans le présent travail sont également 3 fois plus importantes que celles de 18 et 19 g GAE/kg correspondant respectivement à l'extrait eau-acétonile (95%) (**Guesmi et al., 2017**) et hydro-éthanolique (95%) (**Boulanouar et al., 2013**).

Concernant les flavonoïdes totaux, leur teneur est de 3.68 g/kg de la matière végétale qui est inférieure à celle de l'extrait éthanolique (95%) obtenu à l'aide d'un Soxhlet par **Douar-Latreche et al. (2018)**. Il en est de même pour la teneur des flavonols (13.8 g ER/kg) qui est inférieure à celle de *Thymus numidicus* (27 g ER/kg) signalée par **Ben El Hadj Ali et al. (2014)**. D'après les résultats de dosage des tanins et triterpénoïdes, *T. algeriensis* possède un taux assez élevé de  $105.2 \pm 2.4$  µg EAT/mg d'extrait et  $41.7 \pm 2.8$  EAU/mg respectivement.

Par ailleurs, La teneur totale en composés phénoliques de l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca* (**tableau 6**) était de  $205.6 \pm 1.6$  µg EAG/mg (49.4 g/kg de la matière végétale), consistant en flavonoïdes ( $4.8 \pm 0.8$  µg EQ/mg), flavonols ( $19.9 \pm 1.3$  µg ER/mg) et des tanins (29 µg EAT / mg). Les résultats sont supérieurs à ceux rapportés pour l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca* Algérien par **Belkiri et al. (2017)** (177.6 µg EAG/mg). Lorsqu'ils sont exprimés en mg EAG/g matière végétale, les résultats sont similaires aux données rapportées par **Ben Farhat et al. (2013)**, pour l'extrait méthanolique (55 à 136.3 mg EAG/g d'extrait) obtenu à l'aide d'un Soxhlet de la même espèce poussant dans différents habitats en Tunisie. Dans cette étude, les résultats étaient supérieurs à ceux rapportés par **E-Touys et al. (2016)** (107.5 µg GAE/mg) pour l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* marocain. La *Salvia verbenaca* cultivée en Égypte a montré une faible teneur en composés phénoliques totaux de 4.27 mg GAE/g de la matière végétale (**Khalil et al, 2007**). Les flavonoïdes totaux de cette étude représentaient 5 µg EQ / mg d'extrait sec, une quantité assez faible exprimée en mg EQ/g et comparée au *S. verbenaca* marocain qui montrait  $23.60 \pm 1.42$

mg EQ/g (**Et-Touys et al, 2016**). Des tanins totaux ( $43.3 \pm 7.1 \mu\text{g EAT/mg}$ ) et des triterpénoïdes ( $29.0 \pm 1.5 \mu\text{g EAU/mg}$ ) peuvent également être présents. Il a été rapporté que la quantité des composés phénoliques extraite pouvant être variée selon la procédure d'extraction et le solvant utilisé (**Sultana et al., 2009**). Nos résultats ont montré que le mélange hydrométhanolique est le meilleur solvant pour extraire les composés bioactifs de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*.

**Tableau 6.** Teneur des composés phénoliques et triterpènes des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*.

Extraits	Rendement (g/100 g)	TPC ( $\mu\text{g EAG/mg}$ )	TFC ( $\mu\text{g EQ/mg}$ )	TF ( $\mu\text{g ER/mg}$ )	TT ( $\mu\text{g EAT/mg}$ )	TTC ( $\mu\text{g UAU/mg}$ )
TACE	$22.6 \pm 4.6$	$303.8^b \pm 2.5$	$15.8^b \pm 0.6$	$59.6^b \pm 2.3$	$105.2 \pm 2.4$	$41.7 \pm 2.8$
TAPE	$8.9 \pm 1$	$450.7^a \pm 5.4$	$49.4^a \pm 1.8$	$106.9^a \pm 2.0$	-	-
SVCE	$23.5 \pm 1.4$	$205.6^a \pm 1.6$	$4.8^a \pm 0.8$	$19.9^a \pm 1.3$	$43.3 \pm 7.1$	$29.0 \pm 1.5$
SVPE	$5.4 \pm 1$	$331.7^b \pm 12.6$	$31.1^b \pm 0.5$	$113.8^b \pm 2.0$	-	-

TACE : extrait brut du *T. algeriensis* ; SVCE : extrait brut du *S. verbenaca* ; TAPE : extrait récupéré du *T. algeriensis* ; SVPE : extrait récupéré du *S. verbenaca* ; TPC : contenu en polyphénols totaux ; TFC : contenu en flavonoïdes totaux ; TF : flavonol totaux ; TT : tanins totaux ; TTC : contenu en triterpénoïdes. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n=3). Des lettres différentes dans la même colonne (même plante) indiquant une différence significative ( $P \leq 0.05$ ).

## 4. Caractérisation des extraits

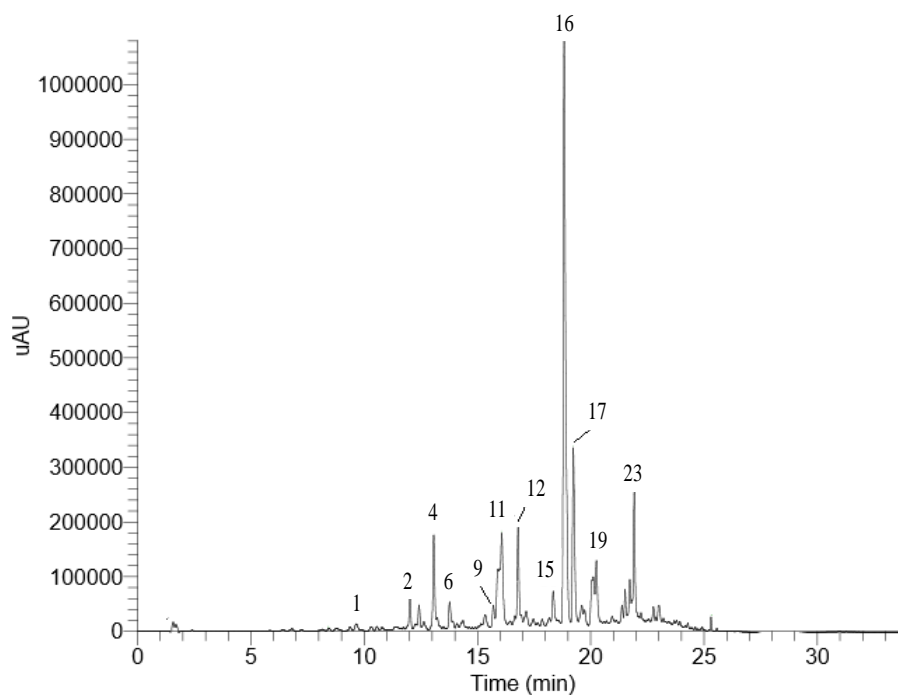
### 4.1. Identification des composés phénoliques par UHPLC-ESI-MS<sup>n</sup>

L'extraction en phase solide (SPE) est utilisée pour éliminer les sucres et les acides organiques susceptibles d'interférer dans l'analyse des composés phénoliques (**Bujor et al., 2016**). L'extrait récupéré de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca* sont analysés en utilisant une chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à un détecteur de diodes array et un spectromètre de masse électrospray (UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>).

L'analyse des composés phénoliques individuelle de *T. algeriensis* a permis l'identification de vingt-trois composés phénoliques répartis en flavonoïdes et dérivés d'acides phénoliques (**figure 10** et **tableau 7**). D'après le chromatogramme, les composés les plus

abondants sont représentés par les pics 16, 17 et 23 (**figure 10**). Le principal composé est le composé 16 présente un  $m/z$  359 et un spectre UV dont l'absorbance maximale est située à 328 nm. L'analyse MS<sup>2</sup> a permis de l'identifier comme acide rosmarinique qui a déjà été identifier chez *T. algeriensis* par **Ziani et al. (2019)** et d'autres espèces du même genre (**Pereira et al., 2014 ; Pereira et Cardoso, 2013 ; Afonso et al., 2017**). Des dérivés glycosylés correspondant aux composés 12 et 14, ont été également détectés (**Afonso et al., 2018**). Un autre dérivé de l'acide rosmarinique correspondant au composé 19, possède les caractéristiques spectrales suivantes :  $m/z$  de 537, ainsi qu'une absorbance maximale située entre 288 et 324 nm dans le spectre UV. L'analyse MS<sup>2</sup> a montré des fragments à 493 (100), 359 (6) correspondant à la perte de 44 et 178 du poids moléculaire typique de l'acide caffeoyl rosmarinique (**Afonso et al., 2017 ; 2018**). Le troisième composé majeur (17) présente un [MH]<sup>-</sup> à  $m/z$  461 et un fragment MS<sup>2</sup>  $m/z$  285 et un spectre UV avec une absorbance maximale située entre 268 et 324 nm, ce qui a permis son identification au kaempférol-O-dérivé d'hexuronide. Un autre isomère de ce composé est également apparu en quantité plus faible (composé 11) et identifié chez *T. algeriensis* (**Ziani et al., 2019**) et d'autres espèces de Thym (**Afonso et al., 2017 ; 2018**). L'analyse par UPHPLC a aussi révélé la présence de l'apigénine-di-O-hexuronide (composé 5) et l'apigénine-6-C-glucoside-7-O-glucoside (composé 2) ainsi Eriodictyol-O-hexoside (composé 4).





**Figure 10.** Chromatogramme de l'extrait récupéré de *T. algeriensis* à 280 nm. Les numéros attribués aux pics sur la figure correspondent aux composés UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> représentés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7.** Identification des composés phénoliques de l'extrait de *T. algeriensis* par UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>.

NP	Tr (min)	UV <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup>	Composés	Ms <sup>2</sup> fragments majeurs ESI-MS <sup>n</sup> (m/z)
1	9.7	295sh, 325	179	Acide caféique	<b>135</b>
2	12.0	271, 332	593	Apigénine di-C-hexoside	<b>473</b> , 503, 353, 383
3	12.5	283	449	Eriodictyol-O-hexoside (isomère 1)	<b>287</b>
4	13.1	283	449	Eriodictyol-O-hexoside (isomère 2)	<b>287</b>
5	13.3	269, 322	621	Apigénine di-O-hexuronide	<b>445</b> , 269
6	13.8	ND	477	Lutéoline-O-hexuronide	<b>301</b> , 343, 397
7	14.4	ND	447	Lutéoline-O-hexoside	<b>285</b>
8	15.4	282	433	Naringénine-O-hexoside	<b>271</b> , 313
9	15.8	255, 265, 343	463	Quercétine-O-hexoside	<b>301</b> , 300
10			637	Di-O-glucuronide de lutéoline	<b>461</b> , 285
11	16.2	267, 333	461	Kaempferol-O-hexuronide (isomère 1)	<b>285</b>
12	16.9	287sh, 319	521	Hexoside d'acide rosmarinique	<b>359</b>
13	17.3	279, 338	717	Isomère E de l'acide salvianolique	<b>519</b> , 521, 475, 359
			571	Acide Yunnaneic E	<b>527</b> , 553, 509
14	18.0	282	719	Acide Sagerinique	<b>359</b> , 539, 521, 341
15	18.5	268, 334	445	Apigénine-O-hexuronide	<b>269</b> , 175
16	19.0	290sh, 328	359	Acide rosmarinique	<b>161</b> , 197, 179, 223
17	19.4	268, 340	461	Kaempferol-O-hexuronide (isomère 2)	<b>285</b>

---

18	19.8	284	555	Isomère K de l'acide salvianolique	<b>493</b> , 357, 537
19	20.4	288, 324	537	Acide caféoyl rosmarinique (isomère 1)	<b>493</b> , 359, 357
20	21.5	287sh, 324	373	Composé inconnu	<b>161</b> , 179, 355, 197, 329, 311, 175, 223
21	21.7	287sh, 324	563	Composé inconnu	<b>387</b> , 531, 489
22	21.9	287sh, 330	717	Acide Salvianolique B	<b>519</b> , 537, 493
23	22.0	287sh, 329	537	Acide caféoyl rosmarinique (isomère 2)	<b>493</b> , 515

---

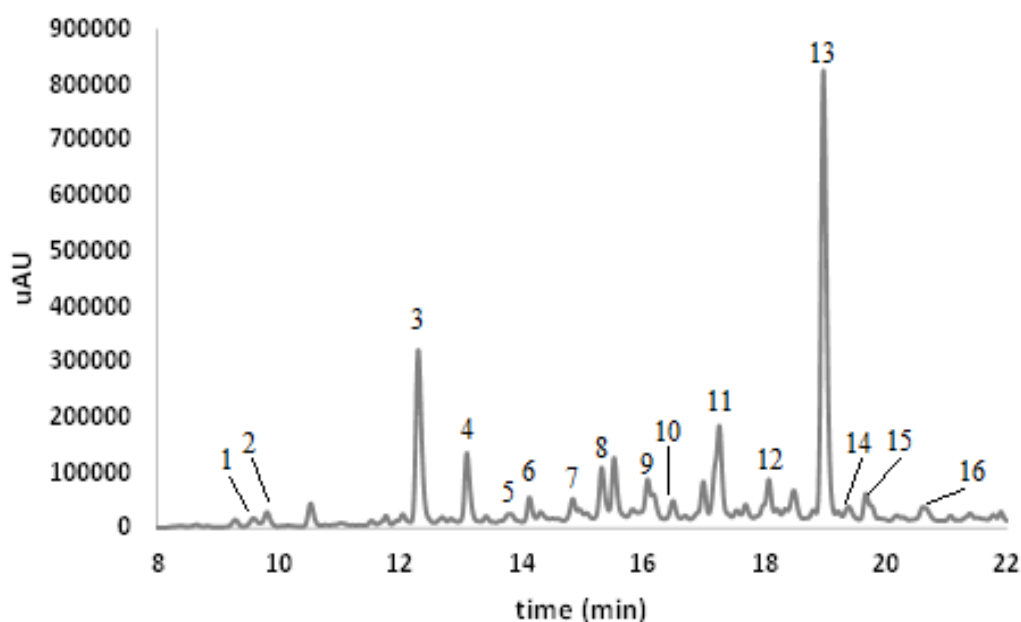
NP : numéro du pic ; **Tr** : Temps de Rétention; **sh** : épaulement (peak shoulder).

Par ailleurs, l'analyse UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> de *S. verbenaca* a montré que l'extrait contenait des dérivés d'acide hydroxycinnamique principalement l'acide rosmarinique et ses dérivés, ainsi que des flavones (**figure 11, tableau 8**). La présence de dérivés d'acide hydroxycinnamique dans l'extrait de *S. verbenaca* est cohérente avec leur prévalence chez les espèces du genre *Salvia* (**Pereira et al., 2018**). Les données spectrales de masse et UV ( $m/z$  359 et  $\lambda$  max 328 nm) du composé majeur 13, ont permis de l'identifier à l'acide rosmarinique qui a déjà été mentionné par **Ben Farhat et al. (2013)** chez les populations de *S. verbenaca*. Par contre, l'étude de **Kamatou et al. (2008)** a rapporté que les espèces *Salvia* étaient dépourvues d'acide rosmarinique.

De plus, des dérivés de l'acide rosmarinique correspondant aux composés 6, 7, 8, 10 et 11 – présentent des  $m/z$  de 517 similaires et sont identifiés comme étant des isomères de l'acide yunnaneique E qui ont été précédemment identifiés chez *S. officinalis*, *S. elegans* et *S. greggii* (**Pereira et al., 2018**). Un autre dérivé d'acide rosmarinique correspondant au composé 15 avec un  $m/z$  517 et un spectre UV ayant une absorbance maximale entre 235 et 267 nm, est identifié à l'acide salvianolique B, signalée également chez d'autres espèces du même genre (**Pereira et al., 2018 ; Martins et al., 2014**). Quand aux composés 2, et 3 ; ils correspondent respectivement à l'acide caféique et son dérivé qui est l'acide caféoyl-malique qui représente le deuxième composé majeur. Cependant, les composés restants appartiennent à la classe des flavones. Ainsi, le composé 16 qui présente un  $m/z$  285 et un spectre UV dont l'absorbance maximale est située entre 238 et 273 nm, est provisoirement identifié à la lutéoline qui a déjà été mentionné dans les résultats de **Ben Farhat et al. (2013)**. La forme glycosylée de ce composé est représentée par le composé 9 caractérisé par un  $[M-H]^-$  à  $m/z$  461 et un fragment MS<sup>2</sup> à  $m/z$  285 et permettant son identification comme étant la lutéoline O-glucuronide. Un autre isomère de la luteoline correspond au composé 14. Ces composés ont également été identifiés chez d'autres espèces du genre *Salvia* comme *S. officinalis*

(Zimmermann *et al.*, 2011 ; Pereira *et al.*, 2018). Enfin, le composé 5 correspond la lutéoline 3-glucoside-7-glucuronide qui a été précédemment identifié chez *S. officinalis* par Cvetkovikj *et al.* (2013).

Des études suggèrent que la nature et la composition phénolique des plantes peuvent être influencée par de nombreux facteurs environnementaux tels que la qualité du sol, le climat et le stress, ainsi que les différentes conditions d'extraction et d'analyse (Gulsunoglu *et al.*, 2019).



**Figure 11.** Chromatogramme de l'extrait récupéré de *S. verbenaca* à 280 nm. Les numéros attribués aux pics sur la figure correspondent aux composés UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> représentés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8.** Identification des composés phénoliques de l'extrait de *S. verbenaca* par UHPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>.

N°	CLASS	RT	UV <sub>MAX</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	PROBABLE COMPOUNDS	MS <sup>2</sup> MAIN FRAGMENTS
1	HCA	9.3	309	325	Coumaroyl hexoside	163 (100), 119 (5)
2	HCA	9.6	295sh, 322	179	Caffeic acid	135 (100), 179 (23)
3	HCA	12.3	295sh, 327	295	Caffeoyl-malic acid	179 (100), 133 (51), 135 (5)
4	Fon	13.1	255, 266, 345	637	Luteolin-di- <i>O</i> -hexuronide	351 (100), 285 (27), 143 (4)
5	Fon	13.8	268, 344	623	Luteolin- <i>O</i> -hexoside- <i>O</i> -hexuronide	285 (100), 605 (33), 447 (23), 337 (9)
6	HCA	14.1	272	571	Yunnaneic acid E isomer 1	527 (100), 439 (94), 553 (50), 483 (44)
7	HCA	14.9	267	571	Yunnaneic acid E isomer 2	527 (100), 509 (26), 553 (20), 439 (15)
8	HCA	15.3	268	571	Yunnaneic acid E isomer 3	527 (100), 553 (33), 509 (26), 329 (15)
9	Fon	16.3	255, 257, 344	461	Luteolin - <i>O</i> - hexoside (isom1)	285 (100)
10	HCA	16.5	269	571	Yunnaneic acid E isomer 4	527 (100), 559 (2), 509 (27), 329 (15)
11	HCA	17.2	266	571	Yunnaneic acid E isomer 5	527 (100), 553 (37), 329 (18), 509 (12)
12	HCA	18.1	266	719	Sagerinic acid	359 (100), 539 (42), 521 (28), 341 (23)
13	HCA	19.0	292sh, 327	359	Rosmarinic acid	161 (100), 197 (30), 179 (20), 223 (11)
14	Fon	19.4	ND	461	Luteolin <i>O</i> - hexoside (isom2)	285 (100)
15	HCA	20.7	280, 305	717	Salvianolic acid B	519 (100), 555 (44), 537 (22), 339 (14), 475 (14)
16	Fon	21.8	256, 267, 343	285	Luteolin	285 (100), 241 (12), 175 (9)

**NP** : numéro du pic ; **Tr** : Temps de Rétention. HCA : acidehydroxycinnamique ;Fon : Flavonol ; **sh** : épaulement (peak shoulder) ;

**ND** : non déterminé.

## 4.2. Analyse des huiles essentielles par GC/MS

L'analyse GC-MS de l'extrait obtenu par hydro distillation à partir de *T. algeriensis* a révélé la présence de 32 composés dont 81.9% de l'HE (**figure 12 et tableau 9**). Les monoterpènes représentent 70% de ces HE, 65% d'entre eux sont des composés oxygénés et 10% des sesquiterpènes.

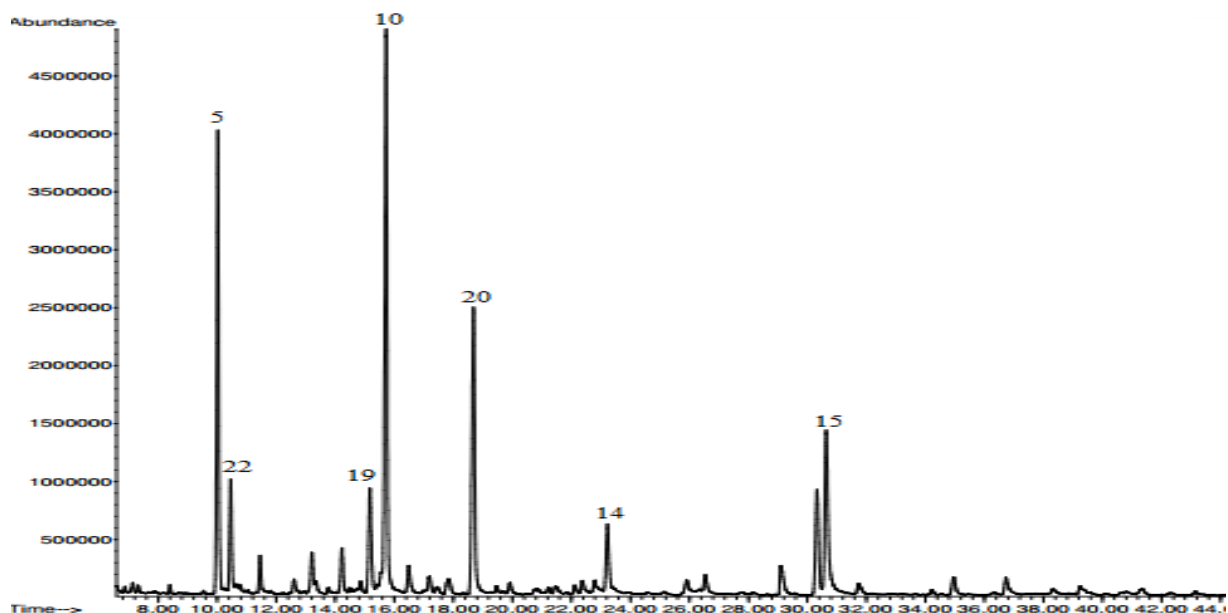
Parmi les composés identifiés, l' $\alpha$ -terpinéol est obtenu avec une teneur élevée (20.72%) en comparaison avec les résultats d'autres études qui ont rapporté des quantités moindres (**Bendjabeur et al., 2018 ; Rezzoug et al., 2018**). Les autres composés majeurs correspondent au linalol (14.15%), l'acétate de géranyle (12.43%) et le méthyleugénol (8.68%). Nos résultats sont similaires au taux de linalol (17.62%) obtenu par **Ahmed et al. (2011)** en Algérie ; mais différents de ceux trouvés en Tunisie sur la même espèce qui renfermait comme composé principal l'acétate d' $\alpha$ -terpinyle (47.4%) et le linalol (6.1 %) (**Guesmi et al., 2019**). D'autres travaux ont rapporté une composition différente de cette espèce avec comme composés majeurs le carvacrol, le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène (**Haziit et al., 2009 ; Kouache et al., 2017 et Bendjabeur et al., 2018**) ; ainsi que le camphre et l'eucalyptol à Djelfa et la région de Laghouat en Algérie (**Benabeda et al., 2017**).

Cependant, l'absence du camphre et la présence de faibles teneurs du thymol et carvacrol ont été mis en évidence par **Zouari et al. (2012)** et **El Ouariachi et al. (2014)**. Ces composés ont été signalés comme les principaux composés dans les huiles essentielles de *T. algeriensis* de différentes zones géographiques (**Giweliet et al., 2013 ; Mehalaine et al., 2017 ; Bukvicki et al., 2018 ; Bendjabeur et al., 2018**).

Les résultats de la présente étude s'avèrent différents par rapport à ceux d'autres travaux réalisés sur *T. algeriensis*. La richesse de cette espèce en  $\alpha$ -terpinéol, acétate de géranyle et linalol peut être attribuée à la récolte de notre plante en pleine floraison (**Khaleel et al., 2018 ; Guesmi et al., 2019**). En effet, le parfum et la composition chimique des huiles



essentielles varient en fonction de l'emplacement géoclimatique et des conditions de croissance. La même espèce peut produire différents composés chimiques responsables d'activités biologiques différentes (Djilani & Dicko, 2012). Ainsi, Guesmi *et al.*, (2019) et Hazzit *et al.* (2009) ont peut montrer que *T. algeriensis* d'Algérie présentait un polymorphisme chimique même pour des échantillons différents provenant de la même région. Ceci est fortement influencé par les différents stades de développement de notre plante qui peut être considérée comme un nouveau chémotype en dépit de sa composition en HE.



**Figure 12.** Chromatogramme des huiles essentielles de *T. algeriensis*. Les numéros attribués aux pics sur la figure correspondent aux composés CG/MS représentés dans le **tableau 9**.

**Tableau 9.** Composition chimique en huiles essentielles de *T. algeriensis*. L'abondance relative est présentée en mg/g  $\pm$  SD et %  $\pm$  SD.

NP	RI <sub>LIT</sub>	RI <sub>cal</sub>	Composés	mg/g	%	Références
Monoterpène oxygéné						
1	1468	1551	Oxyde furanique de linalol	0.58 $\pm$ 0.16	0.19 $\pm$ 0.02	
2	1222	1607	1.8-cinéole	0.78 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.04	
3	1440	1634	Trans-linalooloxyde	0.42 $\pm$ 0.11	0.13 $\pm$ 0.01	
4	-	1679	$\alpha$ -compholénal	0.69 $\pm$ 0.23	0.22 $\pm$ 0.04	
5	1555	1581	<b>Linalool</b>	<b>43.90<math>\pm</math>4.41</b>	<b>14.15<math>\pm</math>0.70</b>	
6	1580	1656	Fenchol	0.47 $\pm$ 0.28	0.15 $\pm$ 0.07	
7	1608	1723	Terpinéol-4	3.70 $\pm$ 0.79	1.18 $\pm$ 0.08	
8	1661	1696	Estragole	5.23 $\pm$ 0.43	1.69 $\pm$ 0.11	<b>Kim &amp; Park. (2008);</b>
9	1620	1723	$\delta$ -terpinéol	0.49 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.01	<b>Jánošková et al. (2014);</b>
10	1732	1848	<b><math>\alpha</math>-terpinéol</b>	<b>64.34<math>\pm</math>7.25</b>	<b>20.72<math>\pm</math>0.78</b>	<b>Lasekan &amp; See. (2015);</b>
11	1782	1625	Nérol	1.53 $\pm$ 0.50	0.49 $\pm$ 0.09	<b>Wang et al. (2016) ;</b>
12	-	1753	Trans-carvéol	1.14 $\pm$ 0.20	0.37 $\pm$ 0.01	<b>Cheong et al. (2012);</b>
13	1781	1820	<i>p</i> -cymen-8-ol	2.64 $\pm$ 0.47	0.85 $\pm$ 0.02	<b>Cheong et al. (2011);</b>
14	1871	1862	Géraniol	10.38 $\pm$ 1.39	3.34 $\pm$ 0.05	<b>Fischer et al. (2008);</b>
15	-	2229	<b>Méthyl eugenol</b>	<b>26.99<math>\pm</math>3.39</b>	<b>8.68<math>\pm</math>0.21</b>	<b>Schreiner et al. (2018);</b>
16	2179	2456	<b>Eugénol</b>	3.39 $\pm$ 0.01	1.10 $\pm$ 0.17	<b>Santos et al. (2019)</b>
17	2223	2326	Thymol	1.53 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.10	
18	2156	2418	Carvacrol	2.05 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.11	
Ester						
19	-	1790	Acétate d' $\alpha$ -terpinyle	13.53 $\pm$ 1.76	4.35 $\pm$ 0.09	
20	1737	1786	<b>Acétate de géranyle</b>	<b>38.66<math>\pm</math>4.96</b>	<b>12.43<math>\pm</math>0.27</b>	
Sesquiterpènes						
21	1528	1660	$\alpha$ -copaène	0.98 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.01	
22	1638	1623	$\beta$ -caryophyllène	10.56 $\pm$ 1.09	3.40 $\pm$ 0.16	
23	1642	1594	$\alpha$ -humulène	5.01 $\pm$ 0.56	1.61 $\pm$ 0.06	
24	1712	1828	$\alpha$ -selinène	2.17 $\pm$ 0.31	0.70 $\pm$ 0.00	
25	-	1863	1-menthène	0.88 $\pm$ 0.14	0.28 $\pm$ 0.00	
26	1823	1907	Germacrène B	1.51 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.08	
27	1992	2192	Oxyde de caryophyllène	3.41 $\pm$ 0.42	1.10 $\pm$ 0.03	
28	2071	2587	Spathulénol	0.83 $\pm$ 0.18	0.26 $\pm$ 0.02	
<b>Total</b>				<b>259.79<math>\pm</math>0.89</b>	<b>81.90<math>\pm</math>2.34</b>	
			Monoterpénoïds		70	
			Sesquiterpénoïdes		10	

## 5. Activités antioxydants *in vitro* des extraits des deux plantes

Les composés phénoliques peuvent exercer leur action antioxydant *via* plusieurs mécanismes, soit en donnant de l'hydrogène ou des électrons ou bien en chélatant les métaux (Hussain *et al.*, 2016). Dans ce contexte, les propriétés antioxydants des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, ainsi que l'huile essentielle de *T. algeriensis* sont testés *in vitro* en utilisant différentes méthodes.

### 5.1. Activités antioxydants de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis*

L'extrait hydrométhanolique de *Thymus algeriensis* a montré des IC<sub>50</sub> de  $7.4 \pm 0.3$  et  $206.6 \pm 0.3$   $\mu\text{g/mL}$  et  $192.7 \pm 3.5$  vis-à-vis du DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivement (tableau 10), suggérant un mécanisme de transfert d'hydrogène par les composés phénoliques. Pour le DPPH<sup>•</sup>, cette activité est comparable à celles de 8.9 et 68.8  $\mu\text{g/mL}$  rapportées par Jaouadi *et al.* (2019) pour les extraits méthanoliques de différents écotypes de *T. algeriensis*. L'activité de piégeage de DPPH<sup>•</sup> obtenue est similaire à celle rapportée par Megdiche-Ksouri *et al.* (2015), mais elle est inférieure à celle enregistrée par Khled Khoudja *et al.* (2014) et Boulanouar *et al.* (2013) de 10 et 150  $\mu\text{g/mL}$  respectivement, en supposant que les conditions expérimentales étaient standard selon la bibliographie. Ceci est probablement dû à la faible quantité de composés phénoliques dans les extraits (19 g EAG/kg) en comparaison avec celle obtenue dans le présent travail (70 g EAG/kg).

**Tableau 10.** Activités antioxydants *in vitro* de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis*.

Activité antioxydants	TACE	BHA	Acide gallique	Acide ascorbique	EDTA
DPPH <sup>•</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	7.4 <sup>c</sup> ± 0.3	1.9 <sup>b</sup> ± 0.3	0.5 <sup>a</sup> ± 0.0	14.1 <sup>d</sup> ± 0.5	-
ABTS <sup>•+</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	206.6 <sup>c</sup> ± 3.0	41.1 <sup>a</sup> ± 0.8	58.3 <sup>b</sup> ± 3.5	57.5 <sup>b</sup> ± 0.2	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	192.7 <sup>c</sup> ± 3.5	80.8 <sup>a</sup> ± 2.6	278.7 <sup>d</sup> ± 7.6	116.5 <sup>b</sup> ± 2.5	-
Chélation du fer IC <sub>50</sub> (µg /mL)	512.3 <sup>b</sup> ± 0.4	-	-	-	22.6 <sup>a</sup> ± 1.2
AAPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	72.6 <sup>b</sup> ± 7.5	28.4 <sup>a</sup> ± 0.9	26.9 <sup>a</sup> ± 1.4	37.6 <sup>a</sup> ± 2.9	-
β-carotène AA (%)	90.3 <sup>a</sup> ± 2.5	96.9 <sup>a</sup> ± 2.3	71.7 <sup>b</sup> ± 5.0	-	-
TAC (µg AAE/mg)	267.7 <sup>c</sup> ± 3.5	385.8 <sup>b</sup> ± 2.6	721.9 <sup>a</sup> ± 16.0	-	-
FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> /mg)	5.3 <sup>d</sup> ± 0.0	16.0 <sup>c</sup> ± 0.01	37 <sup>a</sup> ± 0.2	18.6 <sup>b</sup> ± 0.1	-

TACE : extrait brut de *T. algeriensis* ; Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD (n=3). Lettre différente dans la même ligne indiquant une différence significative ( $P \leq 0.05$ ).

De plus, la décoloration du β-carotène est fortement ralentie par l'extrait de cette plante avec une activité antioxydant relative de  $90.3 \pm 2.5$  % à 2 mg/mL, similaire à celle du BHA. Cet effet est aussi observé contre le radical pyroxylye généré par le thermo-décomposition de l'AAPH. Dans ce test, le radical pyroxylye médie l'oxydation lipidique de la membrane des globules rouges et conduit par la suite à l'hémolyse. L'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* possède un potentiel antioxydant puissant contre les radicaux peroxylyes avec une IC<sub>50</sub> de  $72.6 \pm 7.5$  µg/mL, induisant la protection de la membrane phospholipidique des globules rouges contre la peroxydation lipidique. Cet extrait a également montré un pouvoir réducteur du phosphate-molybdène (VI) en phosphate-molybdène (V) avec une activité de  $267.7 \pm 3.5$  µg EAA/mg. Ainsi, l'extrait hydromethanolique de *T. algeriensis* a montré une activité relative à réduire les ions ferreux ( $5.3 \pm 0.0$  mmol FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O eq/mg), sa capacité de réduction peut être expliquée par des mécanismes de transfert d'électrons. En plus, il est capable d'inhiber la formation du complexe ferrozine-Fe<sup>2+</sup>, avec une activité chélatrice de  $512.3 \pm 0.4$  µg/mL.

Nos résultats ont permis de conclure de manière générale que l'activité antioxydant totale de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* est importante en comparaison avec l'antioxydants naturel (l'acide gallique) et synthétique (BHA) avec un TAC de  $721.9 \pm 16.0$  et  $385.8 \pm 2.6$   $\mu\text{g EAA/mg}$  respectivement. Des valeurs de TAC similaires ont été rapportées dans l'étude de **Khled Khoudja et al. (2014)** sur l'extrait éthanolique (80%) de *T. algeriensis*.

## 5.2. Activités antioxydants de l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca*

Les résultats des différentes activités antioxydants de l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca* sont illustrés dans le **tableau 11**. Cet extrait a montré une bonne activité antiradicalaire contre les radicaux libres synthétique ABTS<sup>•+</sup> et DPPH<sup>•</sup>, avec une IC<sub>50</sub> de  $239.9 \pm 2.2$  et  $7.5 \pm 0.5$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Cette dernière s'avère plus importante comparée à celle de 25.11 à 40.91  $\mu\text{g/mL}$  de différentes populations de cette espèce signalées par **Ben Farhat et al. (2013)** et de 72.5  $\mu\text{g/mL}$  trouvée par **Belkhiri et al. (2017)**. Ces valeurs étant élevées sont significatives d'une faible activité. D'autre part, l'effet antioxydant vis-à-vis du radical ABTS<sup>•+</sup> est similaire aux résultats de **Ben Farhat et al. (2013)** ayant obtenu des IC<sub>50</sub> variants de 120.11 à 287.81  $\mu\text{g/mL}$ . Dans le test FRAP, l'extrait de *S. verbenaca* a aussi la capacité de réduire les ions Fe<sup>3+</sup> en ions Fe<sup>2+</sup> avec une activité de  $4.3 \pm 0.06$  mmol FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O eq/mg d'extrait qui est moins significative par rapport aux résultats de **Ben Farhat et al. (2013)** ayant trouvé un meilleur pouvoir réducteur de 101.46-142.07 mmol Fe (II)/mg. Ce dernier est lié à la forte teneur en polyphénols totaux de 55.49-136.33 g EAG/kg par rapport à notre résultat (49.4 g EAG/kg).

De plus, l'extrait de *S. verbenaca* a montré un pouvoir antioxydant total important de  $231.8 \pm 7.3$   $\mu\text{g EAA/mg}$ , et efficacement retardé le blanchiment du  $\beta$ -carotène soit en piégeant les radicaux peroxydes générés par l'auto-oxydation de l'acide linoléique, ou bien en protégeant l'oxydation de l'acide linoléique. L'activité antioxydant relative est de  $77.1 \pm 7$  % aussi efficiente que celle de l'acide gallique ( $71.7 \pm 5.0$  %).

Cet extrait a également capable de protéger la membrane des érythrocytes en inhibant les radicaux pyroxyles générés par la thermodécomposition de l'AAPH. Une  $IC_{50}$  de  $111.1 \pm 7.5 \mu\text{g/mL}$  est obtenue dans cet essai *ex-vivo* est inférieure à celle des standards utilisés.

L'activité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transition catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique. L'extrait de *S. verbenaca* possède une activité chélatrice significative avec une  $IC_{50}$  de  $189.2 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ .

**Tableau 11** : Activités antioxydants *in vitro* de l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca*.

Activités antioxydants	SVCE	BHA	A.G.	A.As	EDTA
DPPH <sup>•</sup> $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$7.5^b \pm 0.5$	$1.9^a \pm 0.3$	$0.5^a \pm 0.0$	$14.1^c \pm 0.5$	-
ABTS <sup>•+</sup> $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$239.9^b \pm 2.2$	$41.1^a \pm 0.8$	$58.3^a \pm 3.5$	$57.5^a \pm 0.2$	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$851.6^d \pm 4.4$	$80.8^a \pm 2.6$	$278.7^c \pm 7.6$	$116.5^b \pm 2.5$	-
Chélation du fer $IC_{50}$ ( $\mu\text{g /mL}$ )	$189.2^b \pm 7.9$	-	-	-	$22.6^a \pm 1.2$
AAPH $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$111.1^b \pm 7.5$	$28.4^a \pm 0.9$	$26.9^a \pm 1.4$	$37.6^a \pm 2.9$	
$\beta$ -carotène AA (%)	$77.1^b \pm 7$	$96.9^a \pm 2.3$	$71.7^b \pm 5.0$	-	
TAC ( $\mu\text{g AAE/mg}$ )	$231.8^c \pm 7.3$	$385.8^b \pm 2.6$	$721.9^a \pm 16.0$	-	
FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> /mg)	$4.3^d \pm 0.06$	$16.0^c \pm 0.01$	$37.0^a \pm 0.2$	$18.6^b \pm 0.1$	

SVCE : extrait brut du *S. verbenaca* ; A.G : acide gallique ; A.As : acide ascorbique. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SD (n=3). Lettre différente dans la même ligne indiquant une différence significative ( $P \leq 0.05$ ).

A partir de l'analyse UHPLC des composés phénoliques de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca*, et des activités observées on peut considérer que les activités des deux extraits peuvent être attribuées à leurs composés phénoliques. Notamment, l'acide rosmarinique et ses dérivés, le lutéoline O-glucuronide , l'apigénine-6-C-glucoside-7-O-glucoside qui sont connus pour leurs propriétés antioxydants (Lu & Foo, 2001 ; Alagawany *et al.*, 2017).

De même pour l'acide caffeoyl malique (**Daels-Rakotoarison et al., 2000**) et les dérivés de l'acide férulique (**Zheng et al., 2019, Deghima et al., 2020**) sont bien connus pour être de puissants antioxydants contre plusieurs espèces réactives. L'acide rosmarinique est un antioxydant plus efficace que certains flavonoïdes comme les flavonoïdes glycosylée (lutéoline-7-glucuronide, apigénine-6,8-di-C-glucoside), il a une structure catéchol (possède deux hydroxylgroupes en position ortho) qui en font un antioxydant puissant, la glycosylation des flavonoïdes peut bloquer les groupes hydroxyles responsables de l'activité antioxydant (**Lu & Foo, 2001**).

### 5.3. Activités antioxydants des huiles essentielles de *T. algeriensis*

Les huiles essentielles de *T. algeriensis* ont montré un effet anti-radicalaire dose-dépendant avec une IC<sub>50</sub> relativement élevé de  $2.4 \pm 0.11$  et  $2.9 \pm 0.2$  mg/mL vis-à-vis des radicaux libres DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> respectivement (**tableau 12**), et qui est moins significative que celle de l'antioxydants standards utilisé. Ces huiles essentielles sont plus efficaces pour piéger le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une IC<sub>50</sub> de  $500.5 \pm 20.4$  µg/mL, qui est en accord avec le résultat de **Hazzit et al. (2009)** ayant constaté que les HE de *T. algeriensis* sont efficaces contre certains radicaux libres excepté le DPPH<sup>•</sup>. Ceci peut être attribuée à l'absence totale ou aux faibles quantités de certains composés comme le thymol et le carvacrol qui sont dotés d'un pouvoir antioxydant important (**Hazzit et al., 2009**). Les résultats ont également démontré que les HE de *T. algeriensis* contiennent des composés qui peuvent agir comme donneurs d'atomes d'hydrogène, leur permettant de neutraliser les radicaux libres.

L'évaluation du pouvoir réducteur et la capacité antioxydant totale des HE de *T. algeriensis* a montré une faible activité de réduction des ions ferrique avec une valeur de  $0.2 \pm 0.01$  mmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/mg, mais il reste efficace et réduit les ions molybdates et présente une capacité antioxydants totale élevée ( $313.9 \pm 2.6$  mg AAE / mg). Par rapport à nos résultats, **Hazzit et al, (2009)** et **Rezzoug et al. (2019)** ont également signalé une faible

capacité de réduction de l'ion ferreux de la même espèce récoltée dans différentes régions d'Algérie. Dans leur étude, ils ont lié la faible capacité de réduction de l'HE de *T. algeriensis* à sa pauvreté du thymol ou du carvacrol en raison des substitutions d'hydroxyle dans leurs cycle aromatique, par rapport aux espèces à forte quantité de thymol et de carvacrol, les espèces avec une faible quantité des deux composés enregistrés une faible capacité de réduction.

**Tableau 12 :** Activités antioxydants in vitro de l'huile essentielle de *T. algeriensis*.

Activités antioxydants	TAHE	BHA	A.G	A.As	EDTA
DPPH <sup>•</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	2442.9 <sup>b</sup> ± 119.8	1.9 <sup>a</sup> ± 0.3	0.5 <sup>a</sup> ± 0.0	14.1 <sup>a</sup> ± 0.5	-
ABTS <sup>•+</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	2920.2 <sup>b</sup> ± 205.7	41.1 <sup>a</sup> ± 0.8	58.3 <sup>a</sup> ± 3.5	57.5 <sup>a</sup> ± 0.2	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> IC <sub>50</sub> (µg/mL)	500.5 <sup>d</sup> ± 20.4	80.8 <sup>a</sup> ± 2.6	278.7 <sup>c</sup> ± 7.6	116.5 <sup>b</sup> ± 2.5	-
Chélation du fer IC <sub>50</sub> (µg /mL)	>10 mg	-	-	-	22.6 ± 1.2
AAPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	nd	28.4 <sup>a</sup> ± 0.9	26.9 <sup>a</sup> ± 1.4	37.6 <sup>b</sup> ± 2.9	-
β-carotène AA (%)	55.5 <sup>c</sup> ± 5.2	96.9 <sup>a</sup> ± 2.3	71.7 <sup>b</sup> ± 5.0	-	-
TAC (µg AAE/mg)	313.9 <sup>c</sup> ± 2.6	385.8 <sup>b</sup> ± 2.6	721.9 <sup>a</sup> ± 16.0	-	-
FRAP (mmol FeSO <sub>4</sub> /mg)	0.2 <sup>d</sup> ± 0.01	16.0 <sup>c</sup> ± 0.01	37 <sup>a</sup> ± 0.2	18.6 <sup>b</sup> ± 0.1	-

TAHE : huiles essentielles du *T. algeriensis* ; A. G : acide gallique ; A.As : acide ascorbique ; Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD (n=3). Lettre différente dans la même ligne indiquant une différence significative ( $P \leq 0.05$ ).

Les HE de *T. algeriensis* ont inhibé le blanchiment du β-carotène après 24 h et l'activité antioxydant relative est de 55.5 % à 5 mg/mL. Ces huiles essentielles n'ont montré aucune capacité à chélater les ions ferreux dans le test de chélation du fer aux différentes concentrations testées (1-10 mg/mL). Ce qui est en accord avec d'autres études sur d'autres espèces telles que *T. marschallianus* et *T. proximus* appartiennent au même genre botanique (Jia *et al.*, 2010). Par contre, Zouari *et al.* (2012) ont rapporté une activité intéressante de chélation du fer pour l'HE de *T. algeriensis* extraite à la fois au stade végétatif et en pleine floraison. L'activité de l'HE de *T. algeriensis* dans la présente étude peut être attribué à ses principaux composés majeurs tels que l'α-terpinéol, le linalol, l'acétate de géranyle et le



méthyleugénol qui sont connus comme étant de puissants agents antioxydants. Il convient de noter que l' $\alpha$ -terpinéol seul a montré une faible activité antioxydant dans le test DPPH<sup>\*</sup>, mais est efficace contre les radicaux peroxydes (Khaleel *et al.*, 2018) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme la montre notre étude. Le linalol est un excellent piègeur de peroxyde d'hydrogène (Jabir *et al.*, 2018) et l'acétate de géranyl a présenté un profil redox mixte capable à la fois de prévenir la peroxydation lipidique et piéger les radicaux hydroxyles (Quintans-Júnior *et al.*, 2013).

## 6. Activités biologiques *in vivo* et *ex vivo*

### 6.1. Effet larvicide sur les larves *Artemia salina*

Ce test est largement utilisé pour évaluer la cytotoxicité des extraits de plantes et d'autres composés chimiques (Ghisalberti, 2008), et il a été démontré que les CL<sub>50</sub><1000 µg/mL sont significatives d'un effet potentiellement toxique selon Meyer *et al.* (1982).

La toxicité vis-à-vis des larves d'*Artemia salina* n'a été testée qu'avec les extraits hydrométhanoliques de *T. algerensis* et *S. verbenaca*, compte tenu de la faible solubilité des huiles essentielles en solution aqueuse. Les résultats du **tableau 13** révèlent que le taux de mortalité des larves d'*A. Salina* est dose-dépendant avec un pourcentage allant de 17 à 100% aux doses 1 à 500 µg/mL pour les deux extraits hydrométhanoliques. Ainsi, les deux extraits ne sont toxiques vis-à-vis des larves à la concentration de 1 µg/mL (effet non larvicide). Cependant, testés aux doses 100 à 200 µg/mL, ils ont montré un effet larvicide modéré et se sont avérés extrêmement larvicides à 500 µg/mL. Les CL<sub>50</sub> obtenues sont 41.7± 2.3 et 30.0 ± 5.4 µg/mL pour les deux extraits *T. algeriensis* et *S. verbenaca* respectivement.

**Tableau 13.** Effet des différentes concentration et concentration létale (CL<sub>50</sub>) des extrait hydrométhanolique de *T. algereinsis* et *S. verbenaca* sur *Artemia salina*. Les valeurs de la CL<sub>50</sub> sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Contrôle (DMSO)	<i>S. verbenaca</i>			<i>T. algeriensis</i>		
	Mortalité (%)	Mortalité (%)	Probit	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mortalité (%)	Probit	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	0	0	-		0	-	
1		17	4.04		17	4.06	
10		22	4.23		23	4.11	
50		52	5.04	30.0 $\pm$ 5.4	45	4.97	41.7 $\pm$ 2.3
100		74	5.65		72	5.76	
500		100	-		100	6	

L'effet larvicide avec des CL<sub>50</sub> supérieurs à nos résultats a été également signalée pour d'autres espèces *Thymus* et *Salvia* telles que *T. serpyllum* (Ur-Rehman *et al.*, 2009), *T. zygoides* (Kaska *et al.*, 2018), *S. spinosa* (Bahadori *et al.*, 2015) et *S. clandestine* (Et-Touys *et al.*, 2016).

## 6.2. Toxicité aiguë

L'étude de la toxicité des extraits et des huiles essentielles peut fournir des informations clés aux professionnels de santé, des industries alimentaires et pharmaceutiques afin de maximiser les effets bénéfiques de leurs utilisations tout en minimisant le risque pour les utilisateurs (Vostinaru *et al.*, 2020).

La toxicité aiguë des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est et l'HE de *T. algeriensis* réalisée en administrant une dose limite de 2000 mg/kg aux les souris et en surveillant leur effet pendant 14 jours. Trente minutes après l'administration orale des huiles essentielles de *T. algeriensis* (2000 mg/kg pc), des signes visibles de toxicité sont observés chez les groupes de souris traités. Ces signes comprennent une hypoactivité, une ataxie, des douleurs abdominales et des polypnées, et certains individus ont présenté des troubles de motilité et des convulsions. Les effets ont duré deux heures, puis les symptômes

ont progressivement disparu après quatre heures, Les souris étaient en bonne santé durant les 14 jours d'observation accompagné d'une augmentation de poids corporel ( $6.1 \pm 0.1$  g) (**tableau 14**).

Les deux extraits hydrométanoliques n'ont pas provoqué de mortalité, ni aucuns signes visibles de toxicité, de diarrhée, d'excitation, d'ataxie, de polypnée, d'halètement, de douleur abdominale, d'hypoactivité ou coma au cours des quatres premières heures. Les souris étaient en bonne santé durant les 14 jours d'observation, mais une augmentation de  $8.3 \pm 0.4$  g et  $9.1 \pm 1.1$  g de leur poids corporel est enregistré pour *T. algeriensis* et *S. verbenaca* respectivement en comparaison avec le groupe témoin (**tableau 14**).

Selon l'étiquetage chimique et la classification de la toxicité systémique aiguë basée sur les valeurs de  $DL_{50}$  orales recommandées par le Système d'harmonisation mondiale de la classification et de l'étiquetage des produits chimiques (GHS), nous pouvons estimer que la  $DL_{50}$  est supérieure à 2000 mg/kg et entre dans la catégorie 5 avec une toxicité aiguë relativement faible (2000 à 5 000 mg/kg de poids corporel) et un seuil de  $DL_{50} = 2500$  mg/kg de poids corporel.

Nos résultats sont compatibles avec ceux des  $CL_{50}$  obtenues dans le test de létalité sur l'*Artemia Salina* (brine shrimp :  $41.7 \pm 2.3$  et  $\mu\text{g/mL}$  pour *T. algeriensis* et  $30.0 \pm 5.4$   $\mu\text{g/mL}$  pour *S. verbenaca*). Selon **Logarto et al. (2001)**, il existe une bonne corrélation entre la  $CL_{50}$  du test de létalité sur l'*Artemia Salina* et la  $DL_{50}$  du test de toxicité orale aiguë chez les souris. Une  $CL_{50} > 25$   $\mu\text{g/mL}$  correspond à une  $DL_{50}$  entre 2500 et 8000 mg/kg. Par conséquent, le test de létalité sur l'*Artemia Salina* et la toxicité aiguë chez la souris indiquent que l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* est sans danger aux doses étudiées.

Les fonctions hépatique et rénale sont importantes pour la survie des animaux, leurs disfonctionnement et lésions peuvent être mesurées par analyses biochimiques sérique. En

raison de leur sensibilité à différents types de lésions hépatiques, l'aspartate aminotransférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT) et la phosphatase alcaline (ALP) sont estimées dans le sérum des groupes traités et non traités.

**Tableau 14.** Poids des souris traitées par les huiles essentielles *T. algeriensis*, les extraits hydrométhanoliques de *S. verbenaca* et *T. algeriensis* à une dose limite (2000 mg/kg pc).

Poids	Contrôle	TACE	SVCE	TAHE
Poids initial (g)	22.1 ± 0.8	21.8 ± 0.7 <sup>ns</sup>	21.6±0.0 <sup>ns</sup>	22.6 ± 0.1 <sup>ns</sup>
Gain de poids corporel	2.9 ± 0.1	8.3± 0.4*	9.1 ± 1.1*	6.1 ± 0.1*

TACE : extrait brut de *T. algeriensis* ; SVCE : extrait brut de *S. verbenaca* ; TAHE : huiles essentielles de *T. algeriensis*. Les résultats de chaque extrait sont comparés avec le contrôle. (\*) : Différence significative ( $p \leq 0.05$ ).

Comme c'est indiqué dans le **tableau 15**, les groupes traités par l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* ont montré des taux de  $54 \pm 10$  et  $69 \pm 12$  UI/L d'AST,  $86 \pm 12$  et  $85 \pm 5$  UI/L d'ALP similaires à ceux du groupe témoin, tandis qu'une légère augmentation de  $64 \pm 7$  UI/L du taux d'ALT est enregistrée dans le groupe traité avec l'extrait de *S. verbenaca*, et qui est 1.4 fois plus élevée par rapport à celle du groupe témoin. L'ALT n'est pas un paramètre spécifique au tissu hépatique, mais existe en teneurs élevées dans le cytoplasme des hépatocytes par rapport à d'autres tissus. Une augmentation de cette enzyme de 3 fois de sa valeur normale peut être considérée comme indicateur des lésions hépatocellulaires irréversibles, alors que des valeurs inférieures à deux fois de la valeur normale comme tels que trouvés dans la présente étude peuvent indiquer des lésions hépatiques réversibles (**Hall, 2012**). Les données du **tableau 15** montrent une augmentation significative de  $113.3 \pm 3.9$  UI/L du taux de la phosphatase alcaline (ALP) chez les souris traitées avec les huiles essentielles *T. algeriensis* par rapport au groupe témoin ( $90 \pm 5$  UI/L). L'ALP n'est pas une enzyme hépatique exclusive et l'augmentation de son taux n'est pas directement liée à des lésions hépatiques, car elle peut provenir d'autres tissus tels que les

reins, l'intestin et les os (Arika *et al.*, 2016) ; En ce qui concerne les aminotransférases AST et ALT, leur taux n'est pas modifié par rapport au groupe témoin.

**Tableau 15.** Paramètres biochimiques du plasma des souris traitées par les huiles essentielles *T. algeriensis*, les extraits hydrométhanoliques de *S. verbenaca* et *T. algeriensis* à une dose limite (2000 mg/kg pc).

Paramètres sanguins	Contrôle	TACE	SVCE	TAHE
ALP (UI/L)	90 ± 5	86 <sup>ns</sup> ± 12	85 <sup>ns</sup> ± 5	113.3* ± 3.9
AST (UI/L)	71.4 ± 3.6	54 <sup>ns</sup> ± 10	69 <sup>ns</sup> ± 12	76.1 <sup>ns</sup> ± 7.0
ALT (UI/L)	45.5 ± 2.8	47.8 <sup>ns</sup> ± 7	64* ± 7	47.7 <sup>ns</sup> ± 4.8
Urée (mmol/L)	27.9 ± 0.8	28.7 <sup>ns</sup> ± 2.2	26 <sup>ns</sup> ± 6	19.2* ± 0.2
Créatinine (mmol/L)	42.2 ± 7.6	38.4 <sup>ns</sup> ± 0.0	60 <sup>ns</sup> ± 10	53.8 <sup>ns</sup> ± 0.0

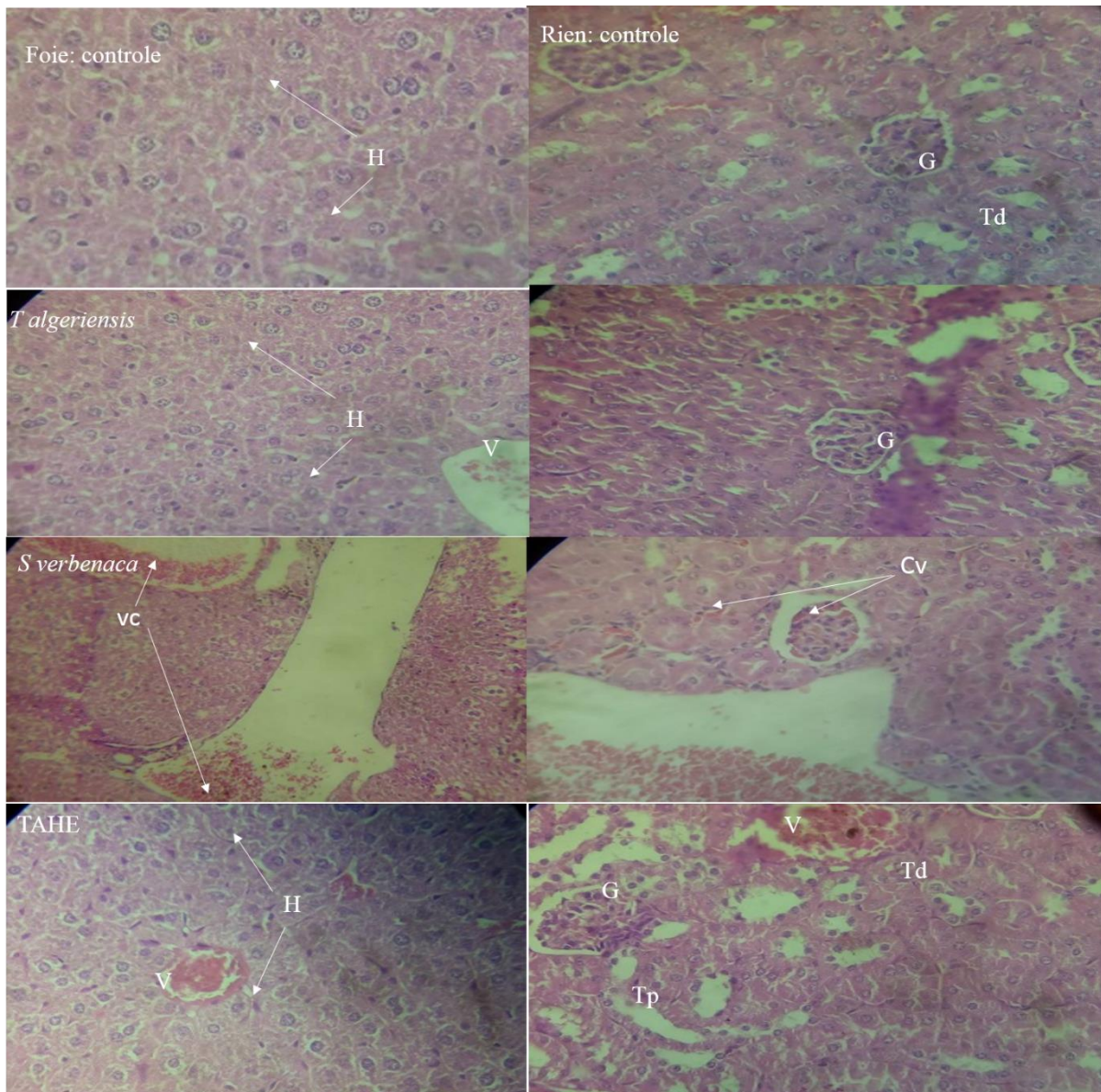
ALP : Phosphatase alcaline ; AST : aspartate aminotransférase ; ALT : alanine aminotransférase. TACE : extrait brut de *T. algeriensis* ; SVCE : extrait brut de *S. verbenaca* ; TAHE : huiles essentielles de *T. algeriensis*. Les résultats de chaque extrait sont comparés au contrôle. (\*) : différence significative (p ≤ 0.05).

L'évaluation de la fonction rénale a été effectuée en estimant les niveaux d'urée et de créatinine. En effet, ces paramètres ont des valeurs élevées en cas d'altération du mécanisme de la filtration rénale, reflétant un dysfonctionnement rénal (Delanaye *et al.*, 2017). Nos résultats ont montré que le taux d'urée et de créatinine des souris traitées par l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* sont similaires à ceux du groupe témoin. Cependant, chez le groupe traité par les huiles essentielles de *T. algeriensis*, le taux d'urée a diminué de manière significative par rapport au groupe non traité. Globalement, les deux extraits et les huiles essentielles n'ont pas altéré les marqueurs biochimiques sériques du foie et des reins, ce qui reflète l'innocuité des deux plantes à des doses très élevées (2000 mg /kg poids corporel).

L'étude histologique du foie des animaux témoins a révélé que le tissu présente un aspect normal avec un parenchyme et des espaces sinusoïdaux normaux. Il en est de même pour les reins qui possèdent une architecture cellulaire normale avec des glomérules bien définis et des tubules normaux (figure 13). Ceci est également observé dans le cas de la micrographie du foie et des reins des souris traitées par l'extrait de *T. algeriensis*. D'autre part, dans l'examen

microscopique du tissu hépatique et des reins des souris traitées par les huiles essentielles de *T. algeriensis*, l'architecture générale de ces tissus est conservée avec absence de congestion vasculaire, d'infiltrat inflammatoire et de nécrose. Ces résultats sont similaires en comparaison avec ceux du groupe témoin (**figure13**). Ce qui confirme que l'augmentation observée du taux d'ALP n'était pas liée aux lésions hépatiques.

Dans les micrographies du foie des souris traitées par *S. verbenaca* (2000 mg / kg pc), une morphologie conservée apparaît dans les tissus hépatiques avec un parenchyme et des espaces sinusoidaux normaux, un aspect similaire à celui du groupe témoin (**figure13**). Aucune lésion visible n'est trouvée dans les examens histopathologiques des organes provenant de souris traitées par *S. verbenaca*, sauf la présence d'une congestion vasculaire sur la micrographie hypatiques (**figure13**). Nous avons observé une morphologie conservée des reins avec des glomérules adéquats et des tubules normaux, mais constaté une légère congestion glomérulaire (**figure13**). La présence de congestion dans le foie et les reins peut être le résultat de l'action de vasoconstriction induite par l'extrait de *S. verbenaca* sur la paroi des vaisseaux sanguins (**Pratt & Diez, 2018**). Dans ce cas, nous pouvons suggérer que les huiles essentielles de *T. algeriensis* et son extrait hydrométhanolique ainsi que l'extrait de *S. verbenacane* ne présentent aucune toxicité aiguë. Ceci est confirmé par l'absence d'effet toxique au niveau histopathologique et de la chimie clinique après une administration d'une dose limite.



**Figure 13.** Coupes histologiques du foie et des reins des souris traitées par les huiles essentielles de *T. algeriensis*, des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à une dose unique (2000 mg / kg pc), et le contrôle ( $\times 40$ ). H : hépatocytes ; V : veine ; G: glomérule; Tp: tubule proximal; Td: tubule distal.

### 6.3. Toxicité subaiguë

Les données obtenues par l'étude de toxicité aiguë ont une signification clinique limitée car elles ne reflètent pas les effets cumulatifs après administration répétée des échantillons. Pour cette raison, une étude de toxicité subaiguë a été réalisée sur les extraits des deux plantes évaluer leurs effets cummulative afin de fournir plus d'informations pour la sécurité humaine et en particulier dans le développement de médicaments.

Les résultats de cette étude sont répertoriés dans le **tableau 16**. Après l'administration quotidienne de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à des doses de 200, 400 et 800 mg/kg pendant 21 jours consécutifs, tous les animaux ont survécu et étaient stables jusqu'au jour du sacrifice. De plus, aucun signe cliniquement décelable, ni de toxicité n'a été observé. Cependant, la croissance des souris n'est pas affectée, étant donné qu'une différence statistiquement significative sur l'évolution de leur poids est enregistrée par rapport au groupe témoin (**tableau 16**).

D'autre part, le changement du poids des organes est l'un des indicateurs sensibles de la toxicité qui suggère la possibilité d'une hypertrophie d'un organe cible tandis que sa diminution est la conséquence d'une nécrose (**Ugwah-Oguejiofor et al., 2019**). Ainsi, Le poids relatif du foie et des reins pour tous les groupes traités (**tableau 15**) était similaire par rapport au groupe témoin. Dans le cas des groupes traités par l'extrait de *T. algeriensis*, une augmentation significative du poids relatif du foie n'est observée qu'à la dose de 800 mg/kg de poids corporel reflétant donc une hypertrophie hépatique. Cette dernière peut être induite par de nombreux facteurs, notamment l'altération de l'état redox, du métabolisme lipidique, ainsi que la morphologie hépatocellulaire cytoplasmique et nucléaire (**Hall et al., 2012**). Néanmoins, nos résultats ont montré que l'hypertrophie de cet organe n'est pas dose-dépendante et n'est accompagnée d'une augmentation significative du taux d'ALT ou de lésions hépatobiliaires caractérisées par des taux très élevés d'AST et d'ALP.

Par conséquent, nous pouvons suggérer qu'il ne s'agit pas d'un effet indésirable causé par le traitement par l'extrait de *T. algeriensis* mais peut être une réponse métabolique adaptative hépatique à un xénobiotique qui est représenté par l'extrait de cette plante (**Hall et al., 2012**). Par conséquent, les composés de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* ne sont pas nocifs pour le foie et les reins (**tableau 16**).



**Tableau 16.** Poids corporel, poids relatif du foie et des reins des souris traitées par l'acide ascorbique, les extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à différentes doses.

Traitement Dose/Kg/jour	Poids corporel (g)		Poids relatif du foie (g/kg)		Poids relatif des reins (g/kg)	
	TACE	SVCE	TACE	SVCE	TACE	SVCE
200 mg	6.78±0.84 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup> ±0.8	42.99 ±2.18 <sup>b</sup>	45.6 <sup>a</sup> ±0.6	12.22±0.90 <sup>a</sup>	13.4 <sup>a</sup> ±0.7
400 mg	6.98±0.87 <sup>a</sup>	7.1 <sup>a</sup> ±1.1	47.98±1.77 <sup>ab</sup>	46.6 <sup>a</sup> ±1.7	12.51±0.87 <sup>a</sup>	12.5 <sup>ab</sup> ±0.5
800 mg	6.97±0.97 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup> ±0.7	53.12±1.19 <sup>a</sup>	43.3 <sup>a</sup> ±2.3	13.14±0.59 <sup>a</sup>	12.4 <sup>ab</sup> ±0.5
A.Ascorbique	8.96±0.95 <sup>a</sup>	8.9 <sup>a</sup> ±1.4	42.53±1.10 <sup>b</sup>	42.5 <sup>a</sup> ±1.1	11.04±1.03 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup> ±0.4
Contrôle	8.77±1.14 <sup>a</sup>	8.7 <sup>a</sup> ±1.0	44.45±1.60 <sup>b</sup>	44.5 <sup>a</sup> ±1.6	13.22±0.58 <sup>a</sup>	13.2 <sup>ab</sup> ±0.6

TACE : extrait brut de *T. algeriensis* ; SVCE : extrait brut de *S. verbenaca*. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (n = 7). Les valeurs dans la même colonne avec une lettre différente sont significativement différentes ( $P \leq 0.05$ ).

D'autres paramètres comme les protéines totales du foie sont un autre indicateur de la fonctionnalité hépatique et dont la diminution provoque une lésion hépatique, tandis que les transaminases sont des indicateurs de l'intégrité des hépatocytes (Hall, 2012). Dans notre expérience, l'analyse biochimique n'a révélé aucune diminution du taux des protéines totales dans le tissu hépatique, suggérant que la fonctionnalité du foie n'est altérée par le traitement. Comme le montre les tableaux 17 et 18, une augmentation non-significative des protéines hépatiques de  $122 \pm 18$  à  $136 \pm 10$  mg/g de tissu est enregistrée chez les groupes traités par *T. algeriensis*, mais qui est significative de  $136 \pm 11$  à  $168 \pm 17$  mg/g de tissu chez les souris traitées par l'extrait de *S. verbenaca* par rapport au groupe témoin ( $98 \pm 8$  mg/g de tissu). Ceci pourrait s'expliquer par une réponse adaptative du foie pour métaboliser l'extrait, en élaborant les enzymes de la phase I et II qui sont impliquées dans la conjugaison et l'excrétion de l'extrait (Ennulat et al., 2010) ; ou bien par une synthèse accrue des protéines du système antioxydants comme la CAT et le GSH. Après trois semaines de traitement des animaux avec l'extrait de *T. algeriensis*, l'exploration de la fonction hépatique par une détermination de l'activité des transaminases sériques a révélé que l'activité des enzymes AST et ALT variait de  $67 \pm 3$  à  $94 \pm 5$  UI/L et de  $35 \pm 3$  à  $67 \pm 3$  UI/L respectivement, mais reste similaire à celle du groupe témoin (tableau 17). Une réduction significative de l'activité de l'enzymz

ALP est observée pour tous les groupes traités par rapport au groupe témoin. Cette enzyme est également présente dans les cellules recouvrant le canal biliaire du foie et dont le taux élevé est caractéristique des maladies cholestatiques du foie. Les taux normaux d'ALP, d'AST et d'ALT indiquent que l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* ne présente pas de toxicité subaiguë pour le tissu hépatique (Shehab *et al.*, 2015).

**Tableau 17.** Paramètres biochimiques des souris traitées par l'acide ascorbique et différentes doses de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis*, et du groupe non traité.

Traitement Dose/Kg/jour	Protéines totales (mg/g tissu)	Bilan hépatique (UI/L)			Bilan rénal (mg/dL)	
		AST	ALT	ALP	Urée	Créatinine
200 mg	122 <sup>a</sup> ±18	94 <sup>ab</sup> ±5	35 <sup>b</sup> ±3	107 <sup>a</sup> ±3	21 <sup>ab</sup> ±0.8	0.16 <sup>b</sup> ±0.03
400 mg	137 <sup>a</sup> ±7	86 <sup>ac</sup> ±3	36 <sup>b</sup> ±3	92 <sup>ab</sup> ±4	20 <sup>ab</sup> ±1	0.22 <sup>ab</sup> ±0.03
800 mg	136 <sup>a</sup> ±10	67 <sup>d</sup> ±3	67 <sup>a</sup> ±3	97 <sup>ab</sup> ±5	18 <sup>b</sup> ±1	0.23 <sup>ab</sup> ±0.02
A.ascorbique	138 <sup>a</sup> ±11	102 <sup>a</sup> ±5	49 <sup>b</sup> ±7	86 <sup>b</sup> ±3	40 <sup>c</sup> ±2	0.38 <sup>c</sup> ±0.02
Contrôle	98 <sup>a</sup> ±8	78 <sup>bcd</sup> ±5	52 <sup>ab</sup> ±4	141 <sup>c</sup> ±3	23 <sup>a</sup> ±1	0.30 <sup>a</sup> ±0.02

AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: phosphatase alcaline ; A.ascorbique : acide ascorbique. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (n = 7). Les valeurs dans la même colonne avec une lettre différente sont significativement différentes (p≤0.05).

D'autre part, l'extrait de *S. verbenaca* testé aux mêmes doses sur les souris, n'a pas provoqué de changements significatifs de l'activité des enzymes sériques AST et ALT par rapport au groupe non traité (**tableau 18**), tandis que celle de l'ALP a significativement diminué de 136 ± 3 à 98 ± 5 UI/L. Il est à noter qu'une augmentation du taux d'ALP n'est pas exclusive des troubles hépatobiliaires (lésion cholestatique), car cette enzyme peut être également élaborée dans les os, l'intestin (Arika *et al.*, 2016).

Le bilan rénal sert à dépister un éventuel dysfonctionnement du rein en mesurant, les taux d'urée et de créatinine. Après un traitement quotidien avec *T. algeriensis* pendant 21 jours les niveaux d'urée (18 ± 1 ; 21± 0.8 mg/dL) et de créatinine (0.16 ± 0.03 ; 0.23 ± 0.02

mg/dL) sont similaire à ceux observés pour le groupe témoin : urée ( $23 \pm 1$  mg/dL) et créatine ( $0.3 \pm 0.02$  mg/dL). Ce qui permet de suggérer que l'extrait de *T. algeriensis* n'a pas provoqué de dysfonctionnement des reins. L'administration quotidienne de l'extrait brut de *S. verbenaca* n'a pas provoqué de changements significatifs des taux d'urée dans tous les groupes traités par rapport au groupe non traité. A une dose de 200 mg/kg de pc de *S. verbenaca*, le taux de créatinine est similaire à celui du groupe non traité, mais diminue significativement de  $0.25 \pm 0.03$  mg/dL à des doses plus élevées de cet extrait (**tableau 18**). Cette diminution n'est pas directement liée au disfonctionnement des reins qui est souvent induit par des teneurs très élevés de créatinine. Il a été démontré que le taux de ce paramètre dépend de nombreux facteurs tels que l'âge, la masse musculaire et le régime alimentaire. Mais certains auteurs ont signalé que les faibles taux de créatinine peuvent être un signe d'une diminution du catabolisme des protéines (**Delanaye et al., 2017**).

**Tableau 18** : Paramètres biochimiques des souris traitées par l'acide ascorbique et différentes doses de l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca*, et du groupe non traité.

Traitement Dose/Kg/jour	Protéines Totales (mg/g tissu)	Bilan hépatique (UI/L)			Bilan rénal (mg/dL)	
		AST	ALT	ALP	Urée	Créatinine
200 mg	136 <sup>ab</sup> ±11	79 <sup>ab</sup> ±8	42 <sup>a</sup> ±2	136 <sup>c</sup> ±3	16 <sup>a</sup> ±1	0.29 <sup>ab</sup> ± 0.04
400 mg	166 <sup>b</sup> ±18	75 <sup>b</sup> ±6	50 <sup>a</sup> ±8	112 <sup>b</sup> ±3	18 <sup>a</sup> ±2	0.25 <sup>a</sup> ± 0.04
800 mg	168 <sup>b</sup> ±17	78 <sup>ab</sup> ±6	46 <sup>a</sup> ±7	98 <sup>ab</sup> ±5	22 <sup>a</sup> ±2	0.25 <sup>a</sup> ± 0.03
A. Ascorbique	138 <sup>a</sup> ±11	102 <sup>a</sup> ±5	49 <sup>b</sup> ±7	86 <sup>a</sup> ±3	40 <sup>b</sup> ±2	0.4 <sup>ab</sup> ± 0.0
Contrôle	98 <sup>a</sup> ± 8	78 <sup>bc</sup> ±5	52 <sup>ab</sup> ±4	141 <sup>c</sup> ±3	23 <sup>a</sup> ±1	0.3 <sup>b</sup> ± 0.0

AST : aspartate aminotransferase ; ALT: alanine aminotransferase; ALP: phosphatase alcaline. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $n = 7$ ). Les valeurs dans la même colonne avec une lettre différente sont significativement différentes ( $P \leq 0.05$ ).

En se basant sur les résultats de notre étude, nous pouvons conclure que les extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* ne présentent aucune toxicité subaiguë à la fois dans le foie et les reins.

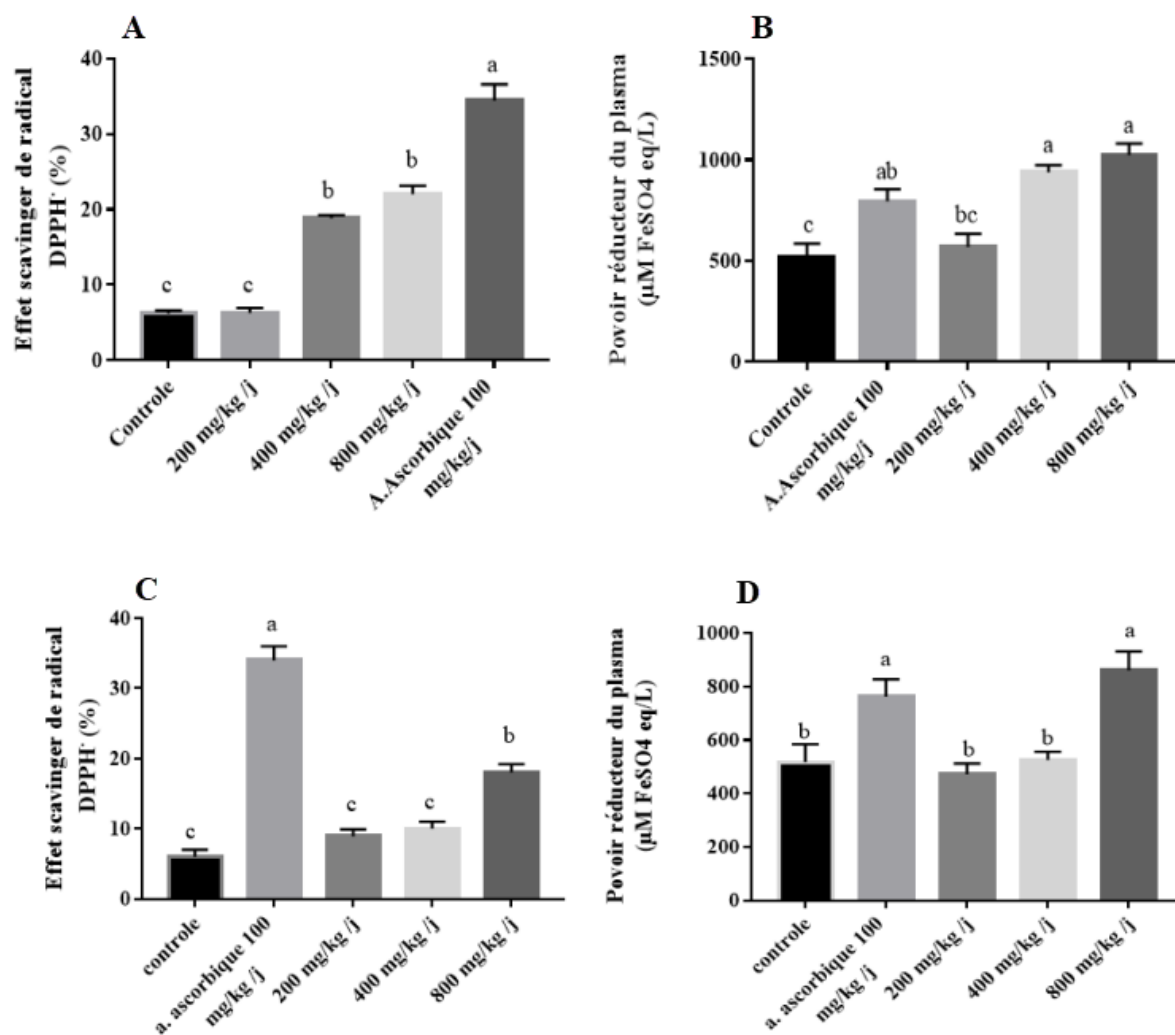
#### 6.4. Capacité antioxydant du plasma

Les résultats de l'analyse de la capacité antioxydant effectuée *in vivo* à l'aide des tests DPPH<sup>•</sup> et FRAP sur du plasma des souris traitées par les extraits de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, et non traitées (le témoin), sont illustrés dans la **figure 14**. Le traitement des souris par l'extrait de *T. algeriensis* a induit une augmentation de la capacité antiradicalaire du DPPH<sup>•</sup> par le plasma de  $22.0 \pm 1.0$  % à la dose de 800 mg/kg de poids corporel (**figure 14A**), et qui est 3 fois plus élevée que celle du groupe non traité ( $6.1 \pm 0.4$  %). Le même effet est observé pour la capacité de réduction du fer de  $1023.9 \pm 56.2$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O eq/mL}$  à une dose de 800 mg/kg de poids corporel (**figure 14.C**), et qui est plus élevé que le groupe témoin ( $517.4 \pm 67.5$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mL}$ ) et celui traité avec l'acide ascorbique ( $794.1 \pm 60.8$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O eq/mL}$ ).

La **figure 14.B** indique que l'activité antiradicalaire du plasma a aussi significativement augmenté de 3 fois ( $18.2 \pm 1.2$  %) chez les groupes traités par l'extrait de *S. verbenaca*. De même, la capacité du plasma à réduire les ions de fer a enregistré une augmentation de 50% atteignant une valeur de  $977.8 \pm 99.1$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O eq/mL}$  à la dose 800 mg/kg de poids corporel (**figure 14.D**). Ces résultats sont similaires à ceux du groupe traité par l'acide ascorbique qui est utilisé comme un agent antioxydant de référence, et 3 fois supérieur à ceux du groupe témoin. Les groupes recevant 200 et 400 mg/kg pc d'extrait ont présenté une légère augmentation de la capacité antioxydant plasmatique qui est non significative comparée au groupe témoin.

Les résultats indiquent que les composés de l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* ont la capacité d'améliorer la capacité antioxydant du plasma chez des sujets sains.

Le potentiel antioxydant plasmatique induit par les deux plantes est positivement lié aux apports alimentaires riches en phytoconstituants comme les composés phénoliques, nos résultats sont en accord avec ceux de **Wu et al. (2015)** et **Ngamukote et al. (2016)**.



**Figure 14.** Activité antioxydant plasmatique du DPPH (A et C) et la capacité de réduction ferrique FRAP (B et D) des souris traitées par les extrait hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S.verbenaca* respectivement, l'acide ascorbique, et du groupe non traité (témoin). Les lettres similaires indiquent une différence non significative ( $P \leq 0.05$ ).

## 6.5. Etat redox hépatique

Le foie est le principal organe sensible aux cascades pathologiques du stress oxydants, ce dernier est l'un des processus clés qui est principalement associés au trouble de l'homéostasie redox qui conduit à des lésions hépatiques métaboliques et prolifératives, à une diminution des enzymes antioxydants, à une déplétion en glutathion, et une peroxydation lipidique accrue (Arauz *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). La cirrhose hépatique ou l'hépatite

est liée à une diminution des niveaux d'enzymes antioxydants (SOD et CAT) et du GSH et une augmentation des taux de MDA (Zhang *et al.*, 2018). Dans cette étude, l'effet *in vivo* des extraits de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca* sur l'état redox du foie des souris saines est déterminé en estimant l'activité de la CAT, les niveaux de GSH et MDA.

La catalase constitue la première ligne de défense contre le stress oxydant, elle supprime et prévient la formation de radicaux libres ou d'espèces réactives dans les cellules (Ighodaro, 2018). Le GSH est l'antioxydant non enzymatique le plus important des cellules, les protégeant notamment des radicaux libres qui sont capables de détruire les composantes cellulaires comme les membranes et l'ADN. L'évaluation du taux de GSH dans les échantillons biologiques est importante car il est considéré comme un excellent marqueur qui reflète l'état de l'homéostasie redox et de désintoxication cellulaire (Wu *et al.*, 2015).

Le traitement des souris une fois par jour avec l'extrait de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca* n'a pas entraîné une diminution du taux de la catalase et du GSH (figure 15). L'extrait de *T. algeriensis* est aussi efficace que l'acide ascorbique et a significativement augmenté l'activité de la CAT de  $41.7 \pm 4.4$  à  $51.4 \pm 3.7$  UI/mg de protéine, alors que cette activité est de  $27.2 \pm 2.2$  UI/mg de protéine chez le groupe témoin (figure 15. A). Il en est de même pour le taux de GSH qui a augmenté de 51 et 61% chez les animaux traités respectivement avec des doses de 400 et 800 mg/kg de poids, et correspondant à des niveaux de GSH de  $33.5 \pm 2.9$  à  $45.7 \pm 1.6$  nmol/mL supérieures à celui du groupe non traité ( $29.9 \pm 0.9$  nmol/mL) (figure 15. C). De la même manière, *S. verbenaca* a significativement amélioré à la fois l'activité CAT et la teneur en GSH dans le tissu hépatique par rapport au groupe témoin normal. A la dose la plus faible de 200 mg/kg de pc par jour, l'activité CAT a atteint  $46.9 \pm 2.1$  UI/mg de protéine et est similaire à celle du groupe traité par l'acide ascorbique, mais 2 fois plus élevée que le groupe non traité. Bien que les niveaux de la CAT à 400 et 800 mg/kg de poids corporel soient significativement plus élevés que ceux du groupe témoin, ils

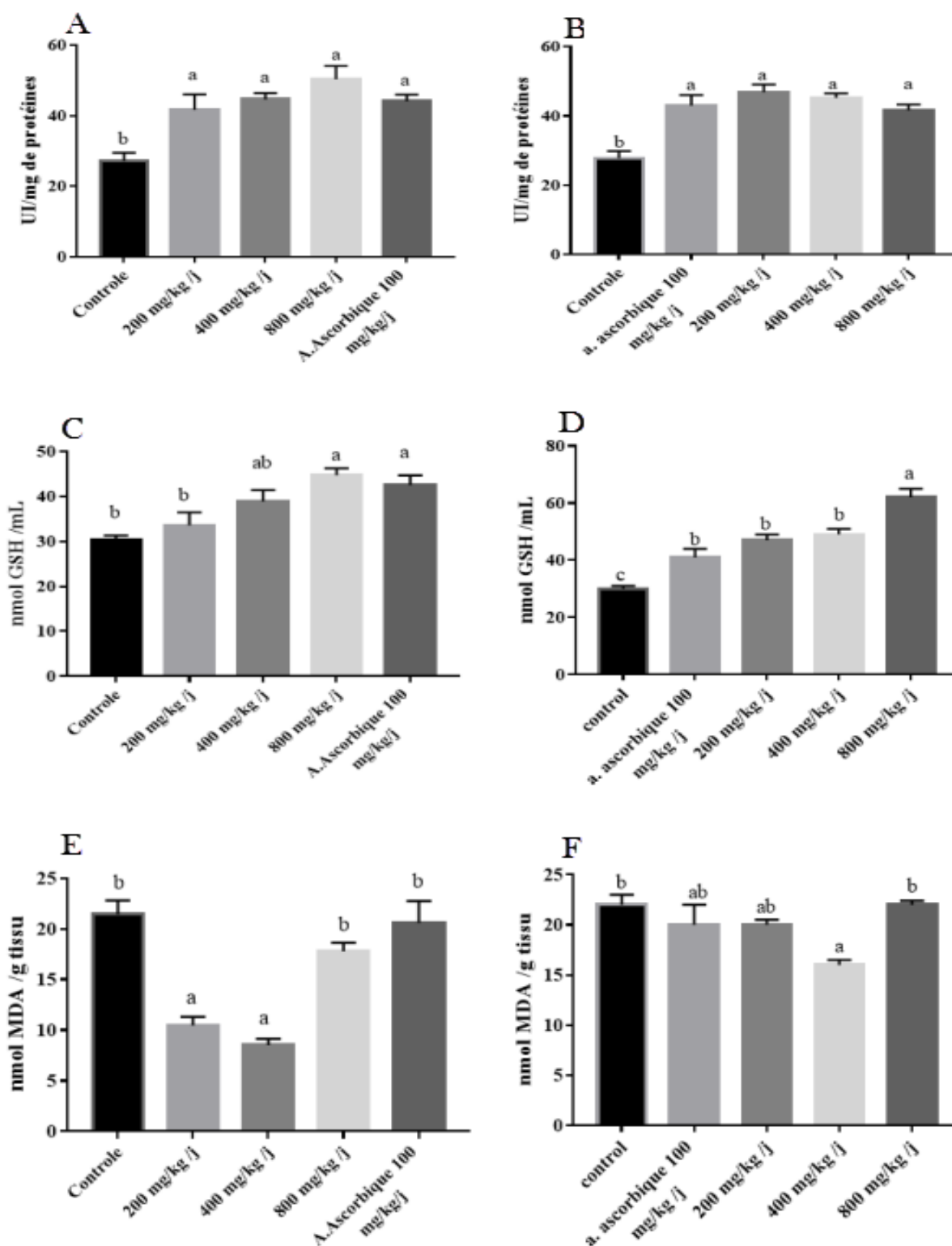
sont similaires à celui du groupe traité avec une dose de à 200 mg/kg de pc (**figure 15. B**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'extrait de *S. verbenaca* renferme des antioxydants très puissants contre la plupart des espèces réactives telles que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui s'accumulent dans les cellules hépatiques, compensant ainsi les antioxydants endogènes chez les souris (**Aliahmat et al., 2012**). On a observé que le taux de GSH dans le tissu hépatique a augmenté de 50 et 106% respectivement chez les souris traitées avec 200 et 800 mg/kg de poids corporel par rapport au groupe témoin ( $29.9 \pm 0.9$  nmol/g de tissu). Cette augmentation du taux de GSH pour tous les groupes traités avec des doses de 200 et 400 mg/kg de poids corporel, est similaire à celle du groupe traité avec l'acide ascorbique ( $42.5 \pm 2.2$  nmol/g de tissu), mais très élevée à la dose 800 mg/kg de poids corporel (**figure 15.D**).

Par ailleurs, le malondialdéhyde est un produit final de la chaîne de peroxydation lipidique, fréquemment utilisé comme biomarqueur pour mettre en évidence les lésions des membranes cellulaires. Les variations des taux de MDA après l'administration d'extrait de *T. algerienses* et *S. verbenaca* ont été estimées dans l'homogénat hépatique des groupes traités et témoins. Les résultats présentés sur la **figure 15.E** et **15.F** indiquent que la supplémentation des animaux avec les extraits de ces plantes aux doses de 200 et 400 mg/kg de poids corporel a diminué les niveaux de MDA dans le foie. A 400 mg/kg de pc de l'extrait de *T. algerienses* et *S. verbenaca*, le niveau du MDA a significativement diminuée jusqu'à  $8.5 \pm 0.8$  nmol/g de tissu (**figure 15.E**) et  $15.9 \pm 0.5$  nmol/g (**figure 15.F**) respectivement. Cet effet peut être expliqué par l'action des composés phénoliques des extraits sur les niveaux d'antioxydants endogène (CAT, GSH) et/ou de leur insertion dans la membrane cellulaire pour empêcher l'oxydation des lipides en piégeant les radicaux libres ou en interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (**Fadel et al., 2015**). Par contre, à la dose de 800 mg/kg de poids corporel, les deux extraits ont provoqué une augmentation des niveaux de MDA qui n'est pas statistiquement significative dans le cas du traitement des souris avec *T. algerienses* par

rapport au groupe témoin ( $21.5 \pm 1.2$  nmol/g de tissu), mais assez élevée de  $22.3 \pm 0.4$  nmol/g de tissu pour *S. verbenaca*. Ce qui permet de suggérer que l'augmentation des niveaux de MDA dans cette expérience a peut-être été attribuée à des composés phénoliques ou à d'autres composés d'extrait de *S. verbenaca*. Les composés phénoliques sont connus pour agir comme pro-oxydants à des doses élevées (**Shahidi & Ambigaipalan, 2015**).

La variation de l'activité CAT et du taux de GSH accompagnée de la diminution du taux de MDA aux doses de 200 et 400 mg/Kg de poids corporel, sont des bons indicateurs de l'absence de tout effet nocif causé par l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* sur le tissu hépatique. Par conséquent, le traitement à l'extrait de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* à la limite de 400 mg/ kg pc à considérée comme non toxique pour le foie selon les indicateurs biochimiques sériques, le poids relatif du foie et l'amélioration du statut antioxydant du foie.





**Figure 15.** Estimation de l'activité de la catalase (Cat), du taux de glutathion réduit (GSH) et du malondialdéhyde (MDA) dans l'homogénat hépatique des souris traitées par l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* (A : CAT ; C : GSH ; E : MDA), *S. verbenaca* (B : CAT ; D : GSH ; F : MDA), l'acide ascorbique et du groupe témoin. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (n = 7). Les colonnes avec la même lettre indiquent un changement non significatif ( $P \leq 0.05$ ).

D'après l'analyse par l'UHPLC, l'amélioration de l'activité de la catalase et l'augmentation de taux de GSH accompagnée de la réduction de la peroxydation lipidique peut être attribué à la présence de composés phénoliques tels que l'acide rosmarinique le composé majeur de *T. algerensis* et *S. verbenaca*, l'acide rosmarinique a une faible perméation à travers les cellules intestinales en raison de son caractère hydrophile. Par conséquent, il peut être transporté par diffusion paracellulaire en faible quantité (**Wang et al., 2017**), ou par les transporteurs monocarboxylique (MCT) comme décrit pour les acides hydroxy benzoïques (**Falé et al., 2013**). Durant la digestion, les composés phénoliques peuvent être absorbés, dégradés et/ou conjugués. Dans ce cas, l'acide rosmarinique peut être dégradé en acide caféique et en acide *m*-coumarique qui est ensuite absorbé, donc l'activité observée peut être attribuer aux composés originaux ou à leurs dérivés (**Konishi et al., 2003**). Il a aussi été rapporté que l'acide rosmarinique a la capacité de s'insérer spontanément dans la membrane cellulaire, empêchant efficacement la peroxydation lipidique (**Fadel et al., 2015**) comme nous l'avons déjà montré par la protection de la membrane des globules rouges contre le radical peroxyde et dans le tissu hépatique en réduisant le taux de MDA.

Des travaux ont montré que la supplémentation en acide rosmarinique chez les souris augmentait l'activité des enzymes antioxydants (SOD, CAT et GPx) et réduisait la production du MDA dans le foie et les reins chez les souris normales/vieillissantes (**Chen et al., 2015 ; Alagawany et al., 2017**), ainsi que chez les rats déficients en œstrogènes (**Zych et al., 2019**). Ses activités peuvent être attribuées à sa structure centrale de caractère distinctif qui lui permet d'agir comme un puissant piègeur des radicaux libres, et même comme un modulateur d'enzymes antioxydants en agissant sur le facteur de transcription Nrf2, en augmentant la libération de Nrf2 à partir de Kelch-like ECH (Epichlorhydrine) associée à la protéine 1 (Keap1) et permettant son transport dans le noyau (**Cai et al., 2019 ; Tasi et al., 2019**). Le Nrf2 contrôle l'expression des composants clés du système antioxydants glutathion (GSH) et

thiorédoxine (TXN), ainsi que des enzymes impliquées dans la régénération du NADPH, du piégeage des ROS et la détoxification xénobiotique, jouant ainsi un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie redox dans la cellule (Tonelli et al, 2018). Outre l'acide rosmarinique, la lutéoline, la lutéoline-7-O-glucoside (Song & Park, 2013), l'ériodictyo-O-hexoside (Hu et al., 2012) et l'acide caféique (et al., 2018) renforcent également le potentiel antioxydant grâce à l'activation du Nrf2.

## 6.6. Activité anti-inflammatoire

### 6.6.1. Stabilisation membranaire

L'un des mécanismes par lequel les agents anti-inflammatoires exercent leur effet anti-inflammatoire, est l'inhibition de la libération d'enzymes lysosomales ou la stabilisation des membranes lysosomales dans les tissus inflammés. Étant donné que les membranes des globules rouges (RBC) sont similaires à la membrane lysosomale, l'inhibition de la lyse des globules rouges induite par l'hypotonie et l'hyperthermie a été utilisée en raison de sa simplicité et de sa reproductibilité en tant que modèles *ex vivo* pour tester le mécanisme possible de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *S. verbenacaet* de *T. algeriensis* (Anosike et al., 2012 ; Agarwal & Shanmugam, 2019).

Les composés phénoliques capables de piéger les radicaux libres se sont également révélés être pertinents dans la stabilisation des membranes cellulaires (Anosike et al., 2019). L'effet stabilisant de l'extrait *T. algeriensis* et *S. verbenaca* face à la lyse érythrocytaire vis-à-vis de l'hyperthermie et l'hypotonie a été évalué et les résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport à la concentration en extrait végétal utilisé et comparés au standard (Acide acétylsalicylique). Comme nous l'avons précédemment montré par le test d'hémolyse induit par l'AAPH, les deux extraits de *T. algeriensis* et de *S. verbenaca* sont capables de prévenir et de protéger les globules rouges contre les dommages causés par l'hémolyse oxydative.

Les résultats de l'effet des extraits de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* sur l'hémolyse des érythrocytes induite par l'hyperthermie et l'hypotonie sont illustrés dans le **tableau 19**. L'extrait de *T. algeriensis* inhibe l'hémolyse des globules rouges de manière concentration-dépendante de 100 à 600 µg/mL avec un effet maximal de  $94.4 \pm 1.3\%$  et  $80.0 \pm 0.4\%$  à 600 µg/mL vis-à-vis de l'hémolyse induit par l'hyperthermie et l'hypotonie respectivement tandis que *S. verbenaca* a une activité anti-hémolytique avec un pourcentage maximal de protection de  $93.1 \pm 1.7\%$  et  $71.5 \pm 0.9\%$  vis-à-vis de l'hémolyse induit par l'hyperthermie et l'hypotonie. Ces activités sont nettement supérieures à celles de l'Acide acétylsalicylique (34% et 67%) à la concentration de 400 µg/mL. L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la l'hyperthermie et l'hypotonie peut s'expliquer par l'interaction des composés constituant les extraits des deux plantes avec les protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation.

Compte tenu des similarités entre la membrane des érythrocytes et la membrane lysosomale, nous pouvons suggérer que les composés de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* pourrait protéger la membrane du lysosome de la lyse au cours des processus inflammatoires (**Murugesan et al., 2020**). Cela pourrait être attribué à la liaison des composés de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* aux membranes des érythrocytes avec une altération ultérieure des charges de surface des cellules. Ils peuvent empêcher l'interaction physique avec les agents d'agrégation ou favoriser la dispersion par répulsion mutuelle de charges similaires impliquées dans l'hémolyse des globules rouges (**Anosike et al., 2019**). De cette manière, la libération de contenu lysosomal pourrait être inhibée pendant les processus inflammatoires, ce qui provoquerait de multiples troubles sur le site de l'inflammation (**Anosik et al., 2012**).

**Tableau 19** : Effet anti-hémolytique des extrait hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, et des témoins (Acide acétylsalicylique).

Dose µg/mL	Hémolyse induite par hyperthermie (%)		Hémolyse induite par hypotonie (%)	
	<i>T.algeriensis</i>	<i>S. verbenaca</i>	<i>T.algeriensis</i>	<i>S. verbenaca</i>
100	35.6 <sup>d</sup> ± 1.7	45.4 <sup>d</sup> ± 1.5	53 <sup>c</sup> ± 2	49.5 <sup>c</sup> ± 4.5
200	79.2 <sup>c</sup> ± 1.7	58.5 <sup>c</sup> ± 5.7	68.2 <sup>b</sup> ± 1.5	67.1 <sup>b</sup> ± 1.7
400	82.5 <sup>b</sup> ± 1.0	78.4 <sup>b</sup> ± 1.7	75.2 <sup>a</sup> ± 4.3	69.0 <sup>b</sup> ± 5.0
600	94.4 <sup>a</sup> ± 1.4	93.1 <sup>a</sup> ± 1.7	80 <sup>a</sup> ± 0.4	71.5 <sup>a</sup> ± 0.9
A. acétylsalicylique 400	34.1 <sup>d</sup> ± 2.2	34.1 <sup>e</sup> ± 2.2	66.9 <sup>b</sup> ± 2.2	66.9 <sup>ab</sup> ± 2.2

Des lettres différentes en exposant dans la même colonne indiquent un changement significatif ( $P \leq 0.05$ ).

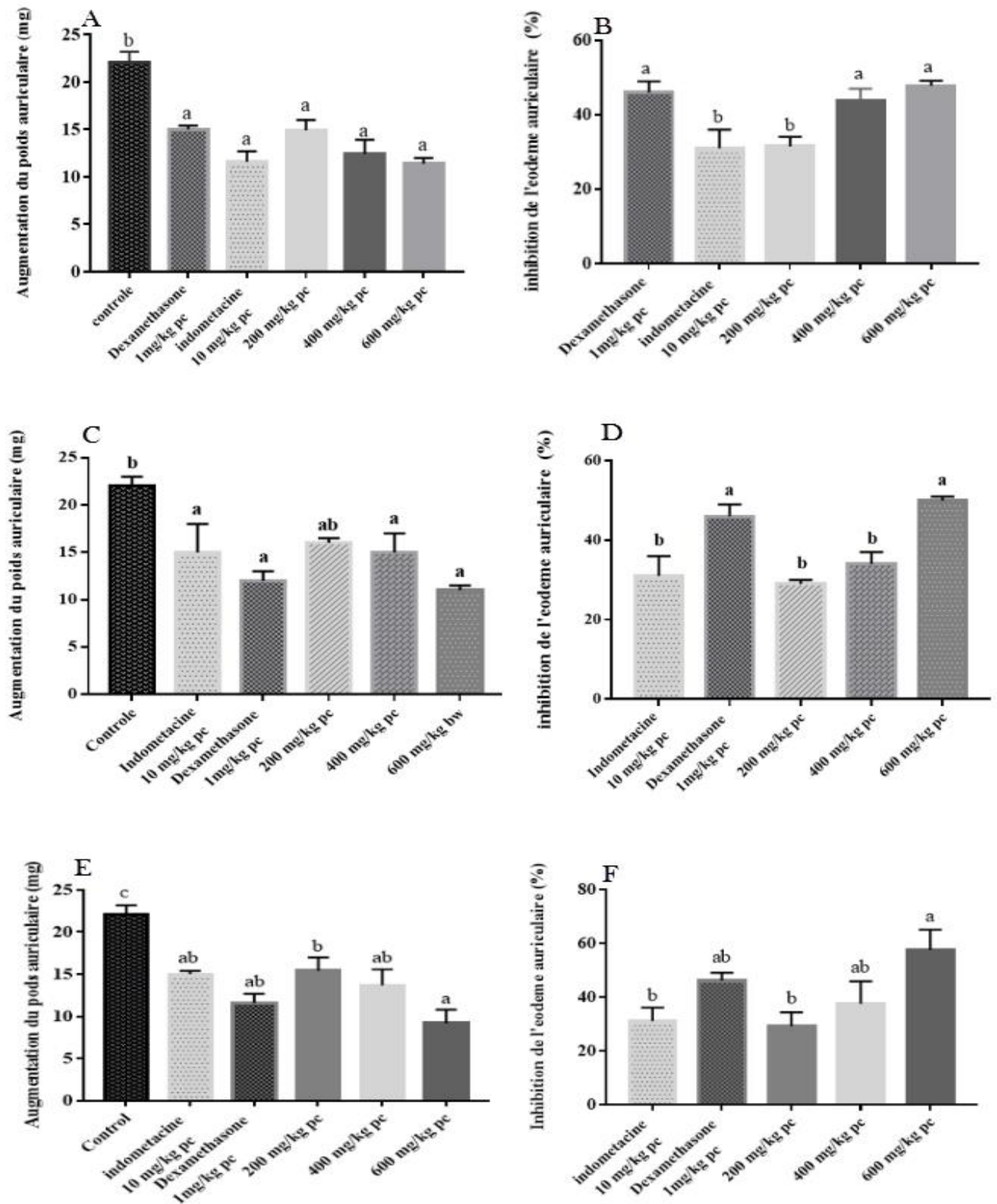
### 6.6.2. Œdème auriculaire induit par le xylène

Le modèle d'inflammation de l'oreille provoquée par l'application locale du xylène chez la souris a été utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, et les huiles essentielles de *T. algeriensis*. Ce test permet l'identification des agents antiphlogistiques stéroïdiens et non stéroïdiens, en particulier ceux qui inhibent la phospholipase A2 (PLA2). Cette enzyme est impliquée dans la libération de l'acide arachidonique et la formation subséquente de nombreux médiateurs potentiels impliqués dans la réponse inflammatoire (Bribi & Maiza, 2016). Le xylène agit comme un agent phlogistique, augmentant la perméabilité vasculaire et entraînant le développement d'un œdème qui est l'un des principaux signes de l'inflammation. Ce dernier peut être liée à la libération de neuropeptides tels que la substance P, un vasodilatateur puissant qui induit la production d'oxyde nitrique (NO') par les cellules endothéliales, provoquant une vasodilatation, une exsudation plasmatique et par conséquent la formation d'œdèmes (Torres-Rêgo et al., 2016). La formation d'œdème induite par le xylène est également associée à des niveaux accrus de phospholipase A2 et de myéloperoxydase (MPO).

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits sont répertoriés dans la **figure 16** et montrent une activité anti-inflammatoire dose-dépendante en réduisant l'inflammation induite par le xylène avec des taux d'inhibition allant de 50 à 58 %. L'augmentation du poids des oreilles reflète l'étendu de l'œdème. Après l'application du xylène sur l'oreille droite, les souris du groupe témoins ont développé un œdème d'un poids de  $22.5 \pm 1.1$  mg. Chez les souris du groupe traité par les huiles essentielles de *T. algeriensis*, on remarque une diminution très significative de  $13.7 \pm 1.8$  à  $9.2 \pm 1.6$  mg aux doses de 200 et 600 mg/kg de poids corporel en comparaison avec le groupe témoin (**figure 16.E**). Aux mêmes doses, les souris traitées par l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis*, une diminution du poids de l'oreille de  $14.9 \pm 1.1$  à  $11.4 \pm 0.64$  mg est également observée par rapport au groupe témoin (**figure 16.A**) et pour les souris traitées par l'extrait hydrométhanolique de *S. verbenaca* induit une réduction très significative de l'œdème de  $15.8 \pm 0.5$  à  $11.0 \pm 0.6$  mg (**figure 16.C**)

Les extraits des deux plantes et les huiles essentielles ont donc réduit efficacement l'inflammation de l'oreille droite avec un pourcentage d'inhibition le plus élevé de  $57.5 \pm 7.5\%$  obtenu avec les huiles essentielles de *T. algeriensis* à la dose de 600 mg/kg de poids corporel (**figure 16. E**), suivi de  $50 \pm 1.1 \%$  et  $47.8 \pm 1.4 \%$  correspondant à l'extrait de *S. verbenaca* (**figure 16.D**) et l'extrait de *T. algeriensis* (**figure 16.A**). Ces activités sont significativement différentes de celle de la dexaméthasone ( $46.2 \pm 2.9 \%$ ) et l'indométacine ( $31.4 \pm 5.5 \%$ ).

Les résultats obtenus à travers ce test montrent que les extraits des deux plantes présentent un effet anti-œdémogène et antiphlogistique importants, cela suggère que cet extrait pourrait agir sur la PLA2, la COX et/ou la lipo-oxygénase qui sont les principaux médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire induite par le xylène (**Rêgo Torres et al., 2016**). Les propriétés anti-inflammatoires de ces extraits seraient liées à leur composition chimique.



**Figure 16.** Effet des extraits hydrométhanoliques de *T. algeriensis* (A et B) et *S. verbenaca* (C et D), et les huiles essentielles de *T. algeriensis* (E et F) sur l'œdème auriculaire induit par le xylène. Les valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 6$  animaux/groupe. Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P \leq 0.05$ ).

Des travaux antécédents ont attribué les propriétés anti-inflammatoires de ces plantes à l'acide rosmarinique qui est un puissant agent anti-inflammatoire capable d'inhiber l'infiltration des neutrophiles et réguler aussi l'expression de l'ICAM-1, le VCAM-1 et la COX-2 (Osakabe *et al.*, 2004 ; Amoah *et al.*, 2016). Ce composé phénolique s'est avéré plus efficace pour neutraliser l'activité de PLA2 (Ticli *et al.*, 2005) et peut également agir par la modulation des voies liées au NF- $\kappa$ B donc l'expression des cytokine pro-inflammatoire (Rocha *et al.*, 2014). Outre l'acide rosmarinique, la lutéoline peut inhiber l'expression des gènes pro-inflammatoires, induite par le TNF dans les cellules épithéliales intestinales murines (Ruiz & Haller, 2006). De plus, les acides salvianoliques et particulièrement l'acide salvianolique B, un constituant majeur des espèces de *Salvia* peut être responsable de l'effet anti-inflammatoire de *S. verbenaca* en bloquant la libération de facteurs inflammatoires via l'inhibition du NF- $\kappa$ B. Les activités de *S. verbenaca* peuvent également être attribuées à d'autres composés tels que l'acide yunnaneique E dont les propriétés pharmacologiques n'ont pas encore été établies, contrairement à de nombreuses études qui ont affirmé le potentiel actif de l'acide caféique et de ses dérivés de comme l'acide rosmarinique (Krzyzanowska-Kowalczyk *et al.*, 2017).

L'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* peut être attribué à sa composition chimique et particulièrement en  $\alpha$ -terpinéol qui est capable d'inhiber l'activité du MPO (myéloperoxydase) et d'autres enzymes ou molécules pro-inflammatoires telles que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine et prostaglandines. L' $\alpha$ -terpinéol est également un excellent inhibiteur de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de l'activation de NF- $\kappa$ B (Da Silveira e Sá *et al.*, 2013 ; Khaleel *et al.*, 2018). Le linalol a également montré la capacité de modifier les voies de signalisation inflammatoires (Khaleel *et al.*, 2018) et de réguler la production de médiateurs pro-inflammatoires (Li *et al.*, 2015). Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'effet observé dans la présente étude peut



résulter de l'effet synergique des différents composants des huiles essentielles dont le mécanisme d'action reste à démontrer.

Il faut souligner que toutes les activités biologiques de l'extrait hydrométhanolique de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, ainsi que les huiles essentielles testées, peut également résulter de l'effet synergique de leurs composés. Néanmoins, pour les extraits hydromethanolique la relation directe de ces effets avec la présence de polyphénols n'est toujours pas possible à établir. Ces extraits contiennent toujours un mélange complexe de composés chimiques et d'autres composés inconnus résultant éventuellement de l'oxydation des polyphénols formés lors des procédés d'extraction. Par conséquent, il est difficile d'attribuer le potentiel antioxydant, antiinflammatoire ou antimicrobienne à un ou quelques composés bioactifs de l'extrait.

## Conclusion

Notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative, l'évaluations du potentiel antioxydants, antibactérien et anti-inflammatoire des extraits de *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca*.

Les effets *in vivo* montrent l'habilité des composés phénoliques à améliorer la capacité antioxydant du plasma, l'activité CAT, les niveaux de GSH et à réduire le niveau de MDA, sans provoquer d'effets toxiques sur le foie et les reins, ce qui permet l'usage de ces plantes sans risque de toxicité. En outre, *T. algeriensis* et *S. verbenaca* ont efficacement protégé les membranes des globules rouges contre différents types de stress (radicaux libres, hypotonicité et hyperthermie), et ont inhibé l'inflammation aiguë induite par le xylène. Ces propriétés étaient liées à la présence de l'acide rosmarinique et de ses dérivés, des dérivés glycosylés du kaempférol, de la lutéoline et aux triterpènes et dans les huiles ces propriétés étaient liées à la présence d' $\alpha$ -terpineol et du linalool. Sur la base de ces résultats, les activités observées de *T. algeriensis* et *S. verbenaca* peuvent être attribuées à sa composition en antioxydants/anti-inflammatoire, principalement, les composés phénoliques et les huiles essentielles. *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca* peuvent être utilisés en alimentation comme aliments fonctionnels, additifs ou pour le développement de nouveaux compléments alimentaires ayant des activités antioxydants/anti-inflammatoires.

Par ailleurs, l'effet pharmacologique de nos plantes a été mis en évidence par une évaluation de leurs propriétés antimicrobiennes. Il apparaît que ces plantes, possèdent des propriétés antimicrobiennes contre des souches Gram-positives et Gram-négatives, offrant un éventail de possibilités pour le développement de nouveaux agents antibactériens afin de lutter contre les souches résistantes, voire diminuer les effets secondaires des antibiotiques.

Nos travaux apportent quelques éléments pour la compréhension des activités biologiques de *T. algeriensis* et *S. verbenaca*, néanmoins, des études plus approfondies sont nécessaires pour :

- Elucider le mécanisme précis de l'effet anti-inflammatoire des deux plantes en étudiant son effet sur des enzymes inflammatoires (cyclooxygénases et lipoxygénases), des médiateurs pro-inflammatoires (IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ) et les voies de signalisations (NF- $\kappa$ B) impliquées dans la genèse de molécules pro inflammatoires
- Évaluer la bio-accessibilité et la biodisponibilité des composés identifiés par des modèles de digestion *in vitro* et *in vivo* afin de connaître les métabolites présents dans le plasma qui peuvent atteindre leurs sites d'action.

### Références bibliographiques

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural Polyphenols: An Overview. *International Journal of Food Properties*, 20 (8), 1689-1699.
- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, 11, 627–635.
- Adwas, A. A., Elsayed, A. S. I., Azab, E. A., & Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6 (1), 43–47.
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Neto, R. T., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2017). Health-promoting effects of *Thymus herba-barona*, *Thymus pseudolanuginosus*, and *Thymus caespititius* decoctions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1879–1893.
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Válega, M., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation. *Molecules*, 23, 1514–1528.
- Afzal-Rafii, Z. (1979). Contribution à l'étude cytotoxonomique du groupe *Salvia verbenaca* L. *Bulletin de La Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 126 (1), 79–86.
- Agarwal, H., & Shanmugam, V. K. (2019). Anti-inflammatory activity screening of *Kalanchoe pinnata* methanol extract and its validation using a computational simulation approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, 14, 6–14.
- Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in*
- Alagawany, M., Ezzat Abd El-Hack, M. E. A. E.-H., Farag, M. R., Gopi, M. G., Karthik, K. K., Malik, Y. S., & Dhama, K. (2017). Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*.

- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, *149* (151–158).
- Alfadda, A. A., & Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Aliahmat, N. S., Noor, M. R. M., Yusof, W. J. W., Makpol, S., Ngah, W. Z. W., & Yusof, Y. A. M. (2012). Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and *Chlorella vulgaris* in aging C57BL/6 mice. *Clinics*, *67*, 1447–1454.
- Allen, D. E., & Hatfield, G. (2004). *Medicinal Plants in Folk Tradition an ethnobotany of britain & ireland*. Portland: Timber Press.
- Amoah, S. K. S., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., & Biavatti, M. W. (2016). Rosmarinic acid—Pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Medica*, *82*, 388–406.
- Anosike, C. A., Igboegwu, O. N., & Nwodo, O. F. C. (2019). Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *9*, 278–284.
- Anosike, C. A., Obidoa, O., & Ezeanyika, L. U. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *20*(1): 76.
- Antonelli, M., & Kushner, I. (2020). It's time to redefine inflammation. *The FASEB Journal*, 1787–1179.
- Arauz, J., Ramos-Tovar, E., & Muriel, P. (2016). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annal of Hypatology*, *15* (2), 160–173.
- Arika, W., Nyamai, D., Osano, K., Ngugi, M., & Njagi, E. (2016). Biochemical Markers of *in vivo* hepatotoxicity. *Journal of Clinical Toxicology*, *6* (2).
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

- Asakura, H., & Kitahora, T. (2018). Antioxidants and polyphenols in inflammatory Bowel disease: ulcerative colitis and crohn disease. Polyphenols: Prevention and treatment of human Disease. In R. R. Watson, V. R. Preedy & S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease* (2 ed., pp. 279–292): Academic Press.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *43*, 385–406.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., & Özkan, H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, *44*, 247–252.
- Baghiani, A., Boussoualim, N., Trabsa, H., Aouachria, S., & Arrar, L. (2013). *In vivo* free radical scavenging, antihemolytic activity and antibacterial effects of *Anchusa azurea* extracts. *International Journal of Medical Sciences*, *46*, 1113-1118.
- Belkhiri, F., Baghiani, A., Zerroug, M. M., & Arrar, L. (2017). Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. Aerial part extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *14* (2), 273–281.
- Ben El Hadj Ali, I., Bahri, R., Chaouachi, M., Boussaïd, M., & Harzallah-Skhiri, F. (2014). Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Industrial Crops and Products*, *62*, 188–195.
- Ben El Hadj Ali, I., Guetat, A., & Boussaïd, M. (2012). Chemical and genetic variability of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae), a North African endemic species. *Industrial Crops and Products*, *40*, 277– 284.
- Ben ElHadj Ali, I., Zaouali, Y., Bejaoui, A., & Boussaïd, M. (2010). Variation of the chemical composition of essential oils in Tunisian populations of *Thymus algeriensis* Boiss.etReut. (Lamiaceae) and Implication for conservation. *Chemistry & Biodiversity*, *7*, 1276–1289.
- Ben Farhat, M., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Landoulsi, A., & Jordán, M. J. (2015). Antioxidant properties and evaluation of phytochemical composition of *Salvia verbenaca* L. extracts at different development stages. *Plant Foods Human Nutrition*, *70*(1), 15–20

- Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-hamada, R., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops & Products*, *49*, 373–379.
- Ben Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K., Chahed, T., & Marzouk, B. (2010). Essential oil composition of *Salvia verbenaca* L. Growing wild in Tunisia. *Journal of Food Biochemistry*, *34*, 142–151.
- Benabeda, K. H., Gourinea, N., Ouintena, M., Bombardab, I., & Yousfia, M. (2017). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of three Algerian *Lamiaceae* Species. *Current Nutrition and Food Science*, *13* (2), 97–109.
- Bendjabeur, S., Benchabane, O., Bensouici, C., Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Bitam, A. (2018). Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of food measurement & characterization*, *12*, 2278–2288.
- Benedetti, F., Curreli, S., Krishnah, S., Davinelli, S., Cocchi, F., Scapagnini, G., Gallo, R. C., & Zella, D. (2017). Anti-inflammatory effects of H<sub>2</sub>S during acute bacterial infection: a review. *Journal of Translational Medicine*, *15*, 100.
- Benkiniouar, R., Rhouati, S., Touil, A., Seguin, E., & Chosson, E. (2007). Flavonoids from *Thymus algeriensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, *43* (3), 321–322.
- Blekhiri, F. (2018). *Activité antimicrobienne et antioxydant de deux plantes médicinales: Salvia verbenaca et Lepidium sativum*. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif
- Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Grac, M., & Miguel. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, *46*, 85-96.
- Bribi , N., Belmouhoub, M., & Maiza, F. (2016). Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of *Fumaria capreolata*. *Phytothérapie*, *15* (4), 211–216.
- .
- Cai, X., Yang, F., Zhu, L., Xia, Y., Wu, Q., Xue, H., & Lu, Y. (2019). Rosmarinic acid, the main effective constituent of *Orthosiphon stamineus*, inhibits intestinal epithelial apoptosis via regulation of the Nrf2 pathway in mice. *Molecules*, *24*, 3027.

- Canzoneri, M., Bruno, M., Rosselli, S., Russo, A., Cardile, V., Formisano, C., Rigano, D., & Senatore, F. (2011). Chemical composition and biological activity of *Salvia verbenaca* essential oil. *Natural Product Communications*, 6, 1–4.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25.
- Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, d., Herakčić, M., & Satovic, Z. (2016). Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34 (5), 377–390.
- Chang, C. L., Lin, C. S., & Lai, G. H. (2012). Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Charami, M.-T., Lazari, D., Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Souleles, C., & Skaltsa, H. (2008). Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 22, 450–454.
- Chatterjee, M., Saluja, R., Kanneganti, S., Chinta, S., & M, D. (2007). Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 53, 84–93.
- Chatterjee, S. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In T. Dziubla & D. A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials* (pp. 35–58): Academic Press.
- Chen, L., Deng, H., Li, Y., Cui, H., Wang, X., Fang, J., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9 (6), 7204–7218.
- Chen, X., Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., & Lu, Q. (2015). Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food & function*, 6, 927–931.
- Cheong, M. W., Chong, Z. S., Liu, S. Q., Zhou, W., Curran, P., & Yu, B. (2012). Characterization of calamansi (*Citrus microcarpa*). Part I: Volatiles, aromatic profiles and phenolic acids in the peel. *Food Chemistry*, 134, 686–695.



- Cheong, M.-W., Loke, X.-Q., Liu, S.-Q., Kiki, P., Curran, P., & Yu, B. (2011). Characterization of volatile compounds and aroma profiles of Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) blossom and peel. *Journal of Essential Oil Research*, 23, 34–44.
- Choi, J. S. (2017). Larvicidal effects of grapefruit seed extract (GSE) on brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 9 (3), 209–214.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In R. A. Greenwald (Ed.), *handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 283–284). Boca Raton: CRC Press.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Dyatmiko, W., & Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144–1152.
- Coelho, E., Rocha, M.A.M., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A., 2014 Microwave superheated water and dilute alkali extraction of brewers' spent grain arabinoxylans and arabinoxylo-oligosaccharides, *Carbohydrate Polymers* 99, 415– 422.
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71 (3), 564–578.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska Stanoeva, J., Petreska, J., Karapandzova, M., Stefova, M., & Dimitrovska B, S. K. A. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A*, 1282, 38–45.
- Da Silveira e Sá, R. D. C., Andrade, L. N., & De Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18, 1227–1254.
- Daels-Rakotoarison, D. A., Seidel, V., Gressier, B., Brunet, C., Tillequinc, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M., & Cazin, J.-C. (2000). Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. *Drug Research*, 51 (1), 16–23.
- Dailey, A., & Vuong, Q. V. (2015). Effect of extraction solvents on recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Cogent Food & Agriculture*, 1, 1115646.

- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Gómez-Mejía, E., Madrid, Y., Baali, F., & Bedjoua, F. (2020). Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, *132*, 204–214.
- Delanaye, P., Cavalier, E., & Pottel, H. (2017). Serum creatinine: Not so simple! *Nephron*, *136*, 302–308.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, M. V. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Di Tizio, A., Łuczaj, Ł. J., Quave, C. L., Redžić, S., & Pieroni, A. (2012). Traditional food and herbal use of wild plants in the ancient South-Slavic diaspora of Mundimitar/ Montemitro (Southern Italy). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *8*(1), 21.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, *97*, 654–660.
- Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. In J. Bouayed & T. Bohn (Eds.), *Nutrition, Well-Being and Health*: intechopen.
- Douar-Latreche, S., Benchabane, O., Sahraoui, N., Hazzit, M., Mouhouche, F., & Baaliouamer, A. (2018). Effect of gamma irradiation on the chemical composition and antioxidant activity of *Thymus algeriensis* extracts. *Journal of essential oil bearing plants*, *21*, 449–461.
- Ekor, M. (2013). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, *4* (3), 202–204.
- El Ouariachi, E. m., Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J., Paolini, J., & Chetouani, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4* (4), 281–286.
- El-Boshy, M. E., Refaat, B., Qasem, A. H., Khan, A., Ghaith, M., Almasmoum, H., Mahbub, A., & Almainani, R. A. (2019). The remedial effect of *Thymus vulgaris* extract against lead toxicity-

- induced oxidative stress, hepatorenal damage, immunosuppression, and hematological disorders in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (22), 1–11.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Elshafie, H. S., & Camele, I. (2017). An overview of the biological effects of some Mediterranean essential oils on human health. *BioMed Research International*.
- Engwa, G. A. (2018). Free radicals and their role of plant phytochemicals as antioxidants against oxidative stress-related diseases. In T. Asao (Ed.), *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*.
- Ennulat, D., Walker, D., Botts, F. C. S., Mark, M.-S., & Boone, L. (2010). Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man. *Toxicologic Pathology*, 38(5), 810–828.
- Et-touys, A., Fellah, H., Sebti, F., Mniouil, M., Aneb, M., Elboury, H., Talbaoui, A., Dakka, N., Sadak, A., & Bakri, Y. (2016). *In vitro* Antileishmanial activity of extracts from endemic Moroccan medicinal plant *Salvia verbenaca* ( L .) Briq . ssp *verbenaca* Maire ( *S . clandestina* Batt . non L ). *European Journal of Medicinal Plants*, 16, 1–8.
- Fadel, O., El Kirat, K., & Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta journal*, 1808, 2973–2980.
- Falé, P. L., Ascensao, L., & Serralheiro, M. L. (2012). Effect of luteolin and apigenin on rosmarinic acid bioavailability in Caco-2 cell monolayers. *Food & function*, 4, 426–431.
- Fernandes, P. A. R., Ferreira, S. S., Bastos, R., Ferreira, I., Cruz, M. T., Coelho, E., Passos, P., & Coimbra, M. A. (2019b). Apple pomace extract as a sustainable food ingredient. *antioxidant*, 8, 189–204.
- Fernandes, P. A. R., Silva, A. M. S., Evtuguin, D. V., Nunes, F. M., Wessel, D. F., Cardoso, M., & Coimbra, M. A. (2019a). The hydrophobic polysaccharides of apple pomace. *Carbohydrate Polymers*.
- Finney, D. J. (1971). Probit analysis probit analysis. 264–268.

- Fischer, A., Grab, W., & Schieberle, P. (2008). Characterisation of the most odour-active compounds in a peel oil extract from Pontianak oranges (*Citrus nobilis* var. *Lour. microcarpa* Hassk.). *European Food Research and Technology*, 227, 735–744.
- Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews : Drug discovery*, 15, 551–567.
- Ghisalberti, E. L. (2008). Detection and isolation of bioactive natural products. In S. M. Colegate & R. J. Molyneux (Eds.), *Bioactive natural products detection, isolation, and structural determination* (2 ed., pp. 11–65). New York: CRC Press.
- Giweli, A. A., Džamić, A. M., Soković, M. D., Ristić, M. S., & Marin, P. D. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Central European Journal of Biology*, 8 (5), 504–511.
- González, J. A., García-Barriuso, M., & Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 343–355.
- Grand View Research, 2019. Polyphenols market size, share & trends analysis report by product (grape seed, green tea, cocoa), by application (beverages, food, feed, dietary supplements, cosmetics), and segment forecasts, 2019-2025.
- Guarrera, P. M., & Savo, V. (2016). Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 202–234.
- Guesmi, F., Ben Ali, M., Barkaoui, T., Tahri, W., Mejri, M., Ben-Attia, M., Bellamine, H., & Landoulsi, A. (2014). Effects of *Thymus hirtus* sp. *algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae) essential oil on healing gastric ulcers according to sex. *Lipids in Health and Disease*, 13.
- Guesmi, F., Ben Hadj Ahmed, S., & Landoulsi, A. (2017). Investigation of extracts from Tunisian ethnomedicinal plants as antioxidants, cytotoxins, and antimicrobials. *Biomedical and Environmental Sciences*, 30, 811–824.
- Guesmi, F., Saidi, I., Bouzenna, H., Hfaiedh, N., & Landoulsi, A. (2019). Phytochemical variability, antioxidant and antibacterial activities, anatomical features of glandular and

- aglandular hairs of *Thymus hirtus* Willd. Ssp. *algeriensis* Boiss. and Reut. over developmental stages. *South African Journal of Botany*, 127, 1–10.
- Gulsunoglu, Z., Karbancioglu-Guler, F., Raes, K., & KilicAkyilmaz, M. (2019). Soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of various industrial plant wastes. *International Journal of Food Properties*, 22 (1), 1501–1510.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 809–812.
- Hall, A. P., Elcombe, C. R., Foster, J. R., Harada, T., Kaufmann, W., Knippel, A., Kuttler, K., Malarkey, D. E., Maronpot, R. R., Nishikawa, A., Nolte, T., Schulte, A., Strauss, V., & York, M. J. (2012). Liver hypertrophy. *Toxicologic Pathology*, 407, 971–994.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, 116, 714–721.
- Hea, L., Hea, T., Farrarb, S., Jia, L., Liua, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44, 532-553.
- Hu, Q., Zhang, D. D., Wang, L., Lou, H., & Ren, D. (2012). Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1927–1932.
- Hussain, t., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, a. N. (2016). Oxidative stress and Inflammation: What polyphenols can do for us? *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2018). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In P. Builders (Ed.), *Herbal Medicine* (pp. 12–30): intechopen.

- Ibrahim, B., Sowemimo, A., Rooyen, A. V., & Venter, M. V. D. (2012). Antiinflammatory , analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* ( Linn .) Blume ( Amaranthaceae ). *Journal of Ethnopharmacology*, *141*, 282-289.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*, 287–293.
- Jánošková, N., Vyviurska, O., & Špánik, I. (2014). Identification of volatile organic compounds in honeydew honeys using comprehensive gas chromatography. *Journal of Food and Nutrition Research*, *53* (4), 353–362.
- Jaouadi, R., Cardoso, S. M., Silva, A. M. S., Ben, I., Yahia, H., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2018). Variation of phenolic constituents of Tunisian *Thymus capitatus* ( L .). *Biochemical Systematics and Ecology*, *77*, 10–15.
- Jha, N., Ryun, J. J., Choi, E. H., & Kaushik, N. K. K. (2017). Generation and role of reactive oxygen and nitrogen species induced by plasma, lasers, chemical agents, and other systems in dentistry. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- 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. *Journal of Food Science*, *75*, 59–65.
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P., & Viljoen, A. M. (2008). South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, *119*, 664–672.
- Kaska, A., Çiçek, M., Deniz, N., & Mammadov, R. (2018). Investigation of phenolic content, antioxidant capacities, anthelmintic and cytotoxic activities of *Thymus zygioides* griseb. *Journal of Pharmaceutical Research International*, *21* (1), 1–13.
- Kawahara, N., Tamura, T., Inoue, M., Hosoe, T., Kawai, K.-i., Sekita, S., Satake, M., & Goda, Y. (2004). Diterpenoid glucosides from *Salvia greggii*. *Phytochemistry*, *65*, 2577–2581.

- Kaya, A., Dinç, M., Doğu, S., & Demirci, B. (2016). Compositions of essential oils of *Salvia adenophylla*, *Salvia pilifera*, and *Salvia viscosa* in Turkey. *Journal of Eessential Oil research*, *12*, 40–48.
- Khaleel, C., Tabanca, N., & Buchbauer, G. (2018).  $\alpha$ -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chemistry*, *16*, 349–361
- Khalil, M. Y., Moustafa, A. A., & Naguib, N. Y. (2007). Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, *3*, 451–457.
- Khanna, H., Karki, K., Pande, D., Negi, R., & Khanna, R. (2014). Inflammation, free radical damage, oxidative stress and cancer. *Interdisciplinary Journal of Microinflammation*, *1* (1).
- Khled Khoudja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, *52*, 177–182.
- Kim, J., & Park, I.-K. (2008). Fumigant toxicity of Korean medicinal plant essential oils and components from *Asiasarum sieboldi* root against *Sitophilus oryzae* L. *Flavour and Fragrance Journal*, *23*, 79–83.
- Kolac, U. K., Ustuner, M. C., Tekin, N., Ustuner, D., Colak, E., & Entok, E. (2017). The anti-inflammatory and antioxidant effects of *Salvia officinalis* on lipopolysaccharide-induced inflammation in Rats. *Journal of Medicinal Food*, *20* (12), 1–8.
- Konishi, K., Kobayashi, S., & M. Shimizu, T. (2003). Tea polyphenols , inhibit the transport of dietary phenolic acids mediated Intestinal, the monocarboxylic acid transporter (MCT) in Caco-2 cell monolayers. *Journal Agriculter and Food Chemistry*, *51*, 7296–7302.
- Kouache, B., Brada, M., Saadi, A., Fauconnier, M. L., Lognay, G., & Heuskin, S. (2017). Chemical composition and acaricidal activity of *Thymus algeriensis* essential oil against *Varroa destructor*. *Natural Product Communications*, *12* (1), 135–138.
- Krzyzanowska-Kowalczyk, J., Kolodziejczyk-Czepas, J., Kowalczyk, M., Pecio, Ł., Nowak, P., & Stochmal, A. (2017). Yunnaneic Acid B, a Component of *pulmonaria officinalis* extract,

- prevents Pproxynitrite-induced oxidative stress *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (19), 3827–3834.
- Lasekan, O., & See, N. S. (2015). Key volatile aroma compounds of three black velvet tamarind (Dialium) fruit species. *Food Chemistry*, 186, 561–565.
- Le, K., Chiu, F., & Ng, K. I. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353–363.
- Li, Y., Lv, O., Zheng, Y., Zhou, F., Li, Q., & Wu, Z. (2015). Linalool inhibits LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating Nrf2. *Neurochemistry Research*, 40 (7), 1520-1525.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8), 118–126.
- Logarto, P., Silva, Y., Guerra, S., & Iglesias, B. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8, 395-400.
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197–202.
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological chemistry*, 395 (2), 203–230.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Markham, K. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press.
- Mbaebie, B., Edeoga, H., & Afolayan, A. (2012). Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 118–124.



- Megdiche-ksouri, W., Saada, M., Soumay, B., Snoussi, M., Zaouali, Y., & Ksouri, R. (2015). Potential use of wild *Thymus algeriensis* and *Thymus capitatus* as source of antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of new sciences Agriculture and Biotechnology*, *23*, 1046–1056.
- Mehalaine, S., Belfadel, O., Menasria, T., & Messaili, A. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three medicinal plants from Algerian Semi-Arid climatic zone. *Phytothérapie*, *16*(1), 155–163.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. A., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & Mclaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal plant research*, *45*, 31–34.
- Mihai, S., Codrici, E., Popescu, I. D., Enciu, A.-M., Albulescu, L., Necula, L. G., Mambet, C., Anton, G., & Tanase, C. (2018). Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome. *Journal of Immunology Research*.
- Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., & Niki, E. (1987). Free radical chain oxidation of erythrocytes by molecular oxygen and its inhibition by  $\alpha$ -tocopherol. *rchives biochemistry biophysics*, *258*, 373–380.
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., Teeling, J. L., Blaak, E. E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H. J., Kremer, B. H. A., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M. M., Williams, C. M., & Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, *114*, 999–1012.
- Mirjalili, M. H., Ayyari, M., Bakhtiar, Z., Farimani, M. M., & Sonboli, A. (2015). Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Research Journal of Pharmacognosy*, *2* (2), 27-32.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, *63* (1), 68–78.
- Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvatescu, C. A., Mironescu, A., Dracea, L., & Ples, L. (2016). The role of natural polyphenols in the prevention and treatment of cervical cancer—An overview. *Molecules*, *21*(8), 1055.

- Moussa, Z., Judeh, Z. M. A., & Ahmed, S. A. (2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In K. K. Das, S. Das, M. S. Biradar, V. Bobbarala & S. S. Tata (Eds.), *Free Radical Medicine and Biology*.
- Mrduljaš, N., Krešić, G., & Bilušić, T. B. (2017). Polyphenols: Food sources and health benefits. In M. C. Hueda (Ed.), *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*: intechopen.
- Murugesan, S., Venkateswaran, M. R., Jayabal, S., & Periyasamy, S. (2020). Evaluation of the antioxidant and anti-arthritis potential of *Zingiber officinale* Rosc. by *in vitro* and *in silico* analysis. *South African Journal of Botany*, *130*, 45–53.
- Mustafa, G., Arif, R., Atta, A., Sharif, S., & Jamil, A. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants and their importance in drug discovery in Pakistan. *Matrix Science Pharma*, *1* (1), 17–26.
- Nadipelly, J. (2017). Molecular mechanisms involved in inflammatory cascade: A Review. *Texila International Journal of Basic Medical Science*, *2* (1).
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. D., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, *6*, 1451–1474.
- Neurath, M. F. (2019). Resolution of inflammation: from basic concepts to clinical application. *Seminars in Immunopathology*, *41*, 627–631.
- Ngamukote, S., Sirikwanpong, S., Khannongpho, T., Dahlan, W., Siriwatanapaiboon, M., & Adisakwattana, S. (2016). *Moringa oleifera* leaf extract increases plasma antioxidant status associated with reduced plasma malondialdehyde concentration without hypoglycemia in fasting healthy volunteers. *Chinese Journal of Integrative Medicine*.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, *5*, 27986–28006.
- Nunes, A. C. F. (2020). Introductory chapter: Overview of the cellular and molecular basis of inflammatory process. In A. C. F. Nunes (Ed.), *Translational Studies on Inflammation*: intechopen.
- Okhawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, *95*, 351–358.

- Organisation for Economic Co-operation and Development(OECD).(2011). *Acute Oral Toxicity – AcuteToxic Class Method Test no 423*.InGuidelines for the testing of chemicals.
- Osakabe, N., Takano, H., Sanbongi, C., Yasuda, A., & Yanagisawa, R. (2004). Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid ( RA ); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis ( SAR ) and its mechanism. *BioFactors*, 21, 127–131.
- Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. In S. J. T. Gowder (Ed.), *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*.
- Pereira, D. A. M. (2014). *Medicinal plants : Antioxidant properties, traditional uses and conservation strategies*. New York: Nova Science publisher. Inc.192.
- Pereira, O. R., & Cardoso, S. M. (2013). Overview on *Mentha* and *Thymus*polyphenols. *Current Analytical Chemistry*, 9, 382–396.
- Pereira, R., Catarino, M. D., Afonso, A. F., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* decoctions: Antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules*, 23, 3169–3185.
- Perveen, h. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. In h. Perveen & A. Al-Taweel (Eds.), *Terpenes and Terpenoids*: intechopen.
- Phaniendra, A., Babu Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30 (1), 11–26.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., & Loukis, A. (2006). Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. *Flavor and Fregrence Journal*, 21, 670–673.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Pohanka, M. (2013). Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia Microbiologica*, 58 (6), 503–513.

- Pratt, D., & Diez, A. (2018). Kidney in heart failure. *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*, 155–165.
- 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 E1. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396–3402.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales* (Vol. 2). Paris: Editions CNRS.
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J. C. F., Pasquali, M. A. B., Rabie, S. M. S., Pires, A. S., Schröder, R., Rabelo, T. K., Santos, J. P. A., Lima, P. S. S., Cavalcanti, S. C. H., Araújo, A. A. S., Quintans, J. S. S., & Gelain, D. P. (2013). Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and geranyl acetate in experimental models. *ISRN Toxicology*.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*.
- Rašić, I., Azra, R., Akšamija, & Radović, S. (2018). The relationship between serum level of malondialdehyde and progression of colorectal cancer. *Acta Clinica Croatica*, 57, 411–416.
- Rasouli, H., Hosein Farzei, M., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 1700–1741
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Guido, F., Kiliñarslan, Ö., Mammadov, R., & Bardaweel, S. K. (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic

- extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 146.
- Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, R., Duarte, C., Serra, T., Pinto, R., Freitas, M., Fernandes, E., Silva-Lima, B., Mota-Filipe, H., & Sepodes, B. (2014). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 116 (5), 398-413.
- 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. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008.
- Ruiz, P., & Haller, D. (2006). Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *The journal of nutrition*, 136 (3), 664-671.
- San, A., Fahim, M., Campbell, K., Hawley, C. M., & Johnson, D. W. (2018). The role of oxidative Stress and systemic inflammation in kidney disease and its associated cardiovascular risk. In P. Atukeren (Ed.), *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*: intechopen.
- Sang-aroon, W., Tontapha, S., & Amornkitbamrung, V. (2019). Photovoltaic performance of natural dyes for dye-sensitized solar cells: a combined experimental and theoretical study. In M. Soroush & K. K. S. Lau (Eds.), *Dye-Sensitized Solar Cells: Mathematical Modelling and Materials Design and Optimization* (pp. 203–229): Elsevier Inc.
- Santos, J. D. C., Coelho, E., Henriques, I., & Coimbra, M. A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* byproducts essential oils. *Industrial Crops & Products*, 137, 541–548.
- Sauerschnig, C., Doppler, M., Bueschl, C., & Schuhmacher, R. (2017). Methanol generates numerous artifacts during sample extraction and storage of extracts in metabolomics research. *Metabolites*, 8 (1), 1.
- Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nature communications*, 9(1), 3261.

- Schreiner, L., Bauer, P., & Buettner, A. (2018). Resolving the smell of wood identification of odour-active compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Scientific Reports*, 8(1).
- Seeman, P., & Weinstein, J. (1966). Erythrocyte membrane stabilization by tran-quilizers and antihistaminics. *Biochemical Pharmacology*, 15, 1737–1752
- Sesti, F., Tsitsilonis, O. E., Kotsinas, A., & Trougakos, I. P. (2012). Oxidative Stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis. *In vivo*, 26, 395–402.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of functional foods*, 18, 820–897.
- Sharma, N. S. (2014). Free radicals, antioxidants and disease. *Biology and Medicine*, 6 (3), 1000214.
- Shehab, N. G., Abu-Gharbieh, E., & Bayoumi, F. A. (2015). Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *Complementary and Alternative Medicine*, 15, 401-412.
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., & Li, P. (2010). Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe*, 16, 380386.
- Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N. (1999). Membrane stabilizing activity a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70, 251–257.
- Sies, H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In (pp. 153–159).
- Silva, A. M., Martins-Gomes, C., Souto, E. B., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., & Nunes, F. M. (2020). *Thymus zygis* subsp. *zygis* an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities. *Antioxidants*, 9 (6), 482–502.
- Singleton, V. L., & Rosi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Song, Y. S., & Park, C. M. (2013). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 70–75.

- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 (1), 200–208.
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14, 2167–2180.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W.-P.-P., & Rahman, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.
- Tasi, C. F., Wu, J. Y., & Hsu, Y. W. (2019). Protective effects of Rosmarinic acid against selenite-induced cataract and oxidative damage in rats. *International journal of medical sciences*, 16, 729–740.
- Ticli, F. K., Hage, L. I. S., Cambraia, R. S., Pereira, P. S., Magro, A. J., Fontes, M. R. M., Stabeli, R. G., Giglio, J. R., França, S. C., Soares, A. M., & Sampaio, S. V. (2005). Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxico*, 46, 318–327.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29 (17), 1727–1745.
- Torres-Rêgo, M., Furtado, A. A., Bitencourt, M. A. O., Lima, M. C. J. d. S., De Andrade, R. C. L. C., De Azevedo, E. P., Soares, T. d. C., Tomaz, J. C., Lopes, N. P., Da Silva-Júnior, A. A., Zucolotto, S. M., & Fernandes-Pedrosa, M. d. F. (2016). Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246.
- Ugwah-Oguejiofor, C. J., Okoli, C. O., Ugwah, M. O., Umaru, M. L., Ogbulie, C. S., Mshelia, H. E., Umar, M., & Njan, A. A. (2019). Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. *Heliyon*, 5, e01179.
- Ur-Rehman, A., Mannan, A., Inayatullah, S., Akhtar, M. Z., Qayyum, M., & Mirza, B. (2009). Biological evaluation of wild thyme (*Thymus serpyllum*). *Pharmaceutical Biology*, 47 (7), 628–633.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M. T. D., Mazura, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Vazquez-Medina, J. P. (2017). Redox signaling and the onset of the inflammatory cascade. In S. Chatterjee, W. Jungraithmayr & D. Bagchi (Eds.), *Immunity and Inflammation in Health and Disease Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support*. United States: Academic Press.
- Vostinaru, O., Codruta, S. H., & Filip, L. (2020). Safety profile of essential oils. In M. S. d. Oliveira (Ed.), *Essential Oils - Bioactive compounds, new perspectives and applications*: IntechOpen.
- Wang, J., Li, G., Rui, T., Kang, A., Li, G., Fu, T., Li, J., & Cai, B. (2017). Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC- MS / MS: absolute bioavailability and dose proportionality. *RSC Advances*, 7, 9057–9063.
- Wang, L., Hu, G., Lei, L., Lin, L., Wang, D., & Wu, J. (2016). Identification and aroma impact of Volatile Terpenes in Moutai Liquor. *International Journal of Food Properties*, 19, 1335–1352.
- Ward, P. A. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In C. N. Serhan, P. A. Ward & D. W. Gilroy (Eds.), *Fundamentals of Inflammation* (pp. 1-17). New York: Cambridge university press.
- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5, 472–484.
- Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., & Huang, R. (2015). Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk. *Food Chemistry*, 173, 194–202.
- Yabrir, B., Touati, M., Adli, B., Bezini, E., Ghafoul, M., Khalifa, S., & Guit, B. (2018). Therapeutic use of spontaneous medicinal flora from an extreme environment (*dune cordon*) in Djelfa region, Algeria. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 6 (5), 358–373.
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10.



- Yasutomo, K. (2016). Genetic Dissection of Autoinflammatory Syndrome. In M. Miyasaka & K. Takatsu (Eds.), *Chronic Inflammation Mechanisms and Regulation* (pp. 63–79). Japan: Springer.
- Zhang, C., Wang, N., Xu, Y., Tan, H.-Y., Li, S., & Feng, Y. (2018). Molecular mechanisms involved in oxidative stress-associated liver injury induced by Chinese herbal medicine: An experimental evidence-based literature review and network pharmacology study. *International Journal of Molecular Sciences*, *19* (9), 27–45.
- Zheng, Y.-Z., Zhou, Y., Guo, R., Fu, Z.-M., & Chen, D.-F. (2019). Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: Effect of ester groups at the end of the carbon side chain. *LWT - Food Science and Technology*, *120*, 108932.
- Ziani, B. E. C., Heleno, S. A., Bachari, K., & Inês, M. (2019). Phenolic compounds characterization by LC-DAD- ESI / MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss . & Reut . and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*, *116*, 312–319.
- Zimmermann, B. F., Walch, S. G., Ngaba, L., Stühlinger, W., & Lachenmeier, D. W. (2011). Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. ( sage tea ). *Journal of Chromatography B*, *879*, 2459–2464.
- Zouari, N., Ayadi, I., Fakhfakh, N., Rebai, A., & Zouari, S. (2012). Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic Species. *Lipids in Health and Disease*, *11*(1), 28.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouarid, S., Bougatefc, A., Karraya, A., Neffatid, M., & Ayadi, M. A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut (Lamiaceae). *food and bioproducts processing*, *89*, 257–265.
- Zych, M., Wojnar, W., Dudek, S., & Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2019). Rosmarinic and sinapic acids may increase the content of reduced glutathione in the lenses of estrogen-deficient rats. *Nutrients*, *11*, 803–814.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي، ملامح السمية، النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للالتهاب للمستخلصات الهيدروميتاتولية والزيت الأساسية من نبتة الزعيرة (*Thymus algeriensis*) والمريمية (*Salvia verbenaca*) واللذان تستخدمان على نطاق واسع في الطب الشعبي الجزائري. كان مردود عملية الاستخلاص الهيدروميتاتولي مماثلاً لكلا النبتتين، بينما احتوى مستخلص الزعيرة على كميات أعلى من المركبات الفينولية ( $303.8 \pm 2.5$  ميكروغرام / مغ) وكان حمض الروزمارينيك المركب الرئيسي في كلا المستخلصين. كان مردود الزعيرة 1.7 % من الزيوت العطرية التي تميزت بغناها بمركبات من نوع المونوتربينول وخاصة الفاتربينيول واللينالول. أظهر مستخلص الزعيرة التأثير الأفضل ضد DPPH<sup>+</sup> ( $IC_{50} = 7.4 \pm 0.3$  ميكروغرام / مل)، ABTS<sup>+</sup> ( $IC_{50} = 206.6 \pm 3.0$  ميكروغرام / مل)، بيروكسيد الهيدرودين ( $IC_{50} = 192.2 \pm 3.5$  ميكروغرام / مل) وانحلال الدم التأكسدي ( $72.6 \pm 7.5$  ميكروغرام / مل). بالإضافة إلى قدرته على تثبيط أكسدة البيتا-كاروتين بنسبة  $90.3 \pm 2.5$  %، وقدرته الارجاعية الجيدة ( $0.0 \pm 5.3$  ملي مول معادل لـ  $FeSO_4$  / مغ) مع قوة اجمالية مضادة للأكسدة قدرت ب  $267.7 \pm 3.5$  ميكروغرام معادل لحمض الاسكوربيك /مع، في حين أن مستخلص المرهمية أظهر أفضل النتائج في اختبار استخلاص الحديد ( $189.3 \pm 7.9$  ميكروغرام / مل). الزيوت الأساسية من الزعيرة كانت أكثر فعالية ضد بيروكسيد الهيدروجين ( $500.4 \pm 20.4$  ميكروغرام / مل) مع قدرة اجمالية مضادة للأكسدة قدرت ب  $313.9 \pm 2.6$  ميكروغرام معادل لحمض الاسكوربيك /مع، ومع ذلك، كانت أقل فعالية ضد DPPH<sup>+</sup>، و ABTS<sup>+</sup> بالإضافة إلى قدرتي استخلاص و ارجاع ضعيفتين مقارنة بمستخلصي الهيدروميتاتول. لم تُلاحظ أي علامات سمية أثناء دراسة السمية الحادة على الفئران حيث قدرت الجرعة الوسطية المميئة بقيمة أعلى من 2000 مغ / كغ من وزن الجسم. أدى العلاج اليومي للفئران باستخدام مستخلصي الهيدروميتاتول للزعيرة والمريمية إلى تحسين قدرة مضادات الأكسدة في البلازما وحالة الأكسدة في الكبد عن طريق رفع مستويات الكاتلاز والجلوتاثيون وتقليل بيروكسيد الدهون. علاوة على ذلك، فإن كل من المستخلصين بتركيز 400 ميكروغرام / مل، يثبطان انحلال الدم الناتج عن خفض التوتر بنسب  $75 \pm 4$  و  $69 \pm 5$  % على التوالي، وانحلال الدم الناتج عن ارتفاع الحرارة بنسب  $85 \pm 1$  و  $78 \pm 2$  % على التوالي. بالإضافة إلى فاعليتهما في تثبيط وذمة الأذن التي يسببها الزيلين بنسبة 50% تقريباً لكل من المستخلصين. بينما كانت الزيوت العطرية أكثر فاعلية في تثبيط وذمة الأذن بنسبة  $57.5 \pm 7.5$  % بنفس الجرعة (600 مغ / كغ من وزن الجسم). في الختام، يمكن استنتاج أن كل من الزعيرة والمريمية نبتتان امنيتين بجرعة محدودة بلغت 2000 مغ / كغ. احتوت المستخلصات والزيوت الأساسية المختبرة لنبته الزعيرة والمريمية على خصائص قوية مضادة للأكسدة، مضادة للبكتيريا ومضادة للالتهابات سواء في المختبر أو في الجسم الحي بسبب مركباتها النشطة بيولوجياً، مما يجعلها مرشحة ممتازين لتطوير عقاقير جديدة، أو كجزء من تركيبات الطعام لتطوير الأطعمة الوظيفية.

**الكلمات المفتاحية:** *Thymus algeriensis*؛ *Salvia verbenaca*؛ مضادات الأكسدة؛ مضاد التهاب؛ السمية؛ حمض روزمارينيك؛ الفا-ترينول

## Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer les compositions chimiques, les profils toxicologiques, l'activité antioxydants et anti-inflammatoires des extraits hydrométhanoliques et des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et de *Salvia verbenaca*, largement utilisées dans la médecine populaire Algérienne. L'extraction hydrométhanolique a donné des rendements comparables pour les deux plantes. L'extrait de *Thymus algeriensis* (TACE) a montré des quantités plus élevées des composés phénoliques ( $303.8 \pm 2.5$  µg EAG / mg) avec l'acide rosmarinique comme composé majeur dans les deux extraits. *Thymus algeriensis* a donné 1.7 % d'huiles essentielles qui ont été caractérisés par leur richesse en monoterpénols, en particulier l' $\alpha$ -terpinéol et le linalol. Les tests *in vitro*, TACE a montré les meilleurs effets contre DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et hémolyse oxydative avec  $IC_{50} = 7.4 \pm 0.3$  µg/mL,  $206.6 \pm 3.0$  µg/mL,  $192.2 \pm 3.5$  µg/mL et  $72.6 \pm 7.5$  µg/mL, respectivement. Les résultats du test de  $\beta$ -carotène/acide linoléique ont révélé que le TACE a inhibé le blanchiment du  $\beta$ -carotène à  $90.3 \pm 2.5$ %. En outre, il a eu un bon pouvoir réducteur ( $5.3 \pm 0.0$  mmol FeSO<sub>4</sub>/mg) et une capacité antioxydant totale ( $267.7 \pm 3.5$  µg EAA/mg). Tandis que l'extrait de *Salvia verbenaca* (SVCE) a présenté une meilleure activité de chélation du fer ( $189.3 \pm 7.9$  µg/mL). Les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* (TAHE) ont été efficaces contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $500.4 \pm 20.4$  µg/mL) avec une capacité antioxydants totale estimée à  $313.9 \pm 2.6$  µg EAA/mg. Cependant, ils ont été moins efficace contre le DPPH<sup>+</sup>, l'ABTS<sup>+</sup>, et ils ont eu une faible capacité de chélation et de réduction par rapport aux extraits hydrométhanoliques. Dans l'étude *in vivo*, aucun signe de toxicité n'a été observé au cours des études de toxicité aiguë et la DL<sub>50</sub> a été estimé à plus de 2000 mg/kg pc. Le traitement quotidien avec TACE et SVCE a amélioré la capacité antioxydants du plasma et l'état redox hépatique en augmentant les niveaux de catalase et de glutathion réduit et en diminuant la peroxydation lipidique. De plus, la TACE et la SVCE, à une concentration de 400 µg / mL, ont inhibé l'hémolyse induite par l'hypotonie avec des pourcentages de  $75 \pm 4$  et  $69 \pm 5$ %, respectivement, et l'hémolyse induite par l'hyperthermie avec des pourcentages de  $85 \pm 1$  et  $78 \pm 2$ %, respectivement. TACE et SVCE ont réduit l'œdème auriculaire induit par le xylène de près de 50 % pour les deux extraits. Alors que les huiles essentielles ont donné la meilleure inhibition de l'œdème de l'oreille avec  $57.5 \pm 7.5$ % à la même dose (600 mg / kg de poids corporel). En conclusion, on peut déduire que *Thymus algeriensis* et *Salvia verbenaca* sont sans danger à la dose limite de 2000 mg / kg. Les extraits et huiles essentielles testés ont eu de puissantes propriétés antioxydants, antibactériennes et anti-inflammatoires à la fois *in vitro* et *in vivo* en raison de leurs composés bioactifs, ce qui en fait d'excellents candidats pour le développement de nouveaux médicaments ou dans le cadre de formulations alimentaires pour le développement d'aliments fonctionnels.

**Mots clés:** *Thymus algeriensis*, *Salvia verbenaca*, antioxydant, anti-inflammatoire, toxicité, acide rosmarinique,  $\alpha$ -terpinéol.

## Abstract

The aim of this study is to determine the chemical compositions, toxicological profiles, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the hydromethanolic extracts and essential oils of *Thymus algeriensis* and *Salvia verbenaca*, which are widely used in Algerian folk medicine. The hydromethanolic extraction gave comparable yields for both plants. *Thymus algeriensis* extract (TACE) contained higher amounts of phenolic compounds ( $303.8 \pm 2.5$  µg GAE/mg) with rosmarinic acid as major compound in both extracts. *Thymus algeriensis* yielded 1.7 % of essential oils that were characterized by their richness with monoterpeneols especially  $\alpha$ -terpineol and linalool. *In vitro* assays, TACE showed the best effects against DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxidative hemolysis with  $IC_{50} = 7.4 \pm 0.3$  µg/mL,  $206.6 \pm 3.0$  µg/mL,  $192.2 \pm 3.5$  µg/mL and  $72.6 \pm 7.5$  µg/mL, respectively. Result of  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay revealed that TACE inhibited the  $\beta$ -carotene bleaching with  $90.3 \pm 2.5$ %. Also, it had good reducing power ( $5.3 \pm 0.0$  mmol FeSO<sub>4</sub>/mg) and total antioxidant capacity ( $267.7 \pm 3.5$  µg AAE/mg). Whereas, *Salvia verbenaca* extract (SVCE) presented a better iron chelating activity ( $189.3 \pm 7.9$  µg/mL). The essential oils of *Thymus algeriensis* (TAHE) were effective against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $500.4 \pm 20.4$  µg / mL) with an estimated total antioxidant content of  $313.9 \pm 2.6$  µg EAA/mg. However, it was less effective against DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>, and it had poor chelating and reducing ability compared to hydromethanolic extracts. TACE and SVCE showed poor activity against the five tested bacterial strains compared to TAHE. *In vivo* study, no signs of toxicity were observed during acute toxicity studies and LD<sub>50</sub> was estimated to be higher than 2000 mg/kg bw. Daily treatment with TACE and SVCE improved the plasma antioxidant capacity and the hepatic redox state by increasing the levels of catalase and reduced glutathione and reducing lipid peroxidation. Moreover, both TACE and SVCE, at a concentration of 400 µg / mL, inhibited hypotonic-induced hemolysis with percentages of  $75 \pm 4$  and  $69 \pm 5$ %, respectively, and hyperthermia-induced hemolysis with percentages of  $85 \pm 1$ . and  $78 \pm 2$ %, respectively. TACE and SVCE reduced xylene-induced ear edema by nearly 50% for both extracts. Whereas, essential oils gave the best inhibition in ear edema with  $57.5 \pm 7.5$ % at the same dose (600 mg/kg BW). In conclusion, it can be deduced that *Thymus algeriensis* and *Salvia verbenaca* are safe at the limit dose of 2000 mg/Kg. The tested extracts and essential oils had potent antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory properties both *in vitro* and *in vivo* owing to their bioactive compounds, which make them excellent candidates for the development of new drugs, or as part of food formulations for the development of functional foods.

**Keywords:** *Thymus algeriensis*; *Salvia verbenaca*; antioxidant; anti-inflammatory; toxicity; rosmarinic acid;  $\alpha$ -terpineol