

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES**



Faculté des sciences

## Thèse de Doctorat

Présenté par :

**M<sup>lle</sup> LOTMANI Zineb**

En vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT LMD** en :

**Filière** : Sciences Biologiques

**Option** : Biochimie appliquée

## Potentielles applications des huiles essentielles (Thym et de Citronnelle) comme conservateur nutraceutique naturel

### Devant le jury composé de :

Mme	YAHIAOUI	Karima	Pr	UMBB	Présidente
Mme	KEBBOUCHE-GANA	Salima	Pr	UMBB	Examinatrice
Mme	SADAOUI-SMADHI	Nesrine	M	UMBB	Examinatrice
Mr	FERHAT	Mohamed Amine	Pr	ENS de Kouba	Examinateur
Mr	BOUKHATEM	Mohamed Nadjib	Pr	SDUB	Directeur de thèse
Mr	BOUDJEMA	Khaled	Pr	UMBB	Co-directeur de thèse

Année Universitaire 2024/2025

### REMERCIEMENTS

*En premier et avant tout, je tiens à remercier DIEU le tous puissant qui m'a guidé et m'a accordé de la volonté, de la patience, du courage et de la persévérance pour mener à bien ce travail.*

*Ce travail a été réalisé dans plusieurs laboratoires et a nécessité la collaboration et l'implication de plusieurs personnes. Comme pour confirmer le proverbe africain qui dit « une seule main ne peut nouer un paquet ». Alors, je tiens à remercier toutes les mains qui, d'une manière ou d'une autre ont participé à l'aboutissement de ce travail.*

*Cette thèse a été réalisée au niveau du Laboratoire de Recherche en Technologie Alimentaire (LRTA) de l'université de M'hamed Bougara de Boumerdes, dirigé par le Pr. MZ. MESSAOUD-BOUREGHDA et au niveau du Laboratoire Ethnobotanique et Substance Naturelles de l'ENS de Kouba dirigé par le Pr KAMELI Abdelkrim. Je souhaite tous les deux les remercier ici pour l'accueil et les facilités qu'ils m'ont octroyé au sein de leurs laboratoires.*

*Je tiens à remercier d'abord mon directeur de thèse Mr BOUKHATEM Mohamed Nadjib, Professeur à l'université de Blida qui a bien voulu m'encadrer et pour m'avoir donné la chance de réaliser un projet dans lequel j'ai beaucoup appris. Je le remercie également pour ses qualités humaines et sa compréhension tout au long de ces années de travail.*

*Dans un deuxième temps, je remercie également mon co-directeur de Recherche, Mr BOUDJEMA Khaled, Pr à l'université de Boumerdes pour son aide et pour la qualité et la précision des conseils prodigués.*

*Je remercie Mme YAHIAOUI. Professeur de m'avoir honoré en acceptant la présidence de ce jury de thèse. Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury, Mr FERHAT. Professeur à l'ENS de Kouba, Mme KEBBOUCHE-GANA. Professeur et Mme SADAoui-SMADHI. MCA qui ont accepté d'évaluer ce travail.*

*Un merci tout particulier à Dr. BENABDELKADER pour ses conseils inestimables et son aide qui l'est tout autant. Par ailleurs, le travail n'aurait jamais pu être complété sans l'aide du Pr. TOMI Felix et du Dr. TOMI pierre qui nous ont permis de réaliser une analyse GC/MS de qualité au sein du Laboratoire de chimie et de Biomasse de l'université de Corse. Nous tenons à les remercier tout particulièrement. De plus, nous tenons sincèrement à remercier Dr. OVIDI Elisa qui nous a permis de tester la cytotoxicité de nos huiles essentielles au sein de son laboratoire.*

*Nous tenons aussi à remercier chaleureusement Dr KELLOU et Dr. BENELMOUFFOK du service de Mycologie de l'institut PASTEUR d'Alger pour leur accueil et leur précieuse aide.*

*Nos recherches n'auraient pas été possibles sans les facilités octroyées par Mr. NAIT SAADA Isghi, chef de département des réactifs de laboratoire de l'institut Pasteur d'Alger. Nous tenons également à remercier, Mme AZINE Kenza, la directrice du laboratoire de Pharmacologie du CRD du laboratoire pharmaceutique Saidal (Djasr Kasentina), Mme BELKADI Asma, Dr vétérinaire de l'animalerie du CRD de SAIDAL et Mme BENALI, chef du Laboratoire d'Anatomie et de Cytopathologie Vétérinaire de l'institut Pasteur (Annexe el Hamma, Alger) pour leur accueil et leur aide précieuse.*



## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*Mes Parents*

*Aucune phrase ne saurait exprimer le profond amour et respect que je vous porte dans mon cœur. Je vous remercie infiniment pour votre soutien infaillible et pour les sacrifices que vous avez consenti afin de me permettre de faire aboutir ce travail. C'est grâce à votre éducation et aux valeurs que vous m'avez inculquées que j'ai pu persévérer et ne pas baisser les bras quelles que soient les conditions. Vous êtes la lanterne qui m'indique le chemin.*

*Que Dieu le tout-puissant vous procure santé, bonheur et longue vie.*

*Mes frères, mes cousines, mes tantes, toute la famille pour leur aide et leur soutien. Je leur exprime ici ma grande gratitude.*

*A ma chère partenaire dans les difficultés et dans les aventures :HAMIDA*

*La sororité n'est pas uniquement héréditaire, mais un lien qui se construit. Un simple merci ne suffira jamais à te témoigner ma profonde estime et mon éternelle gratitude.*

*A mes amies et mes collègues de travail : Younes, Houda, Ouiza, qui m'ont aidé à achever ce travail.*

*Zineb*

## RESUME

Ce travail vise à évaluer la potentielle utilisation des deux huiles essentielles (HEs) du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* comme agents de conservation naturels pour les boissons.

L'analyse chimique de l'HE du *T. vulgaris* a identifié le carvacrol (68,29 %) comme composé majoritaire. Alors que pour celle de l'HE du *C. nardus* c'est le citronellal (37,1 %) qui domine. L'étude de toxicité aiguë orale a permis de déduire que les deux HEs présentent une dose létale médiane (DL50) supérieure à 2000mg/kg. Les deux HEs ont aussi exposé une faible cytotoxicité envers deux lignées cellulaires (MDA et MCF-10A). L'HE du *T. vulgaris* a présenté une forte action antiradicalaire pour les deux tests ABTS et DPPH. En revanche, l'HE du *C. nardus* a exposé une faible activité antioxydante pour les deux tests. Les activités antibactérienne et antifongique des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont été évaluées en utilisant le test de diffusion sur disque et vapeur. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont aussi été évaluées. Les phases liquide et vapeur de l'HE du *T. vulgaris* ont présenté un puissant effet antibactérien contre la majorité des souches bactériennes testées. De plus, les phases liquide et vapeur de l'HE ont exposé un puissant effet antifongique envers les souches de levures et de moisissures testées. Les phases liquide et vapeur de l'HE du *C. nardus* ont présenté une puissante action antibactérienne envers les souches bactériennes testées, ainsi qu'une puissante action antifongique. Ensuite, le potentiel conservateur de l'HE du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a été évalué envers une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dans un système alimentaire (boisson commerciale Orangina®) en comparaison avec deux conservateurs chimiques (le benzoate de sodium et le sorbate de potassium). Les HEs ont été testées à quatre concentrations différentes (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6 µL/mL) seules et associées à un chauffage modéré (70 °C / 2 min). Les deux HEs ont présenté un effet conservateur significativement supérieur sur la réduction de la viabilité des cellules de *S. cerevisiae* par rapport à celui des conservateurs chimiques ( $p < 0,0001$ ) pendant les 8 jours de stockage. De plus, l'HE du *C. nardus* a complètement inhibé la croissance cellulaire de *S. cerevisiae* à partir du deuxième jour de stockage pour les quatre concentrations testées. Néanmoins, l'association des deux HEs avec un chauffage thermique modéré n'a pas induit un effet antifongique significativement supérieur comparativement à son absence ( $p > 0,05$ ).

En outre, une évaluation *in silico* des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des composés des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a aussi été effectuée. Les résultats ont indiqué que les deux HEs présentent une bonne biodisponibilité orale. Enfin, une étude de docking moléculaire a examiné le mécanisme d'action du carvacrol et du citronellal envers trois enzymes (ERG2, ERG3 et ERG11) impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol et donc essentielles à la viabilité de l'espèce *S. cerevisiae* en comparant avec deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium). Le carvacrol et le citronellal ont fortement interagi avec les trois enzymes ciblées, ce qui confirme que le mode d'action du carvacrol et du citronellal est associé à la membrane plasmique fongique. Nos résultats ouvrent la perspective d'utiliser les HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* comme conservateur alimentaire naturel pour les boissons.

**Mots clés :** *Thymus vulgaris* ; *Cymbopogon nardus* ; Huile essentielle ; Carvacrol ; Citronellal ; Toxicité ; Antifongique ; *Saccharomyces cerevisiae* ; Conservateur alimentaire naturel ; Boisson Orangina® ; Docking moléculaire.

## ABSTRACT

This work aims to evaluate the potential use of two essential oils (EOs) of *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon nardus* as natural beverage preservatives.

Chemical analysis of *T. vulgaris* EO identified carvacrol (68.29 %) as the main compound. While for *C. nardus* EO identified citronellal (37.1%) as the predominant compound. Acute oral toxicity study of both EOs made it possible to deduce that their LD50 (median lethal dose) is superior to 2000 mg/kg. Both EOs exhibited low cytotoxicity toward two cell lines (MDA and MCF-10A). The antioxidant activity of both *T. vulgaris* and *C. nardus* EOs was evaluated by both DPPH and ABTS tests. *T. vulgaris* EO exhibited strong free radical scavenging activity for both ABTS and DPPH assays. In contrast, *C. nardus* EO exhibited low antioxidant activity for both assays. The antibacterial and antifungal activities of *T. vulgaris* and *C. nardus* EOs were assessed using the disc and vapour diffusion tests. The minimum inhibition concentrations (MIC) were also evaluated. The liquid and vapour phases of *T. vulgaris* EO exhibited potent antibacterial effects against the tested bacterial strains. Besides, the liquid and vapour phases of the EO exhibited a potent antifungal effect against the tested strains of yeast and mould. The liquid and vapour phases of *C. nardus* EO exhibited a potent antibacterial action against tested bacterial strains, as well as a potent antifungal action. Then, the preservative potential of *T. vulgaris* and *C. nardus* EO was evaluated against *Saccharomyces cerevisiae* strain in a food system (commercial beverage Orangina®) in comparison with two chemical preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate). The EOs were tested at four different concentrations (0.6, 1.25, 4 and 6 µL/mL) alone and associated with moderate heating (70 °C / 2 min). Both EOs exhibited a significantly superior preservative effect on reducing *S. cerevisiae* cell viability compared to chemical preservatives ( $p < 0.0001$ ) during the 8 days of storage. In addition, *C. nardus* EO completely inhibited *S. cerevisiae* cell growth from the second day of storage for the four tested concentrations. Nevertheless, the association of both EOs with moderate thermal heating didn't induce a significantly superior antifungal effect compared to its absence ( $p > 0.05$ ).

Also, an *in silico* evaluation of the physicochemical and pharmacokinetic properties of both *T. vulgaris* and *C. nardus* EOs compounds was also realised. The results indicated that both EO's major compounds don't present any particular toxicity and have good oral absorption. Finally, a molecular docking study investigated the mechanism of action of carvacrol and citronellal against three enzymes (ERG2, ERG3 and ERG11) involved in ergosterol biosynthesis and thus essential for the viability of *S. cerevisiae* comparing with two chemical preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate). Carvacrol and citronellal strongly interacted with the three target enzymes, confirming that carvacrol and citronellal mode of action is associated with the fungal plasma membrane. Our results open the perspective of *T. vulgaris* and *C. nardus* EOs use as natural food preservatives.

**Keywords:** *Thymus vulgaris*; *Cymbopogon nardus* ; Essential oil ; Carvacrol ; Citronellal ; Toxicity ; Antifungal ; *Saccharomyces cerevisiae* ; natural food preservative ; Orangina® drink ; Molecular docking.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم الاستخدام المحتمل للزيتين العطريين للنباتين *Thymus vulgaris* و *Cymbopogon nardus* كحافظين طبيعيين للمشروبات.

حدد تحليل الكروماتوغرافيا الغازية والكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة للزيت العطري للنبات *T. vulgaris* أن الكارفاكول (68.29%) هو المركب الرئيسي. بينما حدد زيت نبتة *C. nardus* السيترونيلال (37.1%) كمركب سائد. دراسة السمية الفموية الحادة لكلا الزيتين العطريين مكنت من استنتاج أن الجرعة LD50 (الجرعة المميتة النصفية) تفوق 2000 مغ / كغ. كذلك، أظهر كلا الزيتين العطريين سمية منخفضة تجاه سلالتين من الخلايا (MDA و MCF-10A). تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لكل من الزيوت العطرية للنباتين *T. vulgaris* و *C. nardus* من خلال الاختبارين DPPH و ABTS. أظهر الزيت العطري لنبات *T. vulgaris* نشاطاً قوياً كمضاد للأكسدة لكلا الاختبارين ABTS و DPPH. في المقابل، أظهر الزيت العطري لنبات *C. nardus* نشاطاً مضاداً للأكسدة منخفضاً لكلا الاختبارين. لقد تم تقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا والفطريات لكلا الزيوت العطرية للنباتين *T. vulgaris* من خلال اختبار الانتشار باستعمال الأقراص والبخار وتم أيضاً تقييم MICs (التركيز المثبط الأدنى). أظهر الطور السائل والبخاري للزيت العطري لـ *T. vulgaris* تأثيراً قوياً مضاداً للبكتيريا التي تم اختبارها. كما أظهرت الطور السائل والبخاري للزيت العطري تأثيراً مضاداً للفطريات قوياً ضد سلالات الفطريات الخيطية والخمائر المختبرة. أظهر الطوران السائل والبخاري للزيت العطري للنبات *C. nardus* تأثيراً قوياً مضاداً للبكتيريا ضد معظم البكتيريا المختبرة، بالإضافة إلى فعالية قوية ضد الفطريات. بعد ذلك، تم تقييم الإمكانيات الحافظة للزيوت العطرية للنباتين *T. vulgaris* و *C. nardus* ضد سلالة *Saccharomyces cerevisiae* في نظام غذائي (مشروب تجاري أورانجينا®) بالمقارنة مع اثنين من المواد الحافظة الكيميائية (بنزوات الصوديوم وسوربات البوتاسيوم). تم اختبار الزيوت العطرية عند أربع تركيزات مختلفة (0.6 و 1.25 و 4 و 6 ميكرو لتر/مل) وحدها ومقرونة بتسخين خفيف (70 درجة مئوية / دقيقتين). أظهر كلا الزيتين العطريين تأثيراً حافظاً متوقفاً بشكل ملحوظ في تقليل قابلية خلايا *S. cerevisiae* للبقاء مقارنة بالمواد الحافظة الكيميائية ( $p < 0.0001$ ) خلال 8 أيام من التخزين. بالإضافة إلى ذلك، فإن الزيت العطري للنبات *C. nardus* ثبت تماماً نمو خلايا *S. cerevisiae* من اليوم الثاني للتخزين للتركيزات الأربعة المختبرة. ومع ذلك، فإن ربط الزيوت العطرية بالتسخين الحراري المعتدل لم يظهر فعالية مضادة للفطريات فائقة بشكل ملحوظ مقارنة بغيابه ( $p > 0.05$ ). تم إجراء تقييم حاسوبي للخصائص الفيزيوكيميائية والدوائية لكل مركبات الزيتين العطريين للنباتين *T. vulgaris* و *C. nardus*. أشارت النتائج إلى أن المركبات الرئيسية للزيتين العطريين لا تظهر أي سمية معينة ولديها امتصاص فموي جيد. أخيراً، بحثت دراسة الالتحام الجزيئي في آلية عمل الكارفاكول والسيترونيلال ضد ثلاث إنزيمات (ERG2 و ERG3 و ERG11) تشارك في التخليق الحيوي للإرغوستيرول، وهو ضروري لبقاء السلالة الفطرية *S. cerevisiae* ومع المقارنة مع اثنين من المواد الحافظة الكيميائية (بنزوات الصوديوم وسوربات البوتاسيوم). تفاعل الكارفاكول والسيترونيلال بقوة مع الإنزيمات المستهدفة الثلاث، مما يؤكد أن طريقة عمل الكارفاكول والسيترونيلال مرتبطة بالعشاء البلازمي للفطريات. نتانجنا نتفح آفاق استخدام الزيوت العطرية للنباتين *T. vulgaris* و *C. nardus* كمواد حافظة طبيعية للأغذية.

**الكلمات المفتاحية:** *Thymus vulgaris*; *Cymbopogon nardus*; زيت عطري; كارفاكول; سيترونيلال; سمية; مضاد للفطريات; *Saccharomyces cerevisiae*; حافظ طبيعي للأغذية; مشروب أورانجينا®; الالتحام الجزيئي.

## Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADH	Alcool déshydrogénase
ADME	Absorption distribution métabolisme et excrétion
ADP	Adénosine diphosphate
AFNOR	Association française de normalisation
AKR	Aldo-kéto réductase
AMP	Adénosine monophosphate
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	Polydiméthylsiloxane
Castp	Computed Atlas of Surface Topography of proteins
CDP-ME	4-Cytidine 5-diphospho-2-C-méthyl érythritol
CI50	Concentration inhibitrice 50
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CYP	Cytochrome P450
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FPP	Farnésyl diphosphate
ERG	Ergostérol
Da	Dalton
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DPPH•	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DXP	1-Déoxy-D-xylulose 5-phosphate
DZI	Diamètre de la zone d'inhibition
EF	Elongation factor 1-alpha
EGF	Facteur de croissance épidermial

ERA	Les espèces réactives d'oxygène
RE	Réticulum endoplasmique
ERN	Les espèces réactives d'azote
ESOL	Estimated solubility
eV	Electron-volt
FBS	Sérum bovin foetal
FPP	Farnésyl diphosphate
FPPS	Farnésyl diphosphate synthase
HDS	4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthétase
(HMBPP)	Hydroxy-méthylbutényl 4-diphosphate
HMG-Coa	3-Hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A
HMGR	HMG-Coa réductase
HMGS	HMG-Coa synthétase
IP	Isopentényl phosphate
IDI	Isopentényl diphosphate isomérase
IPK	Isopentényl phosphate kinase
ITS	Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GGPP	Géranylgéranyl diphosphate
GI	Gastrointestinal
GPP	Géranyl diphosphate
GPSS	Le GPP synthétase
GC/FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GC/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GN	Gélose nutritive
h	Heure
HE	Huile essentielle
Liaison H	Liaison hydrogène
MCT	2-C-Méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl transférase
MEP	Voie du Méthylérythritol phosphate
(ME 2,4CPP)	2-C-Méthylérythritol 2,4-cyclodiphosphate
MH	Mueller Hinton
Min	Minute
MK	Mévalonate kinase
MM	Masse moléculaire

MPD	Mévalonate phosphate décarboxylase
MVA	Acide mévalonique
MVAP	Voie de l'acide mévalonique
NCBI	National Center for Biotechnology Information
IPP	Isopentényl diphosphate
IR	Indice de rétention
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OPP	Groupement pyrophosphate
p.c	Poids corporel
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
Pgp	P-glycoprotéine
PSA	Polar surface area
RE	Réticulum endoplasmique
SAB	Sabouraud
SC	Sérum de cheval
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System
tr	Trace
TR	Temps de rétention
TPS	Terpènes synthétases
UFC	Unité formant colonie

## Nomenclature et abréviation des acides aminés

Acide aminé	Code à 3 lettres
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Asparagine	Asn
Aspartique	Asp
Cystéine	Cys
Glutamine	Gln
Acide glutamique	Glu
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Méthionine	Met
Phénylalanine	Phe
Proline	Pro
Serine	Ser
Thréonine	Thr
Tryptophane	Trp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Exemple de deux phénylpropanoïdes présents dans les HEs	7
2	Schéma représentant les étapes de synthèse des terpènes dans les	8
3	Etapes enzymatiques de la voie de mévalonate	9
4	Schéma illustrant la biosynthèse des terpènes (Bohlmann et Keeling,	10
5	Photo réelle de la plante <i>Thymus vulgaris</i> (Encyclopedia of life)	13
6	Représentation de l'espèce de plante <i>C. nardus</i> (Florilegius, 2013)	17
7	Exemple de quelques antioxydants	21
8	Cellule de levure et ses principaux organites (Tofalo <i>et al.</i> , 2016).	23
9	Composition de la paroi cellulaire de la souche de levure <i>S. cerevisiae</i>	23
10	Schéma illustrant les étapes clés de biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons (Jordá et Puig, 2020)	25
11	Structure chimique du benzoate de sodium	26
12	Structure chimique du sorbate de potassium	27
13	Etapes typiques d'un docking moléculaire (Aurélien, 2007)	29
14	Formation d'une liaison hydrogène (Gerschel, 2012)	30

<b>15</b>	Formation d'une interaction hydrophobe (Gerschel, 2012)	31
<b>16</b>	Répartitions des lots de souris	37
<b>17</b>	Gavage des animaux	38
<b>18</b>	Découpage et fixation des organes	39
<b>19</b>	Enrobage des fragments d'organes dans de la paraffine	40
<b>20</b>	Coloration des coupes	41
<b>21</b>	Principe du test MTT (Prakash <i>et al.</i> , 2011)	43
<b>22</b>	Principe du test DPPH (Liang et Kitts, 2014)	44
<b>23</b>	Principe du test ABTS (Echegaray <i>et al.</i> , 2021)	45
<b>24</b>	Principe de la méthode de diffusion sur disque (a) et celle de la microatmosphère (b) (Zaika, 1988)	48
<b>25</b>	Photos illustrant la préparation des flacons et le dispositif de filtration sur membrane.	53
<b>26</b>	Incubation des boîtes de pétri contenant les membranes filtrantes	54
<b>27</b>	Interface de PubChem	56
<b>28</b>	Interface du site Web SwissADME	59
<b>29</b>	Introduction des structures canoniques (SMILES) de toutes les molécules constituant de l'HE du <i>T. vulgaris</i> dans la fenêtre de prédiction du site WEB SwissADME	60
<b>30</b>	Introduction des structures canoniques (SMILES) de toutes les molécules constituant de l'huile essentielle du <i>C. nardus</i> dans fenêtre de prédiction du site WEB	60
<b>31</b>	Structure tertiaire du C-8 stérol isomérase (ERG2)	64
<b>32</b>	Structure tertiaire du C-5 stérol désaturase (ERG3)	65
<b>33</b>	Structure tertiaire du Lanostérol 14 alpha-déméthylase (ERG11) Complexée avec l'inhibiteur Fluconazole dans son site actif	65
<b>34</b>	Sélection des acides aminés pour définir le site de liaison de la protéine grâce à la l'interface du logiciel Arguslab	66
<b>35</b>	Fenêtre permettant de régler les paramètres du docking moléculaire réalisé avec le logiciel Arguslab	67
<b>36</b>	Pourcentage de chaque catégorie de molécules présentes dans l'HE du <i>Thymus vulgaris</i>	70
<b>37</b>	Les principales molécules constituant l'HE du <i>T. vulgaris</i>	70

<b>38</b>	Pourcentage de chaque catégorie de molécules présentes dans l'HE du <i>C. nardus</i>	74
<b>39</b>	Les principales molécules constituant l'HE du <i>C. nardus</i> .	74
<b>40</b>	Suivi pondéral des animaux après administration de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	77
<b>41</b>	Suivi pondéral des animaux après administration de l'HE du <i>C. nardus</i>	79
<b>42</b>	Évaluation de l'action cytotoxique de l'HE du <i>T. vulgaris</i> en fonction de sa concentration (mg/mL)	81
<b>43</b>	Évaluation de l'action cytotoxique de l'HE du <i>C. nardus</i> en fonction de sa concentration (mg/mL)	83
<b>44</b>	Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'HE du <i>T. vulgaris</i> sur le radical DPPH	85
<b>45</b>	Cinétique d'activité antioxydante de l'HE du <i>T. vulgaris</i> sur le radical ABTS	85
<b>46</b>	Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'HE du <i>C. nardus</i> sur le radical DPPH	87
<b>47</b>	Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'HE du <i>C. nardus</i> sur le radical ABTS	88
<b>48</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>T. vulgaris</i> envers les espèces bactériennes par test de diffusion sur disque utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque)	91
<b>49</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>T. vulgaris</i> envers les espèces bactériennes par test de diffusion vapeur en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque)	92
<b>50</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>C. nardus</i> envers les espèces bactériennes par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque)	96
<b>51</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>C. nardus</i> envers les espèces bactériennes par test de diffusion vapeur en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque)	96

<b>52</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>T. vulgaris</i> envers les espèces fongiques par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque)	100
<b>53</b>	Activité inhibitrice <i>in vitro</i> de l'HE du <i>C. nardus</i> envers les espèces fongiques par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes différents d'HE (10, 20 et 30 µL/disque)	103
<b>54</b>	Liste des dix premiers résultats d'identification de la souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur le site NCBI blastn	107
<b>55</b>	Effet des différentes concentrations de l'HE du <i>T. vulgaris</i> (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6 mL/mL) sur la viabilité cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation	108
<b>56</b>	Effet des différentes concentrations d'HE du <i>T. vulgaris</i> (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6 mL/mL) associé à un chauffage modéré (70 °C/ 2min) sur la viabilité cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation	109
<b>57</b>	Effet des différentes concentrations d'HE du <i>T. vulgaris</i> seule et associée à un chauffage thermique modéré (70°C/min) sur la viabilité de la souche <i>S.cerevisiae</i> en comparaison avec le contrôle positif et négatif	110
<b>58</b>	Effet des différentes concentrations de l'HE du <i>C.nardus</i> (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6 mL/mL) sur la viabilité cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation	113
<b>59</b>	Effet des différentes concentrations de l'HE du <i>C. nardus</i> (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6 mL/mL) associée à un traitement thermique modéré (70°C/ 2min) sur la viabilité cellulaire de la souche <i>S. cerevisiae</i> dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation	114
<b>60</b>	Effet des différentes concentrations d'HE du <i>C. nardus</i> seule et associée à un chauffage thermique modéré (70°C/min) sur la viabilité de la souche <i>S. cerevisiae</i> en comparaison avec le contrôle positif et négatif.	115
<b>61</b>	Le graphe BOILED-egg des composés testés de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	120

<b>62</b>	Le graphe BOILED-egg des composés testés de l'HE du <i>C. nardus</i>	123
<b>63</b>	Visualisation du docking moléculaire du carvacrol (A) du citronellal (B), du benzoate de sodium(C) et du sorbate de potassium (D) avec l'enzyme C-8 stérol isomérase (ERG2) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2017)	125
<b>64</b>	Visualisation du docking moléculaire du le carvacrol (A), le citronellal (B), benzoate de sodium (C), le sorbate de potassium (D) avec l'enzyme Delta (7) -stérol 5(6) (ERG3) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2017)	127
<b>65</b>	Visualisation du docking moléculaire du le carvacrol (A), le citronellal (B), benzoate de sodium(C), le sorbate de potassium (D) avec l'enzyme Stérol 14-déméthylase (ERG11) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2017).	129

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Classification des terpènes	6
<b>2</b>	Classification systématique de l'espèce <i>T. vulgaris</i> (Direction des services d'information agricole, 2009)	14
<b>3</b>	Les principaux composés de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	15
<b>4</b>	Classification systématique du <i>Cymbopogon nardus</i> (Clayton, 2008)	17
<b>5</b>	Les principaux composés de l'HE du <i>C. nardus</i> (Kaur <i>et al.</i> , 2021)	19
<b>6</b>	Conditions opératoires de la GC/FID	34
<b>7</b>	Conditions opératoires de la GC/SM	35
<b>8</b>	Lignées cellulaires testées et milieux utilisés pour leur croissance	42
<b>9</b>	Les souches de références bactériennes utilisées	46
<b>10</b>	Les souches fongiques utilisées	47
<b>11</b>	Les amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire	52
<b>12</b>	Condition de Température PCR	52
<b>13</b>	Les structures canoniques (SMILES) des molécules composant l'HE du <i>T. vulgaris</i>	57
<b>14</b>	Les structures canoniques (SMILES) des molécules composant l'HE du <i>C. nardus</i>	58

<b>15</b>	Structure des ligands testés	63
<b>16</b>	Composition chimique de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	69
<b>17</b>	Composition chimique de l'HE du <i>C. nardus</i>	73
<b>18</b>	Effet Antibactérien de l'HE du <i>T. vulgaris</i> évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur	90
<b>19</b>	Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du <i>T. vulgaris</i> envers des souches de bactéries	93
<b>20</b>	Effet Antibactérien de l'HE du <i>C. nardus</i> évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur	95
<b>21</b>	Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du <i>C. nardus</i> envers des souches de bactéries	97
<b>22</b>	Effet Antifongique de l'HE du <i>T. vulgaris</i> évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur	99
<b>23</b>	Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du <i>T. vulgaris</i> envers des souches de levures et de moisissures	101
<b>24</b>	Effet Antifongique de l'HE du <i>C. nardus</i> évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur	103
<b>25</b>	Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du <i>C. nardus</i> envers des souches de levures et de moisissures	105
<b>26</b>	Résultats de la prédiction <i>in silico</i> des propriétés physico-chimiques par SwissADME des composés de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	118
<b>27</b>	Résultats de la prédiction <i>in silico</i> des propriétés pharmacocinétiques par SwissADME des composés de l'HE du <i>T. vulgaris</i>	119
<b>28</b>	Résultats de la prédiction <i>in silico</i> des propriétés physicochimiques par SwissADME des composés de l'HE du <i>C. nardus</i>	121
<b>29</b>	Résultats de la prédiction <i>in silico</i> des propriétés pharmacocinétiques par SwissADME des composés de l'HE du <i>C. nardus</i>	122
<b>30</b>	Les sites de liaisons prédit par le logiciel CASTp (version 3.0) des enzymes cibles (ERG2 et ERG3) utilisées dans l'étude de docking moléculaire	123
<b>31</b>	Les scores (kcal/mol) de l'étude de docking moléculaire	123

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe I :** Schéma d'essai de la toxicité orale aiguë avec une dose initiale de 50 mg/kg p.c

**Annexe II :** Composition de la boisson commerciale Orangina®

**Annexe III :** Chromatogramme de l'HE du *T. vulgaris*

**Annexe IV :** Chromatogramme de l'HE du *C. nardus*

**Annexe V :** Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *T. vulgaris*

**Annexe VI :** Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *C. nardus*

**Annexe VII :** Antibiogramme des souches bactériennes testées

**Annexe VIII :** Résultats du séquençage de Sanger de la souche

**Annexe IX :** Photos des résultats du test de conservation des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* dans la boisson Orangina® envers la souche *S. cerevisiae*

**Annexe X:** Article COMMERCIAL THYME ESSENTIAL OIL AS NATURAL BEVERAGE PRESERVATIVE AND MOLECULAR DOCKING STUDY ON ITS MODE OF ACTION AGAINST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* publié dans Czech Journal of Food Sciences

**Annexe XI:** Poster *Thymus vulgaris* L essential oil as natural beverage preservative evaluation of acute toxicity, antioxidant and antimicrobial properties *in vitro* and in a real food matrix présenté lors du The 4th International Seminar in Engineering, Health and Analysis Juin 2023, Alger, Algerie

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Listes des tableaux

INTRODUCTION GENERALE..... 1

### CHAPITRE 1. REVUE DE LITTERATURE

Partie I. Les huiles essentielles.....	4
I.1.Aperçu historique.....	4
I.2.Définition.....	4
I.3.Localisation et lieu de synthèse.....	4
I.4.Composition chimique des huiles essentielles.....	4
I.4.1. Les terpénoïdes.....	5
I.4.2-Les composés non terpéniques (aromatiques).....	7
I.4.3-Biosynthèse des terpénoïdes.....	7
<i>I.4.3.1. Voie du mévalonate.....</i>	<i>8</i>
<i>I.4.3.2. Voie du 2-C-méthyl-D-érythritol phosphate (MEP).....</i>	<i>9</i>
<i>I.4.3.3. Assemblage tête à queue de l'IPP et du DMAPP en diphosphates de prényle,GFP,FPP,GGPP.....</i>	<i>10</i>
I.5. Notion de chémotype.....	11
I.6.Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	11
I.6.1. Hydrodistillation.....	11
I.6.2. Distillation par entraînement à la vapeur.....	11
I.7.Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	11
I.7.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	12
I.7.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse.....	12
Partie II. Monographie de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	12
II.1. Généralités sur la famille des lamiacées.....	12
II.2. Présentation et étymologie de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	13

II.3. Synonymes.....	13
II.4. Classification systématique de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	13
II.5. Description botanique et morphologique de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	14
II.6. Répartition géographique et habitat.....	14
II.7. Utilisations traditionnelles de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	14
II.8. Composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> .....	15
II.9. Activités biologiques de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> .....	16
II.10. Toxicité de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> .....	16
Partie III. Monographie de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i> .....	16
III.1. Généralités sur la famille des poacées.....	16
III.2. Présentation et étymologie de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i> .....	16
III.3. Synonymes.....	17
III.4. Classification systématique de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i> .....	17
III.5. Description botanique de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i> .....	18
III.6. Répartition géographique et habitat.....	18
III.7. Utilisations traditionnelles de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i>	18
III.8. Composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Cymbopogon nardus</i> .....	18
III.9. Activités biologiques de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	19
III.10. Toxicité de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	20
Partie IV. Stress oxydatif et antioxydants.....	20
IV.1. Définition.....	20
IV. 2. Espèces réactives (oxydantes).....	20
IV.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO).....	20
IV.2.2. Espèces réactives d'azote (ERA).....	20
IV.2.3. Espèces réactives non biologiques.....	21
IV.3. Les antioxydants.....	21
Partie V. Présentation et structure de la cellule fongique.....	22
V.1. Présentation de la cellule fongique.....	22
V.2. Structure de la cellule d'une levure.....	22
V.3. Structure de la paroi cellulaire d'une levure.....	23
V.4. Biosynthèse de l'ergostérol.....	23
Partie VI. Les conservateurs alimentaires.....	25

<b>VI.1. Définition des additifs alimentaires.....</b>	<b>25</b>
<b>VI.2. Classification des additifs alimentaires selon leur catégorie</b>	
<b>Fonctionnelle.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.3. Agents de conservation chimiques.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.3.1. Définition.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.3.2. Benzoate de sodium.....</b>	<b>26</b>
<i>VI.3.2.1. Définition.....</i>	<i>26</i>
<i>VI.3.2.2. Propriétés chimiques et physiques.....</i>	<i>26</i>
<i>VI.3.2.3. Sécurité d'utilisation.....</i>	<i>27</i>
<b>VI.3.3. Sorbate de potassium.....</b>	<b>27</b>
<i>VI.3.3.1. Définition.....</i>	<i>27</i>
<i>VI.3.3.2. Propriétés chimiques et physiques.....</i>	<i>27</i>
<i>VI.3.3.3. Sécurité d'utilisation.....</i>	<i>27</i>
<b>Parties VII. Présentation du docking moléculaire.....</b>	<b>28</b>
<b>VII.1. Définition du docking moléculaire.....</b>	<b>28</b>
<b>VII.2. Types de docking.....</b>	<b>28</b>
<b>VII.3. Etapes du docking moléculaire.....</b>	<b>28</b>
<b>VII.4. Algorithme de docking.....</b>	<b>29</b>
<b>VII.5. Fonctions de score.....</b>	<b>29</b>
<b>VII.6. Interactions Protéine-ligand.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.6.1. Liaison hydrogène.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.6.2. Interactions de Van der Waals.....</b>	<b>31</b>
<b>VII.6.3. Interactions hydrophobes.....</b>	<b>31</b>

## CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

<b>Cadre de l'étude.....</b>	<b>33</b>
<b>Partie I. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles du</b>	
<b><i>Thymus vulgaris et Cymbopogon nardus.....</i></b>	<b>33</b>
<b>I.2. Matériel végétal.....</b>	<b>34</b>
<b>I.3. Analyse en GC/ FID combinée à une GC/SM des deux huiles essentielles...</b>	<b>34</b>
<b>I.3.1. Analyse en GC/FID.....</b>	<b>34</b>
<b>I.3.2. Analyse en GC/SM.....</b>	<b>35</b>

I.4. Identification des composés volatiles.....	35
I.5. Quantification des composés volatiles.....	36
<b>Partie II. Evaluation de la toxicité <i>in vivo</i> et <i>in situ</i> des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>36</b>
II.1. Evaluation de la toxicité aiguë orale des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	36
II.1.1. Principe .....	36
II.2. Protocole expérimental.....	36
II.1.2.1. Conditions d'expérience.....	36
II.1.2.2. Niveaux des doses administrées aux différents lots.....	37
II.1.2.3. Voie d'administration .....	37
II.1.2.4. Observations macroscopiques.....	38
II.1.2.5. Étude histopathologie.....	38
II.6. Evaluation <i>in situ</i> des propriétés toxiques des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	41
II.6.1. Lignées cellulaires utilisées .....	41
II.6.2. Test MTT.....	42
II.6.2.1. Principe.....	42
II.6.2.2. Protocole expérimental.....	43
<b>Partie III : Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>44</b>
III.1. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	44
III.1.1. Test DPPH.....	44
III.1.1.1. Principe .....	44
III.1.1.2. Protocole expérimental.....	44
III.1.2. Test ABTS.....	45
III.1.2.1. Principe .....	45
III.1.2.2. Protocole expérimental.....	46
III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>cymbopogon nardus</i> .....	46
III.2.1. Microorganismes testés .....	46

III.2.1.1. Souches bactériennes testées .....	46
III.2.2.2. Souches fongiques testées .....	47
III.2.3. AntibioGramme des souches bactériennes testées.....	47
III.2.4. Les milieux de cultures utilisés.....	47
III.2.5. Test de diffusion sur disque.....	47
III.2.5.1. Principe .....	47
III.2.5.2. Protocole expérimental.....	47
III.2.6. Test de diffusion vapeur.....	49
III.2.6.1. Principe.....	50
III.2.6.2. Protocole expérimental.....	50
III.2.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	50
<b>Partie IV. Evaluation de l'effet conservateur des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> envers la souche fongique <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans un système alimentaire (boisson Orangina®).....</b>	
	51
IV.1. Principe .....	51
IV.2. Microorganisme testé.....	51
IV.3. Identification moléculaire de la souche.....	52
IV.3.1. Extraction d'ADN et amplification PCR des ITS et EF.....	52
IV.3.2. Révélation et Purification des produits PCR.....	52
IV.3.3. Séquençage des produits PCR.....	52
IV.4. Préparation de la suspension fongique de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
IV.5. Préparation des boissons inoculées par la souche fongique ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	53
IV.6. Effet des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> uniquement.....	54
IV.7. Effet des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> associées à un chauffage modéré.....	54
IV.8. Expression des résultats.....	55
IV.9. Etude statistique.....	55

<b>Partie V. Evaluation <i>in silico</i> des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des composés des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> et investigation par docking moléculaire des mécanismes impliqués dans leur action antifongique.....</b>	<b>55</b>
<b>V.1. Evaluation <i>in silico</i> des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés des deux huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>V.1.1. Principe .....</b>	<b>55</b>
<b>V.1.2. Base de données PubChem.....</b>	<b>55</b>
<b>V.1.3. Programme SwissADME.....</b>	<b>56</b>
<b>V.1.4. Méthodes d'évaluation <i>in-silico</i> des propriétés ADME .....</b>	<b>59</b>
<b>V.1.4.1. Règle de Lipinski.....</b>	<b>60</b>
<b>V.1.4.2. Règle de Veber.....</b>	<b>61</b>
<b>V.1.4.3. Solubilité dans l'eau.....</b>	<b>61</b>
<b>V.1.4.4. Pénétration de la BHE (barrière hémato-encéphalique).....</b>	<b>61</b>
<b>V.1.4.5. Inhibition des cytochromes P450.....</b>	<b>61</b>
<b>V.1.4.6. Substrat du Pgp.....</b>	<b>61</b>
<b>V.2. Investigation par docking moléculaire du mode d'action des principaux composés des deux huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> étudiées envers la souche fongique <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>V.2.1. Principe de l'expérience .....</b>	<b>62</b>
<b>V.2.2. Présentation du logiciel de docking moléculaire.....</b>	<b>62</b>
<b>V.2.3. Préparation des ligands .....</b>	<b>63</b>
<b>V.2.4. Structure des récepteurs étudiés.....</b>	<b>64</b>
<b>V.2.4.1. C-8 stérol isomérase (ERG2).....</b>	<b>64</b>
<b>V.2.4.2. C-5 stérol désaturase (ERG3).....</b>	<b>64</b>
<b>V.2.4.3. Lanostérol 14 alpha-déméthylase (ERG11).....</b>	<b>65</b>
<b>V.2.5. Détermination du site actif.....</b>	<b>66</b>
<b>V.2.6. Préparation des récepteurs ciblés .....</b>	<b>66</b>
<b>V.2.7. Docking moléculaire.....</b>	<b>66</b>
<b>V.2.8. Evaluation des résultats.....</b>	<b>67</b>

## CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Partie I : Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>I.1. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>I.2. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>Partie II. Evaluation de la toxicité <i>in vivo</i> et <i>in situ</i> des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>II.1. Evaluation de la toxicité aiguë orale des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>C. nardus</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>II.1.1 Évaluation de la toxicité aiguë orale de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>II.1.2 Observations macroscopiques et microscopiques.....</b>	<b>77</b>
<b>II.1.3. Evaluation de la toxicité aiguë de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>78</b>
<b>II.1.4. Observations macroscopiques et microscopiques.....</b>	<b>79</b>
<b>II.2. Evaluation de la toxicité <i>in situ</i> des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>II.2.1. Evaluation de la toxicité <i>in situ</i> de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>...</b>	<b>80</b>
<b>II.2.2. Evaluation de la toxicité <i>in situ</i> de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>82</b>
<b>Partie III. Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>III.1 Evaluation de l'effet antioxydant des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>III.1.1. Potentiel antioxydant de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>III.1.2. Potentiel antioxydant de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>III.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>III.2.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>III.2.1.1. Test de diffusion sur disque.....</b>	<b>89</b>
<b>III.2.1.2. Test de diffusion vapeur.....</b>	<b>91</b>
<b>III.2.1.3. Détermination des CMI.....</b>	<b>92</b>

III.2.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> ...	94
III.2.2.1. Test de diffusion sur disque.....	94
III.2.2.2. Test de diffusion vapeur.....	96
III.2.2.3. Détermination des CMI.....	97
III.3. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	98
III.3.1. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> .....	98
III.3.1.1. Test de diffusion sur disque.....	98
III.3.1.2. Test de diffusion vapeur.....	100
III.3.1.3. Détermination des CMI.....	100
III.3.2. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	102
III.3.2.1. Test de diffusion sur disque.....	102
III.3.2.2. Test de diffusion vapeur.....	104
III.3.2.3. Détermination des CMI.....	104
Partie IV. Evaluation de l'effet conservateur des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> envers une souche fongique d'origine alimentaire ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) dans un système alimentaire (boisson Orangina®).....	106
IV.1. Caractérisation de la souche testée .....	106
IV.2. Évaluation de l'effet conservateur de l'huiles essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> envers une souche fongique ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) dans un système alimentaire (Orangina®).....	107
IV.2.1. Effet de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> .....	107
IV.2.2. Effet conservateur de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> associée à un chauffage modéré.....	108
IV.3. Evaluation de l'effet conservateur de l'huiles essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> envers une souche fongique ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) dans un système alimentaire (Orangina®).....	112
IV.3.1. Effet de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> .....	112
IV.3.2. Effet conservateur de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i> associée à un chauffage modéré.....	113

<b>Partie V. Evaluation <i>in silico</i> des propriétés physicochimiques pharmacocinétiques des composés des deux huiles essentielles étudiées et investigation par docking moléculaire des mécanismes impliqués dans leur action antifongique.....</b>	<b>116</b>
<b>V.1. Evaluation <i>in silico</i> des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> .....</b>	<b>116</b>
<b>V.2. Evaluation <i>in silico</i> des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés de l'huile essentielle du <i>Cymbopogon nardus</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>V.3. Evaluation <i>in silico</i> par docking moléculaire du mode d'action des principaux composés des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i> et du <i>Cymbopogon nardus</i> envers la souche fongique <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>123</b>
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>133</b>
<b>ANNEXES</b>	

### INTRODUCTION GENERALE

Les champignons sont présents partout dans la nature, responsables d'un certain nombre de maladies et d'infections (**Garber, 2001**). Ils sont aussi connus pour leur rôle bénéfique dans le domaine alimentaire. En effet, ces microorganismes sont largement utilisés en industrie agroalimentaire comme agents de fermentation (Fromage, vinaigre, pain...etc.) et de biotransformation. (**Hittinger et al., 2018 ; Copetti, 2019**). Cependant, ils sont aussi responsables de la contamination et de la détérioration d'un certain nombre de denrées alimentaires au cours du processus industriel incluant les viandes, les confitures, les jus et les boissons. Les espèces fongiques les plus impliquées dans ces altérations appartiennent majoritairement aux genres suivants : *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* et *Zygosaccharomyces* (**Stratford, 2006**).

Les boissons acides carbonatées sont censées être un milieu défavorable à la croissance des microorganismes dû à leur pH, leur bas niveau d'oxygène, leurs faibles concentrations en composés azotés et leur forte teneur en sucre (**Deak, 1993 ; Stratford, 2000**). Pourtant, ces boissons restent vulnérables à la contamination par un certain nombre de levures, principalement par l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, qui peut être à l'origine d'altérations pouvant affecter leurs propriétés organoleptiques, physiques et sensorielles (**Deak, 1993**). Cette levure provoque ces modifications en induisant une fermentation à l'origine d'une production abondante de gaz et de substances incluant l'éthanol, l'oxyde de carbone et des esters qui engendrent l'apparition d'odeur et de goût indésirables (**Tajchakavit et al., 1996**).

Les altérations alimentaires causées par les champignons sont un problème majeur dans l'industrie agroalimentaire, du fait qu'elles influencent significativement le coût et la disponibilité des denrées alimentaires. Toutefois, les produits alimentaires qui ne peuvent pas être pasteurisés sont généralement traités avec des conservateurs acides faibles comprenant l'acide sorbique ou benzoïque ou leurs sels. Ces additifs chimiques suscitent de plus en plus de rejet de la part des consommateurs en raison de leurs nombreux effets toxiques. Ces derniers comprennent notamment le potentiel risque de formation du benzène à partir de l'acide benzoïque dans les aliments ou la résistance développée surtout par les levures à l'encontre de ces conservateurs chimiques (**Singh et al., 2019 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 1993 ; Federal Institute for Risk Assessment, 2005**). Cet état de fait a obligé les industriels à se tourner vers des sources antimicrobiennes plus naturelles et moins nocives. Les huiles essentielles (HE) constituent de bons candidats étant donné la popularité dont elles jouissent depuis longtemps. Cette réputation est liée à leurs propriétés médicinales notamment anti-

inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, insecticides, insectifuges, tonifiantes, stimulantes et calmantes (Nicolas, 1991 ; Mishra et Dubey, 1994).

De ce fait, par la richesse et la diversité originelle de sa flore, l'Algérie constitue une véritable source de plantes aromatiques riches en HEs avec plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, distribuées comme suit : méditerranéenne, saharienne et une flore subsaharienne. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15 %) d'espèces endémiques (Quézel et Santa, 1962). L'investigation de ces espèces représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances. (Greuter *et al.*, 1991). Toutefois, ce potentiel floristique reste très peu exploré d'un point de vue phytochimique et pas suffisamment exploité en biotechnologie industrielle (Asbahani *et al.*, 2015, Garzoli *et al.*, 2020).

Les deux espèces de plantes aromatiques, *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon nardus* appartiennent à la famille des lamiacées et des poacées, respectivement. Elles sont largement distribuées, poussent de manière spontanée et possèdent un rendement important en HE (Bruneton, 2009). En outre, les HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* sont une source importante de molécules bioactives, ce qui leur confère de propriétés antimicrobiennes naturelles (Hyldgaard *et al.*, 2012). Ces caractéristiques font des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* de potentiels candidats pour la conservation antimicrobienne des denrées alimentaires avec de possibles propriétés nutraceutiques.

Malgré l'importante d'efficacité des HEs comme agents antimicrobiens, leur emploi unique peut s'avérer coûteux en raison du volume élevé requis pour obtenir l'effet recherché (Chorianopoulos *et al.*, 2004 ; Fisher, et Phillips, 2006 ; Burt, 2004). Ainsi, l'association de l'utilisation des HEs à un traitement physique comme la chaleur pourrait être plus prometteur (Chaves-Lopez *et al.*, 2009). Le secteur alimentaire s'appuie de loin sur le traitement thermique comme moyen de conservation des denrées alimentaires. Cela dit, en atteignant le niveau de chauffage nécessaire pour garantir la conservation optimale, des modifications défavorables des caractéristiques nutritionnelles et sensorielles des aliments peuvent apparaître (Lund *et al.*, 2000). Par conséquent, les experts recommandent d'utiliser des méthodes de chauffage plus douces avec des barrières supplémentaires, telles que des agents antimicrobiens d'origine naturelle.

L'étude des activités biologique des HEs est nécessaire, mais ne permet pas de déterminer avec précision quelle molécule est responsable de l'action thérapeutique de l'HE. Par conséquent, comprendre l'interaction et l'affinité des composés bioactifs identifiés avec des cibles biologiques nécessite une étude de docking moléculaire. Cette dernière peut fournir des

informations précieuses sur les bases moléculaires de l'activité biologique des produits naturels, ainsi que sur les mécanismes putatifs d'action et modalités de liaison des composés actifs.

Nos travaux s'inscrivent dans cette thématique et ont pour objectifs les points suivants :

- Evaluation des propriétés physicochimiques (GC/FID et GC/SM) et toxicologiques (*in vivo* et *in situ*) des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus*

-Etude *in vitro* des activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques) et antioxydantes (les tests DPPH et ABTS) des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus*

- Application des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* comme conservateurs nutraceutiques antimicrobiens vis-à-vis d'une souche fongique d'origine alimentaire (*S. cerevisiae*) dans un système alimentaire qui est une boisson gazeuse commerciale à base d'agrumes (Orangina®). L'effet de l'association des deux HEs a un traitement thermique modéré sur l'action conservatrice antifongique a aussi été investigué.

-Evaluation *in silico* des propriétés ADME (Absorption distribution métabolisme et excrétion) des composés des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* et l'étude par docking moléculaire des mécanismes impliqués dans l'action antifongique des deux HEs envers la souche *S. cerevisiae*.

Ces axes de recherches s'inscrivent dans une participation scientifique à la valorisation des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus*. Ils ont donné lieu à une présentation écrite sous forme de poster dans une communication internationale et à la soumission d'un manuscrit dans un journal international à comité de lecture. Ces objectifs sont organisés à travers ce manuscrit en 4 chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique décrivant quelques notions sur les HEs, les deux plantes étudiées, l'activité antioxydante, la cellule fongique, les conservateurs alimentaires et le docking moléculaire. Le deuxième chapitre s'organise en 5 parties qui reprennent la méthodologie utilisée lors de cette thèse. Alors que le troisième chapitre expose les résultats obtenus pour nos quatre objectifs de recherche. Enfin, le manuscrit se termine par la conclusion générale et les perspectives de notre recherche.



## **CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE**

## **Partie I. Les huiles essentielles**

### **I.1. Aperçu historique**

L'utilisation des parfums et des arômes remonte jusqu'au Moyen Âge. Des composés aromatiques spécifiques composés de terpènes ont été retrouvés dans des extraits d'encens qui ont été utilisés pour des rituels religieux et comme pansements de momies chez les Egyptiens (**Abdesselam, 2006**). Les Grecs et les Romains ont contribué à l'établissement des fondamentaux de la distillation (**Roux, 2008**), et la civilisation musulmane a joué un rôle primordial dans le développement de l'aromathérapie grâce à Geber (712-815) et à Avicenne (980-1037) qui ont inventé l'alambic, la distillation et le serpent. (**Smadja, 2009**). Néanmoins, il a fallu attendre le 20<sup>ème</sup> siècle pour que l'aromathérapie connaisse un essor important et soit considérée comme une médecine à part (**Li et al., 2014**)

### **I.2. Définition**

La définition des huiles essentielles (HEs) a été tentée par de nombreuses organisations dont l'association française de normalisation (Afnor) qui a proposé la définition suivante « une HE est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche » (**Afnor, 1989**).

### **I.3. Localisation et lieu de synthèse**

Les HEs sont produites par 1 % des espèces et un nombre limité de familles, dont les lamiacées (thym, lavande), les myrtacées (eucalyptus), les rutacées (citron, orange), les cupressacées (cyprès), les apiacées (fenouil, coriandre), les pinacées (sapin, pin), les astéracées (camomille romaine), les lauracées (laurier noble), les géraniacées (géranium rosat) et plus rarement les poacées (citronnelle) et les zingibéracées (gingembre) (**Mohammedi, 2006**).

Tous les organes végétaux (feuilles, fleurs, zestes, racines, rhizomes, fruits, graines, bois, écorces) peuvent stocker les HEs, qui sont produites et accumulées par des structures histologiques spécialisées. Ces structures sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante telle que les cellules à HE (lauracées), les poils sécréteurs (lamiacées) et les canaux sécréteurs (apiacées) (**Bruneton, 1999**).

### **I.4. Composition chimique des huiles essentielles**

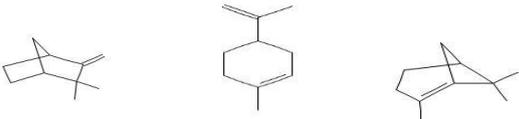
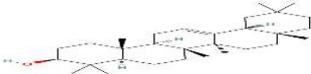
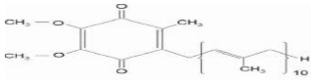
Les HEs sont un mélange complexe, mais dont les constituants peuvent être répartis en deux classes principales en fonction de leurs voies de biosynthèse. Les terpenoïdes (terpènes) qui constituent la première classe, qui est la plus importante du point de vue structural et fonctionnel avec plus de 70000 composés. Tandis que la deuxième classe est constituée de composés aromatiques dérivés : les phénylpropanoïdes (**Weisshaar, et Jenkins, 1998 ; Vogt, 2010**).

#### I.4.1. Les terpénoïdes

Le mot terpène vient du mot allemand « Terpen » (1866) provenant de das Terpentin : la térébenthine, une HE riche en terpènes (**Phillips et Croteau, 1999**). Néanmoins, le mot terpènes désigne chimiquement des molécules hydrocarbonées insaturées dérivant de l'isoprène d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel ils sont parfois désignés. En revanche, le terme terpénoïde est plus générique et décrit une substance possédant le squelette carboné des terpènes, tout en ayant éventuellement un, ou plusieurs, groupements fonctionnels contenant de l'oxygène (Alcool, aldéhyde, cétone, acide, ...etc.) et pourrait ne pas avoir le même nombre d'insaturations. Les terpénoïdes dérivent d'un précurseur simple de 5 atomes l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et de son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) qui s'assemblent en unités isopréniques pour former des polymères de formule brute  $(C_5H_8)_n$  (**Christianson, 2007**). Selon le nombre d'unités associées, on distingue les hémiterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes, les tétraterpènes et les polyterpènes. (**Sacchettini et al., 1997**) (Tableau 1).

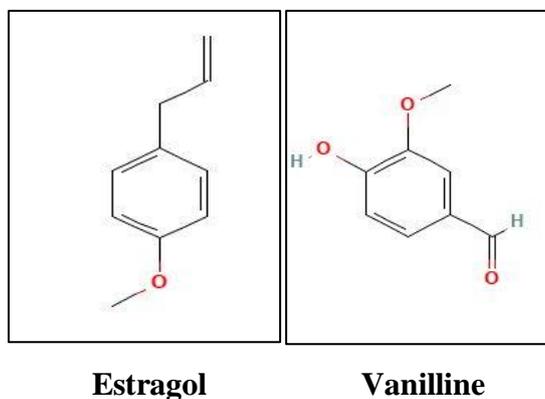
Les HEs contiennent surtout des monoterpènes et des sesquiterpènes et peu de triterpènes. Les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent se présenter sous forme cyclique (mono, di, ou tricycliques) ou acyclique et peuvent subir de nombreux réarrangements pour donner des alcools, des cétones, des aldéhydes et bien d'autres molécules (**Finar, 1994**).

Tableau 1 : Classification des terpènes

Terpènes	Formule brute	Exemples
Hémiterpènes	$C_5H_8$	 Isoprène
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	 Camphène      Limonène      β- Pinène
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	 β-Caryophyllène      β- Elémène
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	 Sclarène      Kaurène
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	 β-Amyrine
Tétraterpènes	$C_{40}H_{64}$	 α-Carotène
Polyisoprène	$(C_5H_8)_n$	 Ubiquinone (Q10)

#### I.4.2. Les composés non terpéniques (aromatiques)

Les composés aromatiques non terpéniques présents dans les HEs dérivent du phénylpropane d'où leurs noms les phénylpropanoïdes. Le phénylpropane lui-même dérive après plusieurs réactions chimiques de l'acide aminé phénylalanine. L'estragol et la vanilline sont l'un des exemples de phénylpropanoïdes présents dans les HEs. (Singh *et al.*, 1990) (Figure 1).

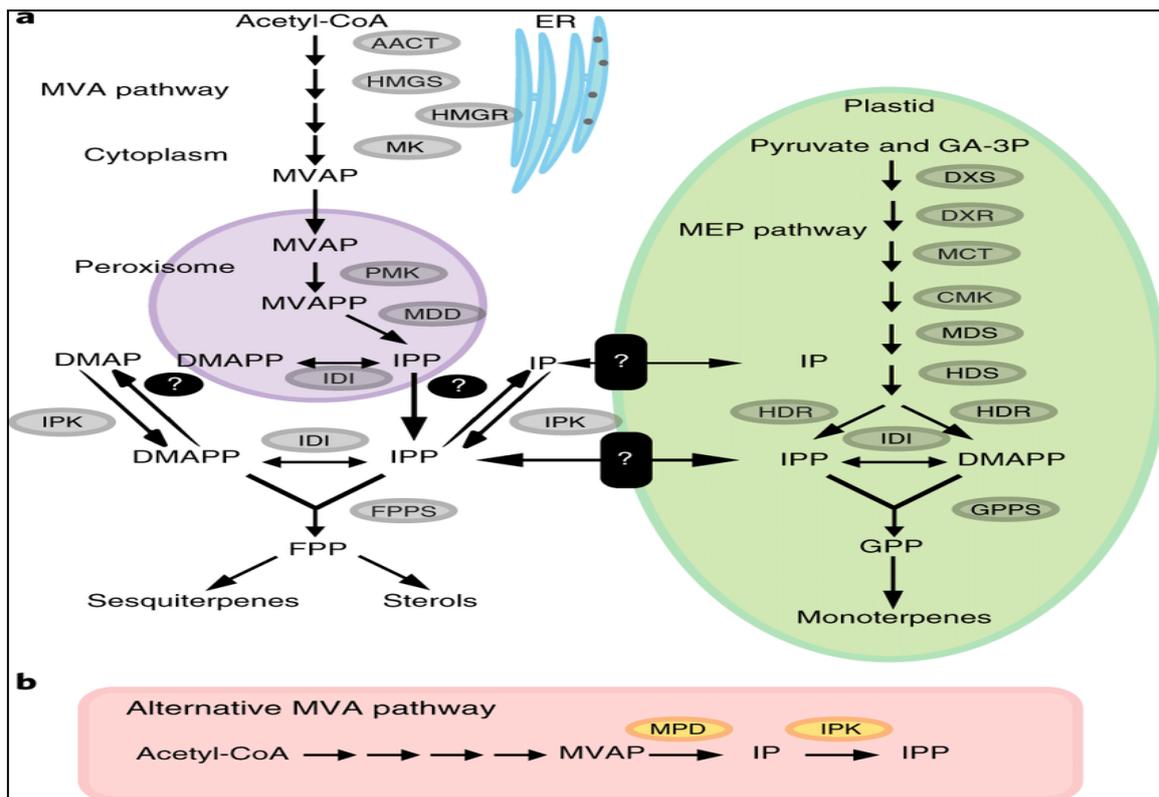


**Figure 1 : Exemple de deux phénylpropanoïdes présents dans la composition des HEs**

#### I.4.3. Biosynthèse des terpénoïdes

La biosynthèse des terpènes se fait à partir d'unités de bases à 5 carbones, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) qui sont issus de deux voies bien distinctes (Tholl, 2015) : la voie du mévalonate (MVA) et une voie découverte plus récemment qui est celle du méthylérythritol phosphate (MEP) dite voie non mévalonique. (Singh *et al.*, 1990).

Chez les plantes, les deux voies MEP et MVA fonctionnent simultanément et en parallèle pour la synthèse de l'IPP. Néanmoins, pour permettre leur régulation différentielle, les deux voies fonctionnent presque indépendamment l'une de l'autre dans deux compartiments subcellulaires différents. La voie du MVA se déroule exclusivement au niveau du cytosol alors que celle du MEP a lieu au niveau des chloroplastes. (Lichtenthaler *et al.*, 1999 ; Eisenreich *et al.*, 2004) (Figure 2).

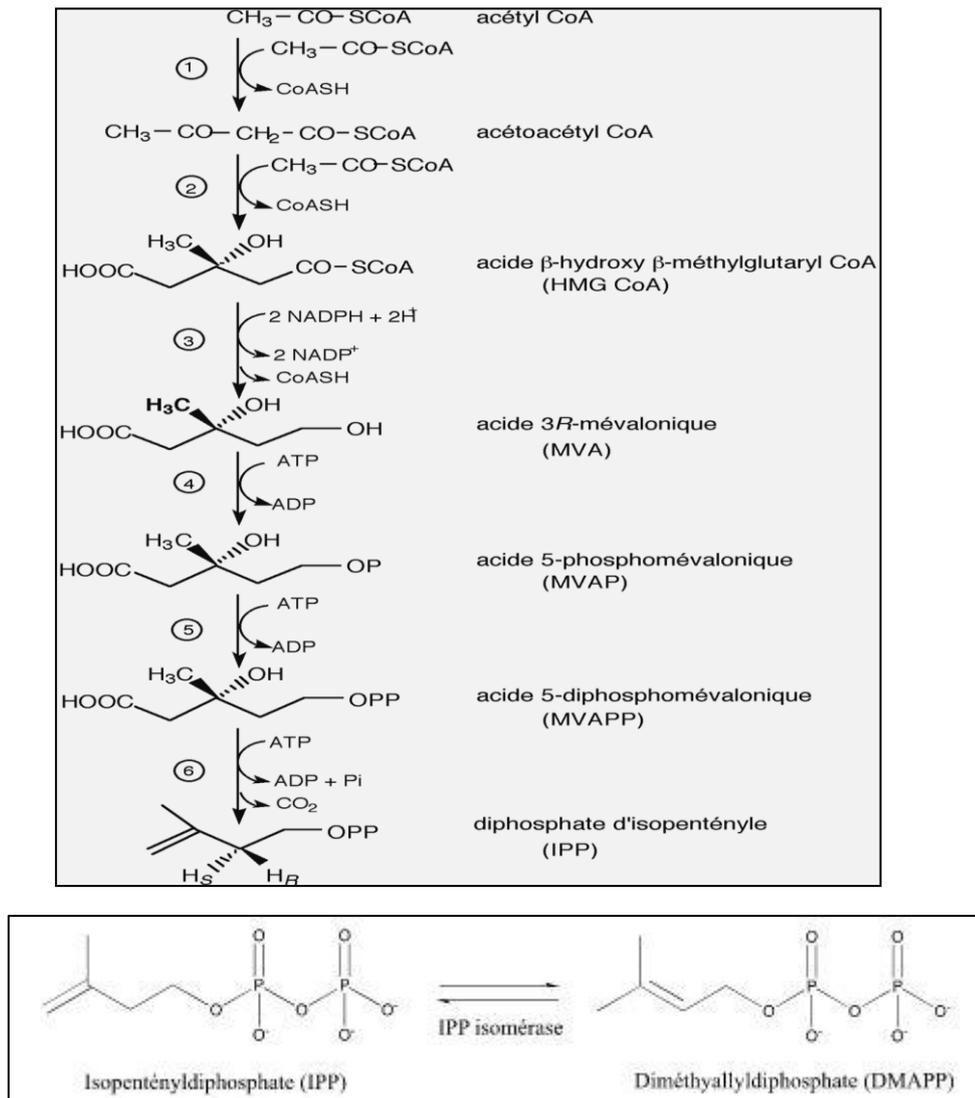


**Figure 2 : Schéma représentant les étapes de synthèse des terpènes dans les différents compartiments cellulaires (Henry *et al.*, 2018).** HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA; HMGS, HMG-Coa synthétase; HMGR, HMG-Coa réductase; MK, mévalonate kinase; GA-3P, glycéraldéhyde-3-phosphate; MVA, acide mévalonique; MVAP, voie de l'acide mévalonique; MEP, 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate; IP, isopentényl phosphate; IPK, isopentényl phosphate kinase; IPP, isopentényl pyrophosphate; DMAPP, diméthylallyl diphosphate; GPP, géranyl diphosphate; FPP, farnésyl diphosphate; FPPS, farnésyl pyrophosphate synthase; MPD, mévalonate phosphate décarboxylase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase; ER, réticulum endoplasmique; DXS, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase; MCT, 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate cytidyl transférase; HDS, 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthétase; HDR, 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase.

#### 1.4.3.1. Voie du mévalonate (MVA)

La voie du mévalonate (Figure 3) se déroule au niveau du cytosol, du réticulum endoplasmique (RE), et des peroxysomes (fraction semi-liquide du cytoplasme). Cette voie se déroule en 6 étapes dont le produit de départ est l'acétyl-coenzyme A (acétyl-Coa) issu de la glycolyse (Tholl, 2015). La voie débute par la condensation de deux molécules d'acétyl-Coa pour synthétiser l'acétoacétyl-Coa catalysée par l'acétoacétyl-Coa thiolase. Puis une HMG-Coa synthétase catalyse la fixation d'une 3<sup>ème</sup> molécule d'acétyl-Coa pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-Coa), ensuite une HMG-Coa réductase catalyse la réduction du HMG-Coa en acide mévalonique (Luskey et Stevens, 1985; Basson *et al.*, 1988; Igual *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2000). Ce dernier est à son tour phosphorylé par une phosphomévalonate kinase (Tsay et Robinson, 1991; Lluch *et al.*, 2000) et par une mévalonate-5-kinase pour produire du mévalonate-5-diphosphate. Ce dernier subit une décarboxylation par une mévalonate-5-diphosphate décarboxylase pour aboutir au

IPP (**Dhe-Paganon *et al.*, 1994**). Enfin, l'IPP va subir une isomérisation en DMAPP grâce à une IPP isomérase



**Figure 3 : Étapes enzymatiques de la voie de mévalonate**

#### 1.4.3.2. Voie du 2-C-méthyl-D-érythritol phosphate (MEP)

Cette voie a lieu au niveau des chloroplastes des cellules végétales. Elle se déroule en 7 étapes (**Tholl, 2015**) et débute par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) pour aboutir au 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) grâce à une 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (**Sprenger *et al.*, 1997**). Le DXP est ensuite réduit en 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) par une 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (**Takahashi *et al.*, 1998**). Puis, la condensation de 2 MEP et d'une molécule de 4-cytidine-5-phosphate (MCT) conduit à la formation du 4-cytidine 5-diphospho-2-C-méthylérythritol (CDP-ME) catalysée par la 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate cytidyl transférase. Le CDP-ME par action du 2-C-méthylérythritol-2,4-cyclodiphosphate synthétase (**Radykewicz *et al.*, 2000 ; Steinbacher *et***

*al.*, 2003 ; Herz *et al.*, 2000 ; Calisto *et al.*, 2007) va donner le 2-C-méthylérythritol 2,4-cyclodiphosphate (ME<sub>2</sub>, 4CPP) qui par une 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate synthétase (HDS) va aboutir au 4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl-pyrophosphate (HMB-PP) qui par la suite va être converti en IPP (Baker *et al.*, 1981; Cunningham *et al.*, 2000), Ce dernier à son tour va subir une isomérisation en DMAPP par une IPP isomérase (Tholl, 2015).

#### I.4.3.3. Assemblage tête-à-queue de l'IPP et du DMAPP en diphosphates de prényle, GFP, FPP, GGPP

Les précurseurs IPP et DMAPP formés à partir des voies de MVA et MEP sont assemblés grâce aux prényl transférase tête à queue pour conduire à la formation des molécules de prényl diphosphate de tailles croissantes qui sont le géranyl diphosphate (GPP), le farnésyl diphosphate (FPP) et le géranylgéranyl diphosphate (GGPP) et qui grâce aux terpènes synthétases (TPS) va aboutir aux différents composés terpéniques. L'assemblage de l'IPP avec le DMAPP est effectué suite à l'attaque du carbone portant le groupement pyrophosphate (OPP) du DMAPP sur le carbone opposé à celui portant le groupement pyrophosphate de l'IPP. Les hémiterpènes (C<sub>5</sub>) sont formés de manière directe à partir de l'action du TPS sur le DMAPP. Le GPP synthétase (GPPS) catalyse la condensation du DMAPP sur l'IPP et qui aboutissent au GPP (C<sub>10</sub>), le précurseur diphosphate des monoterpènes. Le farnésyl synthétase (FPPS) catalyse la condensation du GPP sur l'IPP qui conduit à la formation du FPP (C<sub>15</sub>) précurseur diphosphate des sesquiterpènes et qui grâce aux TPS aboutit aux sesquiterpènes. La condensation de deux molécules de FPP conduit après action des TPS à la formation des triterpènes. La condensation d'une molécule d'IPP sur le FPP aboutit au GGPP (C<sub>20</sub>) grâce à la GGPP synthétase (GGPPS). Ensuite, l'action de la TPS sur le GGPP aboutit aux diterpènes et la condensation de deux molécules de GGPP aboutit aux tétraterpènes. (Bezerra *et al.*, 2008) (Figure 4).

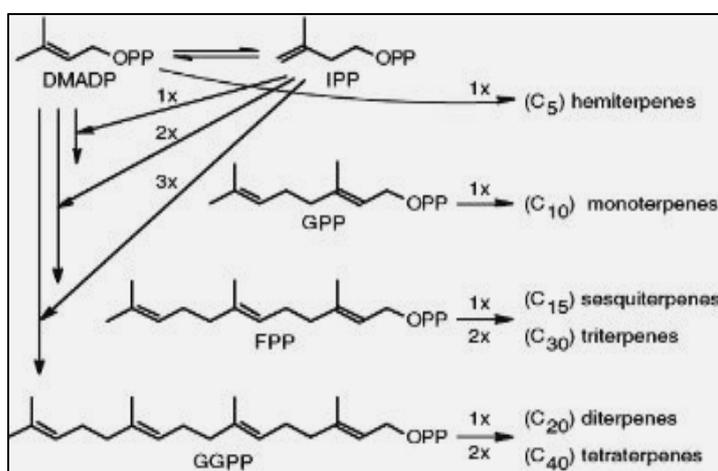


Figure 4 : Schéma illustrant la biosynthèse des terpènes (Bohlmann et Keeling, 2008)

## I.5. Notion de chémotype

La composition chimique de l'HE d'une même espèce botanique est très variable (polymorphisme chimique) car son élaboration dépend des conditions environnementales et abiotiques (Sol, exposition au soleil, altitude...etc) (**Franchomme et Penoel, 1990**). Cette variation peut être quantitative ou qualitative, à l'origine de la notion de chémotype. Le concept de chémotype, appelé également « chimiotype » a été employé pour la première fois en 1968 par Santesson. Le chémotype est alors défini comme un « groupe chimiquement défini au sein d'une population d'individus morphologiquement indiscernables ». Le concept de chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs HES de composition chimique différente produites à partir de plantes d'une même espèce, définie par sa dénomination scientifique et non à partir de sa dénomination commune. (**Keefover-Ring et al., 2009 ; Deschepper, 2017**)

## I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

### I.6.1. Hydrodistillation

C'est la méthode d'extraction la plus couramment utilisée, qui dure entre 1 à 10 h (**Bruneton, 1993**) au cours de laquelle les matières végétales sont immergées dans l'eau et portées à ébullition. L'HE est libérée après éclatement des cellules, condensée dans un réfrigérant et collectée dans un vase florentin (**Dugo et Di Giacomo, 2002**). L'HE formée est ensuite récupérée par décantation ou par extraction liquide-liquide avec un solvant hydrophobe (**Azmir et al., 2013**).

### I.6.2. Distillation par entraînement à la vapeur

La distillation par entraînement à la vapeur est une technique où la matière végétale est disposée sur une plaque perforée et traversée par une vapeur d'eau. L'HE est entraînée avec la vapeur, condensée par refroidissement et récupérée par décantation ou extraction liquide-liquide avec un solvant hydrophobe. La particularité de cette méthode repose sur le fait que les matières végétales ne rentrent pas en contact direct avec l'eau.

## I.7. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

### I.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode physique de séparation exclusivement réservée aux composés gazeux ou pouvant subir une vaporisation par chauffage sans décomposition jusqu'à 300 °C (**Arpino et al., 1995**). Toutefois, il est possible de transformer les molécules chimiquement afin de les rendre volatilisables et thermostables, ça s'appelle alors une dérivation. Cette dernière concerne l'analyse des sucres, des acides aminés, mais aussi des lipides présentant des groupements polaires. La dérivation la plus courante est la silylation (**Halket et al., 2005**). En CPG, les molécules obtenues sont séparées entre deux phases : l'une stationnaire et l'autre

mobile. Cette technique assure une individualisation des composés à partir d'échantillons de l'ordre de microgrammes grâce au progrès technologiques en ce qui concerne les colonnes capillaires, les phases stationnaires et les détecteurs à ionisation de flamme (FID) (Paolini, 2005).

### **I.7.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM)**

La CPG est efficace pour séparer les différents constituants d'un mélange sans permettre pour autant une interprétation structurale ou même une identification précise. Ce qui a conduit à coupler la CPG à une technique analytique qui est la spectrométrie de masse (SM), qui a été concrétisé grâce au premier appareil CPG/SM datant de 1960 (De Maack et Sablier, 1994). Depuis lors, cette méthode est utilisée dans divers domaines tels que l'agroalimentaire, l'industrie pétrolière, cosmétique et surtout en aromathérapie. (McLafferty *et al.*, 1992). La spectrométrie de masse se base sur le principe d'une séparation des molécules en fonction de leur rapport masse-sur-charge ( $m/z$ ). Cette séparation à lieu grâce à la variation de courants et de champs électriques, ce qui implique que les molécules doivent être chargées pour être séparées. Un spectromètre de masse est composé de trois parties distinctes : la source, l'analyseur et le détecteur.

Au niveau de la source, les molécules subissent soit une ionisation chimique ou par impact électronique (IE). Les molécules sont ensuite libérées de leur solvant et transférées vers l'analyseur, qui peut être de plusieurs types dont les plus utilisés sont le quadripôle et le piège à ions (Wahl *et al.*, 1999, McLafferty *et al.*, 1993). Les analyseurs permettent de séparer les ions en fonction de leur rapport masse-sur-charge ( $m/z$ ). Enfin, le détecteur permet la détection et la conversion du signal électrique en données numériques qui seront transférées vers un ordinateur (Kebarle *et al.*, 2009). Les détecteurs les plus courants sont le châlons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs (Wahl *et al.*, 1999 ; McLafferty *et al.*, 1993).

## **Partie II : Monographie de l'espèce *Thymus vulgaris***

### **II.1. Généralités sur la famille des lamiacées**

Les lamiacées appelées aussi labiées, labiacées ou encore lamiaceae en latin, sont une des plus importantes familles des angiospermes avec approximativement 240 genres et plus de 6000 espèces (Miller, 2006). Elles ont une répartition cosmopolite avec une forte présence dans le bassin méditerranéen. Ce sont généralement des plantes herbacées ou des sous-arbrisseaux, rarement des arbres ou des lianes, annuelles ou pérennelles (Kokini *et al.*, 2003).

### **II.2. Présentation et étymologie de l'espèce *Thymus vulgaris***

*Thymus vulgaris* appelé communément Thym, زعتر en arabe et « زعيترة » en dialecte algérien, est une plante aromatique appartenant à la famille des lamiacées, dont le nom dérive du grec « thyos » qui veut dire odeur ou « thymus » signifiant courage (Stahl Biskup, 2012) (Figure 5).



**Figure 5 : Photo réelle de la plante *T. vulgaris* (Prasanth Reddy et al., 2014)**

### II.3. Synonymes

Les synonymes du nom de l'espèce *Thumus vulgaris* sont Thym commun, *Origanum thymus*, *Thymus collinus*, *Origanum webbium*, *Thymus baeticus* var. *Prostratus*, *Thymus chinensis*, *Thymus collinus*, *Thymus ilerdensis*, *Thymus micromerioides*, *Thymus subluxus*, *Thymus vulgaris* subsp. *Micromerioides*, *Thymus webbium*, thym de jardin commun, thym anglais, Farigoule, Garten thymian, herba thymi et herba timi (World Flora Online Data, 2023).

### II.4. Classification systématique de l'espèce *Thymus vulgaris*

La classification systématique de l'espèce *Thymus vulgaris* est présentée dans le Tableau 2

**Tableau 2 : Classification systématique de l'espèce *T. vulgaris***  
**(Directorate Agricultural Information Services, 2009)**

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous règne</b>	Trachéobiontes
<b>Super division</b>	Spermaphytes
<b>Super classe</b>	Asteridées
<b>Classe</b>	Magnoliopsidées
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Sous famille</b>	Nepetoidées
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thymus vulgaris</i> L.

### II.5. Description botanique de l'espèce *Thymus vulgaris*

Le *T. vulgaris* est un sous-arbrisseau vivace à feuilles persistantes, de 10 à 30 cm de hauteur, avec une durée de vie qui varie de 10 à 15 ans (Morales, 2002). Les racines sont petites, ligneuses et fibreuses avec des tiges dressées, très rameuses qui deviennent lignifiées avec l'âge. Ses petites feuilles de couleur grise verdâtre sont opposées, oblongues-lancéolées à linéaires de 10 mm de long et de 0,8 à 2,5 mm de largeur, parsemées de glandes et dont les bords sont recourbés et étroits. Les fleurs sont mauves, petites, disposées en capitules terminaux denses au calice inégal. La plante dégage une forte odeur caractéristique due principalement à la présence du thymol (Stahl-biskup et Venskutonis, 2012).

### II.6. Répartition géographique et habitat

Le *T. vulgaris* est largement réparti au niveau de tous les pays du bassin méditerranéen et cultivé dans la majorité des pays du nord et du milieu de l'Europe jusqu'à l'est pour atteindre la Sibérie (Stahl-biskup et Venskutonis, 2012). La plante pousse dans la plupart des climats doux, tempérés à chaud, ensoleillés et secs. En outre, la plante se prête mieux aux sols grossiers et rugueux qui ne conviennent pas à beaucoup d'autres espèces (Prasanth, 2014).

### II.7. Utilisations traditionnelles du *Thymus vulgaris*

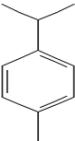
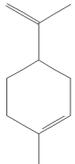
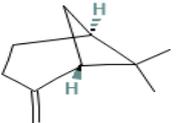
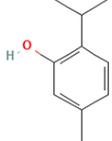
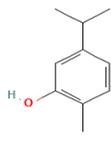
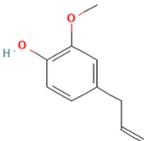
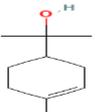
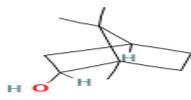
Le *T. vulgaris* est utilisé depuis l'antiquité comme condiment en raison de sa saveur et de son odeur aromatique. Il est aussi utilisé en médecine traditionnelle en thé, en pommade, en sirop ou en fumigation pour guérir diverses maladies respiratoires et pulmonaires (la coqueluche, la bronchite, asthme...etc.) (Hashim et Gamil, 1988). Le thym est aussi utilisé

pour traiter les maux de dents, les infections urinaires, les vers chez les enfants (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012), la dyspepsie et bien d'autres maux.

### II.8. Composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Thymus vulgaris*

La fraction volatile représentée par l'HE compte pour 2,5% du poids de la plante *T. vulgaris*. Les principaux composés qui composent l'HE sont regroupés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Les principaux composés de l'HE du *T. vulgaris***

Monoterpènes	Sesquiterpènes
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>p-Cymène (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Limonène (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Myrcène (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>β-pinène (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)</p> </div> <p style="text-align: center;"><b>Hydrocarbures</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Trans-β-Caryophyllène (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>)</p> </div> <p style="text-align: center;"><b>Hydrocarbures</b></p>
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Thymol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Carvacrol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Eugénol (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Linalool</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>α-Terpinéol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>γ-Terpinéol</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Bornéol</p> </div> <p style="text-align: center;"><b>Alcools</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Alcools</b></p>

### **I.9. Activités biologiques de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris***

L'HE du *T. vulgaris* est connue pour ses propriétés antimicrobiennes, antivirales, insecticides, antioxydante, anti-inflammatoire, nociceptive, et antispasmodique. (Pauli et Schilcher, 2010 ; Nolkemper *et al.*, 2006 ; Schnitzler *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2014 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012 ; Szczepanik *et al.*, 2012 ; Selmi et sadoki, 2008 ; Begrow *et al.*, 2010).

### **I.10. Toxicité de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris***

L'HE du *T. vulgaris* est réputée pour être sûre et non toxique pour les animaux (LD50 élevé) (Grespan *et al.*, 2014). En revanche, elle doit être utilisée avec précaution chez l'être humain car elle pourrait être à l'origine, de vertiges, de vomissements et de difficultés respiratoires (Newal et Anderson., 1996).

## **Partie III : Monographie de l'espèce *Cymbopogon nardus***

### **III.1. Généralités sur la famille des poacées**

Les poacées (poaceae) appelés aussi graminées, sont des monocotylédones, composées de 771 genres et de 12000 espèces. Elles représentent la cinquième famille la plus riche en espèces de plantes à fleurs derrière les fabacées, les orchidées, les astéracées et les rubiacées (Gibson, 2009). Les poacées sont des plantes annuelles ou vivaces à répartition cosmopolite qui regroupent la majorité des céréales. De plus, ce sont des plantes généralement herbacées caractérisées par la présence de tiges creuses cylindriques (chaumes) (Watson et dallwitz ,1992).

### **III.2. Présentation et étymologie du *Cymbopogon nardus***

Le *Cymbopogon nardus* (Rendle) communément appelé Citronella ou Citronnelle de Ceylan est une plante herbacée appartenant à la famille des poacées. Le terme *Cymbopogon* vient du grec *cýmbe* qui signifie tasse ou coupe, et *pógon* qui signifie barbe : en référence à la disposition des épis à l'aspect poilu. L'épithète spécifique *nardus* vient du grec *nardo*, nom que les anciens donnaient à de nombreuses plantes odorantes (Conti *et al.*, 2005) (Figure 6).

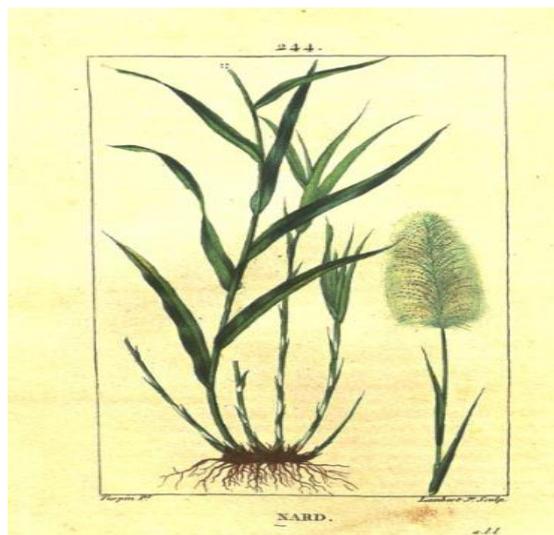


Figure 6 : Représentation de l'espèce de plante *C. nardus* (Florilegius, 2013)

### III.3. Synonymes

Les synonymes du nom de l'espèce *Cymbopogon nardus* sont *Andropogon citrosus* Steud, *Andropogon confertiflorus* Steud, *Andropogon grandis* Nees ex Steud, *Andropogon hamulatus* Nees ex Steud, *Andropogon nardus* L, *Andropogon nilagiricus* Hochst, *Andropogon pseudohirtus* Steud, *Andropogon thwaitesii* Hook.f., *Cymbopogon afronardus* Stapf et *Cymbopogon claessensii* Robyns (Conti *et al.*, 2005).

### III.4. Classification systématique de l'espèce *Cymbopogon nardus*

La classification systématique de l'espèce *C. nardus* est présentée dans le Tableau 4

Tableau 4 : Classification systématique du *C. nardus* (Clayton, 2008)

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous règne</b>	Trachéobiontes
<b>Super division</b>	Spermatophytes
<b>Division</b>	Magnoliophytes
<b>Classe</b>	Liliopsides
<b>Sous classe</b>	Commelinidées
<b>Ordre</b>	Cypérales
<b>Famille</b>	Poacées
<b>Genre</b>	<i>Cymbopogon</i>
<b>Espèce</b>	<i>Cymbopogon nardus</i> L.

### III.5. Description botanique du *Cymbopogon nardus*

Le *C. nardus* est une plante herbacée, pérenne, aromatique et vivace qui forme des touffes pouvant atteindre jusqu'à 2,5 mètres de hauteur générée par un système rhizomatique robuste. Les feuilles ont la forme de rubans de couleur vert vif, mesurant jusqu'à 1,6 cm de large et 1 mètre de long. Elles sont portées par des tiges dressées et rigides, semblables à de petits bambous. Les panicules étroites mesurent 15 à 30 cm de long portant des grappes d'inflorescences non ramifiées de 8 à 10 cm de long (Conti *et al.*, 2005 ; Harrington et Pratchett, 1974). Les feuilles et les tiges dégagent un parfum intense, légèrement citronné, qui devient très fort si vous frottez les feuilles entre vos doigts. (Pignatti, 1982).

### III.6. Répartition géographique et habitat

Le *C. nardus* est natif d'Inde du Sud et du Sri Lanka (Hamzah *et al.*, 2014). Il est cultivé principalement dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Afrique et d'Asie (Chen *et al.*, 2014). La plante pousse de manière optimale dans les zones où la température varie entre 20 à 30 °C, mais peut tolérer de 16 à 36 °C. Le sol limono-sableux, fortement humide est considéré comme celui qui convient le mieux à la bonne croissance de la plante. (Blank *et al.*, 2007).

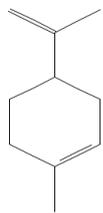
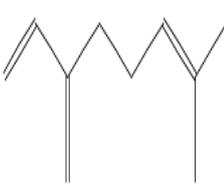
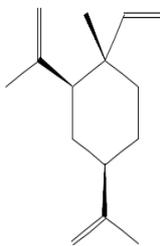
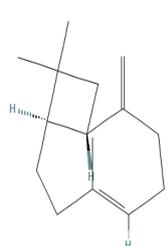
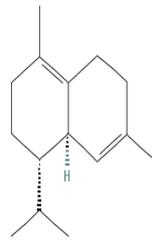
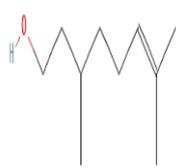
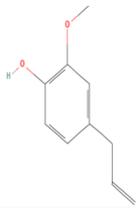
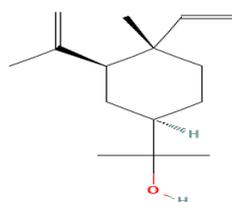
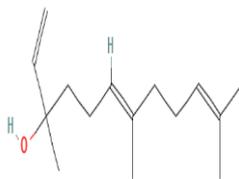
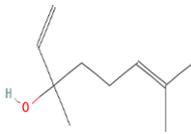
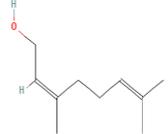
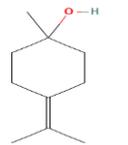
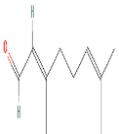
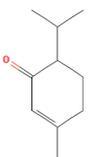
### III.7. Utilisation traditionnelle du *Cymbopogon nardus*

En Ayurveda, le *C. nardus* était principalement utilisé en traitement des rougeurs, des irritations, des maux de dents, de l'inflammation de la peau, des rhumatismes, des problèmes digestifs, des maux de tête, des maladies infectieuses et de la fatigue. En Thaïlande et en Chine, l'HE du *C. nardus* était traditionnellement utilisée pour le traitement du côlon irritable, des maux d'estomac, des crampes intestinales, de la gastrite, de l'indigestion et des flatulences (Salguero, 2003 ; Akhila, 2010). De nos jours, l'HE du *C. nardus* est utilisée en parfumerie, en cosmétique, comme emballage anti-insectes et dans les produits de soins corporels (Hamzah *et al.*, 2014 ; Wany *et al.*, 2014 ; Wong et Signal, 2005).

### III.8. Composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus*

La fraction volatile du *C. nardus*, représentée par l'HE constitue 1 à 2 % du poids de la plante sèche. Les principaux composés terpéniques qui composent l'HE sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Les principaux composés de l'HE du *C. nardus* (Kaur *et al.*, 2021)

Monoterpènes			Sesquiterpènes		
					
Camphène (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	Limonène (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	Myrcène (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	β-Elémène (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	β-Caryophyllène (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	α-Cadinène (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )
Hydrocarbures			Hydrocarbures		
					
Citronellol (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O)	Géraniol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	Eugénol (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> )	Elémol (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)	Nérolidol (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)	
					
Linalool (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	Nérol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	γ-Terpinéol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)			
Alcools			Alcools		
					
Citronellal (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	Géraniol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	Néral (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	Pipéritone (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)		
Aldéhydes			Cétones		

### III.9. Activités biologiques de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'HE du *C. nardus* est réputée pour ses propriétés insecticides (Mhalwal et Ali, 2003 ; Quintans-Junior *et al.*, 2011), mais aussi comme désinfectant dans le traitement de morsures de serpents et des piqûres d'insectes venimeux (Yadav *et al.*, 2014). Elle a aussi une action herbicide très puissante à l'encontre de la germination de nombreuses espèces de graines de

mauvaises herbes telles que le Billy chèvre-herbe (*Ageratum conyzoides*), l'herbe à poux parthénium (*Parthenium hysterophorus*), le chénopode commun (*Chenopodium album*), le caféier (*Cassia occidentalis*) et bien d'autres espèces (Singh *et al.*, 2006).

#### **I.10. Toxicité de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus***

L'HE du *C. nardus* est largement utilisée depuis l'Antiquité et considérée comme sûre sans effets secondaires notoires (Katz *et al.*, 2008). En outre, l'HE du *C. nardus* est incluse dans la liste des composés non carcinogènes (IARC, 2019).

### **Partie IV. Stress oxydatif et antioxydant**

#### **IV.1. Définition**

Le stress oxydatif est le résultat du déséquilibre de la balance entre le système oxydant et le système antioxydant, ce qui engendre des dégâts souvent irréversibles au niveau cellulaire (Favier, 2003). Le déséquilibre se produit quand le système de défense antioxydant est submergé par l'augmentation des oxydants ou par carence d'apport ou de production de ces derniers. L'homéostasie redox est déséquilibrée et la cellule devient vulnérable (McLaren *et al.*, 2006), ce qui engendre la survenue de pathologies (cancer, maladies cardiovasculaires et maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré.

#### **IV.2. Les espèces réactives (oxydantes)**

Les espèces réactives (pouvant être de nature radicalaire ou non) se divisent en deux catégories principales : les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERA). Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique, un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplée à un électron de spin opposé, ce qui lui confère une grande instabilité et réactivité.

##### **IV.2.1. Espèces réactives d'oxygène (ERO)**

Les ERO sont produits surtout au niveau de deux sites cellulaires, la mitochondrie et la membrane plasmique. Les ERO se divisent en espèces réactives radicalaires et non radicalaires. La première catégorie est représentée par l'anion radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). Alors que les ERO non radicalaires comprennent l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochlorique ( $HOCl$ ) (Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006 ; Gutteridge *et al.*, 1993).

##### **IV.2.2. Espèces réactives d'azote (ERA)**

Les ERA se divisent en espèces réactives radicalaires et non radicalaires. Les espèces radicalaires comprennent principalement le radical  $NO^{\cdot}$ . En revanche, les ERA non radicalaires comportent le monoxyde d'azote ( $NO$ ) qui est faiblement réactif. (Delattre *et al.*, 2005b ;

Valko *et al.*, 2006) Ce dernier peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées pour produire du dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>).

#### IV.2.3. Espèces réactives non biologiques

Il existe des radicaux libres « non biologiques » qui sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydante des différents composés. Parmi ces radicaux, on peut citer le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) et le radical cation ABTS •+ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

#### IV.3. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme toute substance chimique ayant la capacité d'entrer en compétition avec d'autres substances oxydantes (radicalaires et non radicalaire) afin d'empêcher l'oxydation de substrats (les lipides, les protéines, l'ADN et les sucres).

Les antioxydants sont un groupe de composés du système antioxydant endogène (enzymatiques, et non enzymatiques), de vitamines, d'oligo-éléments et de polyphénols. Le système antioxydant enzymatique endogène comprend notamment la catalase, le glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase. Alors que le système antioxydant endogène non enzymatique comprend des molécules telles que le glutathion et l'acide lipoïque. Les apports en antioxydants exogènes sont fournis principalement par les vitamines (vitamine C, E, A, les caroténoïdes), les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc) et les composés phénoliques (les plantes) (McCall et Frei, 1999 ; Masella *et al.*, 2005 ; Delattre *et al.*, 2005d) (Figure 7).

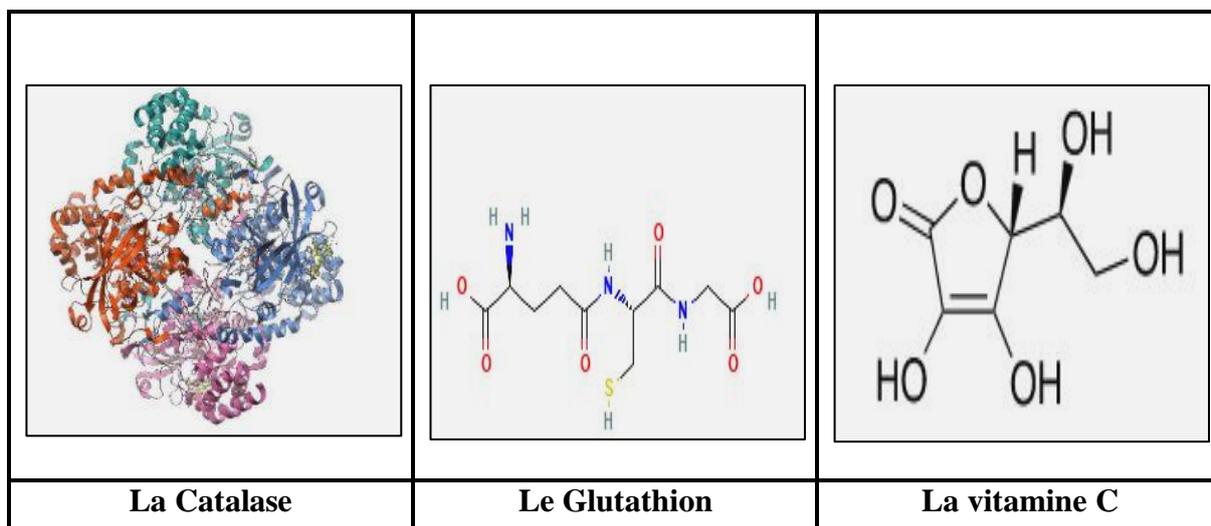


Figure 7 : Exemple de quelques antioxydants

## Partie V. Présentation et structure de la cellule fongique

### V.1. Présentation de la cellule fongique

Le règne des champignons est représenté par une incroyable diversité, ce sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires. Ils partagent cependant comme caractères communs le fait d'être des hétérotrophes (assimilation de substances organiques), absorbotrophes (nutrition par absorption des nutriments à travers la paroi extérieure), de se reproduire grâce à des spores et de posséder une paroi cellulaire riche en chitine. Ils se développent via des filaments mycéliens appelés thalles (unicellulaires pour les levures ou pluricellulaires pour les filamenteux).

Parmi les champignons impliqués en pathologie humaine, on peut citer ceux appartenant aux phylums des *Zygomycètes*, des *Ascomycètes* et des *Basidiomycètes*. Les ascomycètes font partie des champignons dits « supérieurs » aux côtés des basidiomycètes. La reproduction sexuée des ascomycètes produit des ascospores et la multiplication asexuée aboutit à des conidies au sommet d'un conidiophore. Parmi les milliers d'espèces regroupées au sein de ce phylum, plusieurs sont d'intérêt majeur en pathologie humaine : que ce soit parmi les champignons filamenteux ou des levures (*Aspergillus*, *Candida* ou encore *Saccharomyces*) (Simon, 1992).

### V.2. Structure de la cellule d'une levure

Les cellules de levures présentent une grande diversité en termes de taille, de forme et de couleur. Même les cellules individuelles d'une souche pure d'une même espèce peuvent présenter une hétérogénéité morphologique. La taille des cellules de levure varie considérablement : certaines levures peuvent ne mesurer que 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long, tandis que d'autres espèces peuvent atteindre 20 à 50  $\mu\text{m}$ . La largeur des cellules est moins variable, d'environ 1 à 10  $\mu\text{m}$ . A titre d'exemple, l'espèce de levure *Saccharomyces cerevisiae* possède des cellules qui apparaissent comme des structures ovoïdes ou ellipsoïdales. Les valeurs moyennes pour le grand diamètre varient entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ , et pour le petit diamètre entre 1 et 7  $\mu\text{m}$ .

Les cellules de levures présentent des caractéristiques ultrastructurelles typiques des autres cellules eucaryotes, notamment la présence d'organites liés à une membrane (Figure 8). Les cellules de levure contiennent toutes les structures subcellulaires typiques des eucaryotes. Ces structures comprennent le cytosquelette, un noyau et divers organites subcellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les mitochondries et les microrganismes. Comme chez les plantes, les cellules de levure contiennent une vacuole et la membrane plasmique est entourée d'une paroi cellulaire rigide. Cependant,

les chloroplastes sont absents chez tous les champignons, dont les levures (Van Der Klei *et al.*, 2011).

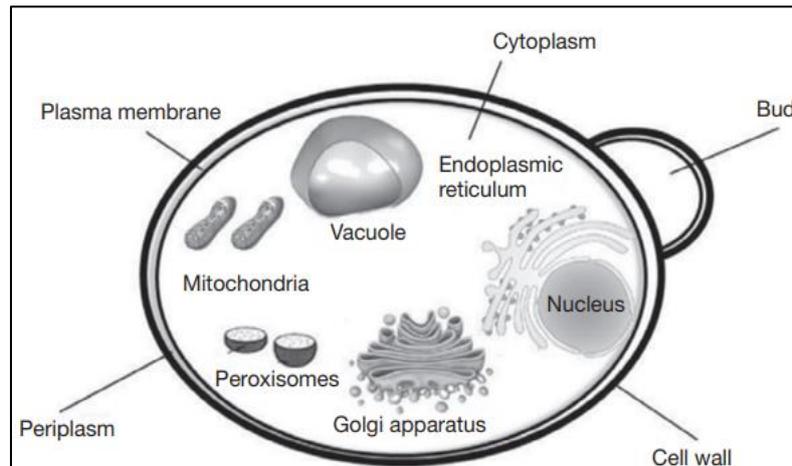


Figure 8 : Cellule de levure et ses principaux organites (Tofalo *et al.*, 2016).

### V.3. Structure de la paroi cellulaire d'une levure

La coque externe est une structure rigide d'environ 100 à 200 nm d'épaisseur et constitue environ 25 % de la masse sèche totale de la cellule. La paroi cellulaire est composée de quatre classes de macromolécules : des glycoprotéines hautement glycosylées (mannoprotéines), deux types de  $\beta$ -glucanes et de la chitine. En revanche, la membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique riche en stérols et de protéines liées (N.B : les stérols sont absents des membranes des cellules procaryotes). Le principal constituant lipidique de la membrane des cellules fongiques est l'ergostérol, équivalent du cholestérol pour les cellules des mammifères. (Hartland, 1994 ; Lipke et Ovalle, 1998 ; Cabib *et al.*, 2001) (Figure 9).

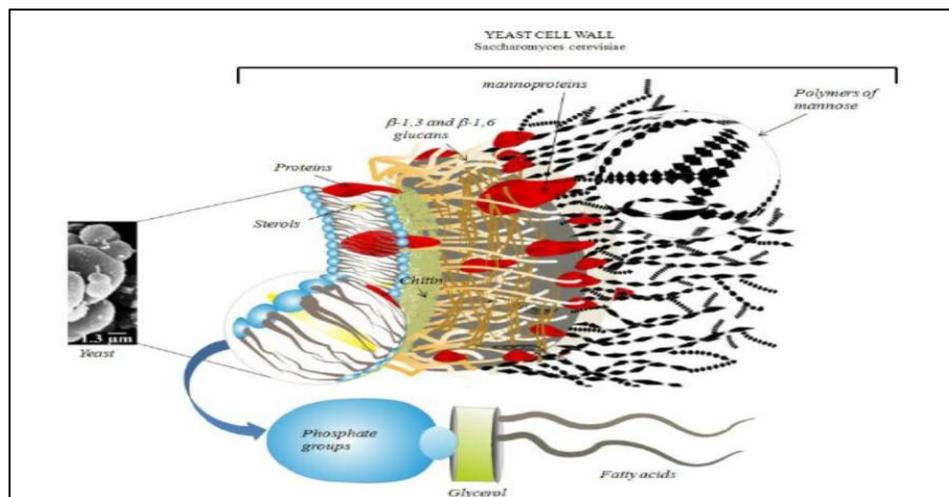


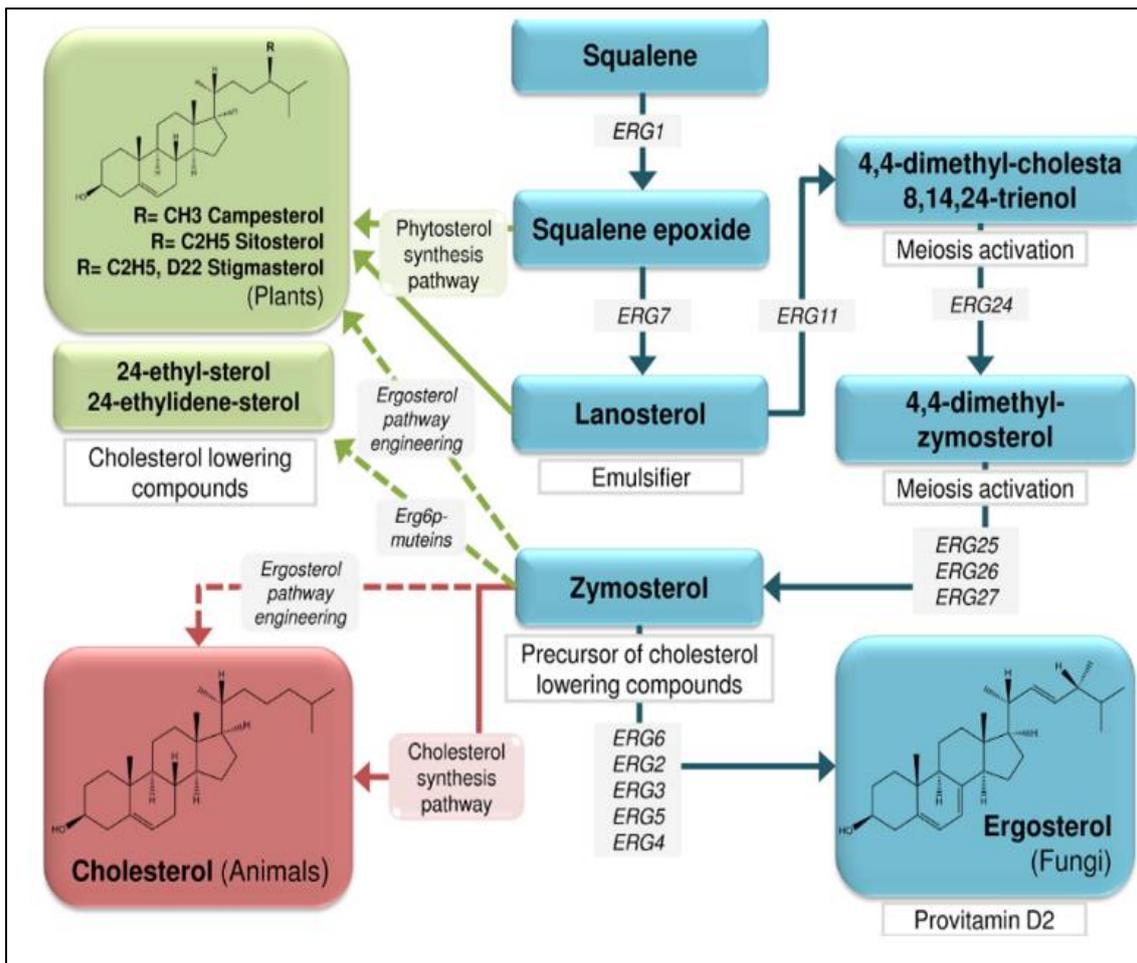
Figure 9 : Composition de la paroi cellulaire de la souche de levure *S. cerevisiae* (Talavera *et al.*, 2013).

#### V.4. Biosynthèse de l'ergostérol

L'ergostérol est un composant essentiel des membranes cellulaires fongiques qui détermine la fluidité, la perméabilité et l'activité des protéines associées à la membrane. La biosynthèse de l'ergostérol est une opération complexe et voie très énergivore qui implique la participation d'un certain nombre d'enzymes. Des dysfonctionnements de la biosynthèse de l'ergostérol provoquent des défauts pléiotropes qui limitent la prolifération cellulaire et mènent à la mort cellulaire (**Jordá et Puig, 2020**). La levure *S. cerevisiae* est un organisme modèle pour étudier l'homéostasie intracellulaire des stérols. L'ergostérol des levures est synthétisé par une voie hautement conservée et complexe qui peut être divisée en trois parties (**Hu et al., 2017**) (Figure 10).

La première partie est conservée chez tous les eucaryotes et aboutit à la formation du mévalonate à partir de l'acétyl-CoA. La deuxième partie se déroule dans la vacuole et implique la formation de farnésyl pyrophosphate (farnésyl-PP). La troisième partie ou voie tardive implique la synthèse de l'ergostérol lui-même par des réactions consécutives qui se produisent principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Tout d'abord, deux molécules de farnésyl-PP sont utilisées par l'enzyme squalène synthase (ERG9) pour former le squalène, qui est le précurseur de tous les stéroïdes. Deuxièmement, le squalène est converti en lanostérol par l'action consécutive de la squalène monooxygénase (ERG1) et de la lanostérol synthase (ERG7).

Dans les étapes suivantes, le lanostérol est transformé en zymostérol par un processus complexe impliquant diverses réactions de déméthylation, de réduction et de désaturation catalysées par la lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase (ERG11), la C-14 stérol réductase (ERG24) et un complexe de déméthylation C-4-ERG25-ERG26-ERG27. Les enzymes ERG28 et ERG29 sont aussi susceptibles de participer à la réaction du complexe de déméthylation C-4 (**Liu et al., 2019 ; Ward et al., 2018**). Le zymostérol est le premier intermédiaire de la voie de biosynthèse qui peut être incorporé dans les membranes cellulaires (**Zinser et al., 1993**). Ensuite, l'enzyme delta (24) -stérol C-méthyltransférase (ERG6) convertit le zymostérol en fécostérol, suivi de la formation d'épistérol grâce à la C-8 stérol isomérase (ERG2). L'épistérol est finalement désaturé et réduit par la stérol C-5 désaturase (ERG3), la C-22 stérol désaturase (ERG5) et la delta (24(24(1))) -stérol réductase (ERG4) en ergostérol. L'ergostérol est synthétisé dans le RE, mais est principalement transporté vers la membrane plasmique.



**Figure 10 : Schéma illustrant les étapes clés de biosynthèse de l'ergostérol chez les champignons (Jordá et Puig, 2020).** ERG1, la squalène monooxygénase ; ERG2, C-8 stérol isomérase ; ERG3, stérol C-5 désaturase ; ERG4, delta (24(24(1)))-stérol réductase ; ERG5, C-22 stérol désaturase ; ERG6 delta (24) -stérol C-méthyltransférase ; ERG7, lanostérol synthase (Erg7) ; ERG9, squalène synthase ; ERG11, lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase ; ERG24, C-14 stérol réductase ; ERG25, C-4 méthyl stérol oxydase, ERG26, C-3 stérol déshydrogénase ; ERG27, 3-céto-stéroïde réductase.

## Partie VI. Les conservateurs alimentaires

### VI.1. Définition des additifs alimentaires

La définition d'un additif alimentaire selon le Codex Alimentarius : aux fins du codex alimentarius l'expression "additif alimentaire" se dit de toute substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire en soi, et n'est pas normalement utilisée comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive et dont l'addition intentionnelle à la denrée alimentaire dans un but technologique ou organoleptique à une étape quelconque de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de ladite denrée, entraîne ou peut entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée on peut affecter d'une

autre façon les caractéristiques de ladite denrée. L'expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires dans le but d'en maintenir ou améliorer les propriétés nutritives (**Codex alimentarius,1989**).

## **VI.2. Classification des additifs alimentaires selon leur catégorie fonctionnelle**

La dénomination des additifs alimentaires se fait par la lettre E en référence à l'autorisation par l'Union européenne ou SIN pour le système international suivi de trois lettres en référence à la catégorie (100 pour les colorants, 200 pour les conservateurs, 300 pour les antioxydants, 400 pour les agents de texture) (**Codex alimentarius,1989**).

## **VI.3. Agents de conservations chimiques**

### **V.3.1. Définition**

Les agents de conservation communément appelés conservateurs sont des substances chimiques numérotées d'E200 à E290 selon les normes de la communauté économique européenne (CEE). Les conservateurs sont à peu près 40 composés réglementés, dont la fonction est de retarder ou d'empêcher une prolifération des microorganismes à travers une action bactériostatique et/ou fongicide. L'utilisation des agents de conservation est restreinte autant que possible au profit des traitements thermiques surtout pour les denrées à consommation progressive (confitures, conserves, cornichons, jus). Les conservateurs les plus utilisés sont, l'acide benzoïque, les parabènes, l'acide sorbique, les acides organiques, l'anhydride sulfureux, le benzoate de sodium et le sorbate de potassium (**Bourgeois, 1984**)

### **VI.3.2. Benzoate de sodium**

#### **VI.3.2.1. Définition**

Le benzoate de sodium (Figure 11) est un conservateur dérivé de l'acide benzoïque, actif contre les levures et les bactéries et à un degré moindre contre les moisissures (**Cruess, 1932**). Son intervalle de pH fonctionnel et optimal s'étend de 2,5 à 4 ce qui le rend adapté à la conservation des aliments qui sont acides ou facilement acidifiés (les boissons à base de carbonates, les jus de fruits).

#### **VI.3.2.2. Propriétés chimiques et physiques**

Le benzoate de sodium se présente sous forme de poudre blanche. Il peut être mélangé en étant sec dans des quantités de liquide et se dissoudre promptement. Sa température de fusion est comprise entre 120 °C et 124 °C.

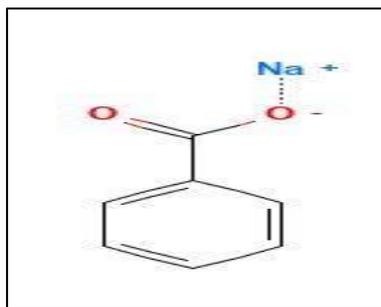


Figure 11 : Structure chimique du benzoate de sodium

### VI.3.2.3. Sécurité d'utilisation

Le benzoate de sodium mélangé à la nourriture a moins de 0,5g/jours et à 5mg/kg de poids corporel, ne présente pas un d'effet délétère ou poisonneux pour la santé de l'homme. En revanche, à plus forte dose (4g/jour) des manifestations allergiques (urticaire, asthme, prurit) peuvent apparaître (**Griffith et al., 1989**). Le benzoate de sodium pourrait aussi être un facteur d'hyperactivité, chez des enfants (**Bateman, 2004**) et provoquerait des insomnies, un affaiblissement du système immunitaire, digestif ( **Maier et al., 2010**). Un effet cancérigène de cette substance a aussi été rapporté lorsqu'elle est en présence de la vitamine C, ce qui pourrait constituer un sérieux problème pour la conservation des jus (**FDA, 2006**)

### VI.3.3. Sorbate de potassium

#### V.3.3.1. Définition

Le sorbate de potassium (Figure 12) est un conservateur dérivé de l'acide sorbique, actif à basse concentration contre les levures et les moisissures et à un degré moindre contre les bactéries. Son intervalle de pH fonctionnel s'étend jusqu'à 6,5 (**Beneke et al., 1955**). Il est utilisé pour la conservation de nombreux aliments tels que les fromages, les jus de fruits, les fruits mûrs, les légumes et les marinades.

#### V.3.3.2. Propriétés chimiques et physiques

Le sorbate de potassium se présente sous forme de poudre blanche, très soluble dans l'eau (139,2g /100mL) à 20 °C et sa température de fusion est de 270 °C.

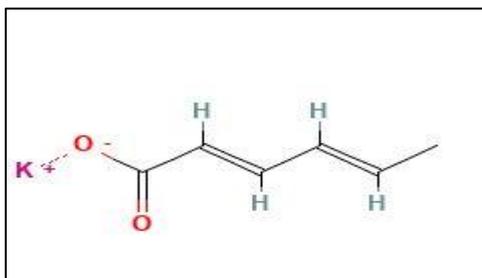


Figure 12 : Structure chimique du sorbate de potassium

### V.3.3.3. Sécurité d'utilisation

Le sorbate de potassium présente une dose létale (DL50) de 4 à 7g/kg de poids corporel chez le rat. (Deuel *et al.*, 1954 ; Smyth *et al.*, 1948). Cependant, il peut être toxique pour l'ADN des lymphocytes humains (Mamur *et al.*, 2012), en plus d'être à l'origine de mutations génétiques s'il est combiné avec des nitrites (Hartman, 1983).

## Parties VII. Présentation du docking moléculaire

### VII.1. Définition du docking moléculaire

Le docking moléculaire ou amarrage moléculaire en français, est une des techniques de modélisation dont la particularité consiste à combiner deux molécules ou plus. L'importance de la méthode consiste à étudier et à prédire les interactions possibles entre des ligands (petites molécules activatrices ou inhibitrices) et les acides aminés qui constituent la structure d'un récepteur (protéine) qui est souvent une enzyme. (bioinfo-fr). Le docking moléculaire se base sur des méthodes de calcul pour évaluer l'orientation optimale d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable (Lengauer et Rarey, 1996)

### VII.2. Types de Docking

Il existe trois types de docking moléculaire :

- Le docking rigide qui consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine ligand en considérant que chacune des deux molécules est une entité rigide tout en conservant une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte.
- Le docking flexible où les structures de la protéine et du ligand sont modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités (Thiriou, 2009).
- Le troisième type est à mi-chemin des deux premiers, c'est le docking semi-flexible, où les partenaires d'interaction sont partiellement déformables. En général, le récepteur est traité comme étant rigide et le ligand comme étant totalement flexible. (Aurélien, 2007)

### VII.3. Etapes du Docking moléculaire

La technique du docking moléculaire se fait en quatre étapes principales (Figure 13) :

- La première étape consiste à l'obtention de la structure tridimensionnelle des protéines et des ligands.
- La seconde étape consiste à la préparation des structures (récepteurs et ligands) en vue du docking moléculaire. Pour cela, il est nécessaire de veiller à résoudre les problèmes de clashes stériques, ainsi que ceux des états de protonation.

- La troisième étape, c'est le docking à proprement dit qui est la méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable.

- La quatrième étape consiste à la prédiction et à l'évaluation des résultats obtenus afin de mettre au point des modes d'interactions potentielles. L'évaluation de la validation des meilleurs résultats se fait grâce à un algorithme de docking et a des fonctions de score. (Aurélien, 2007).

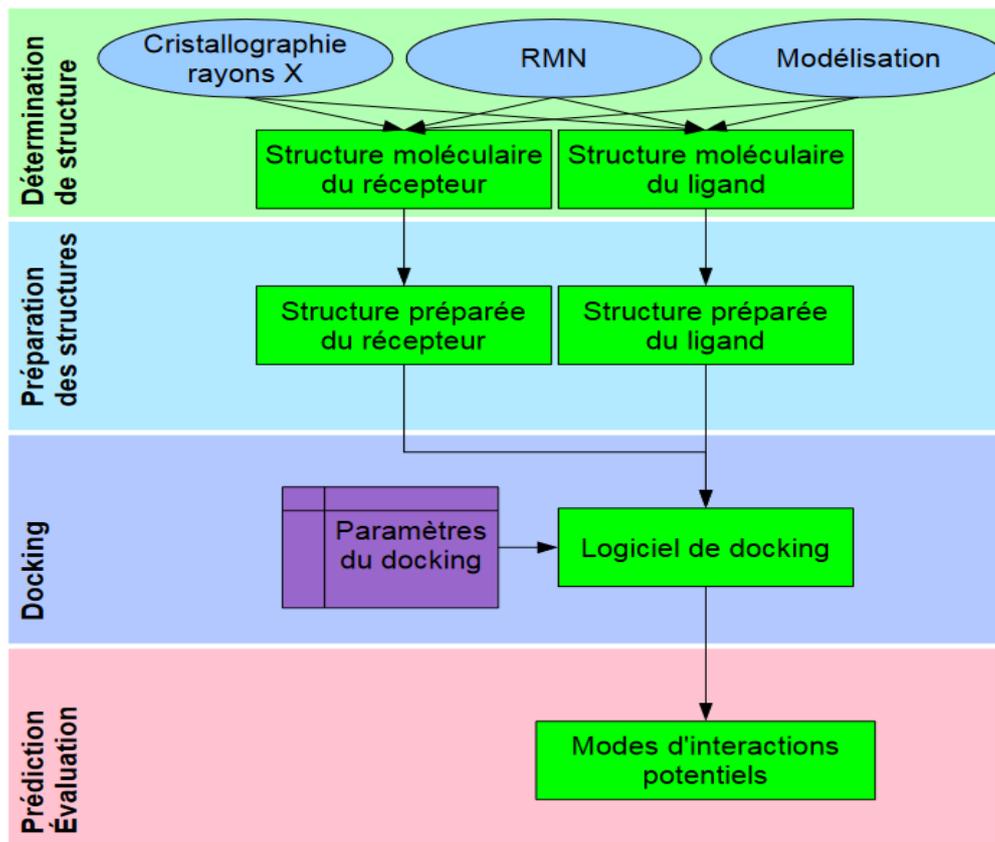


Figure 13 : Etapes typiques d'un docking moléculaire (Aurélien, 2007)

#### VII.4. Algorithme de docking

Un algorithme de docking doit pouvoir explorer l'espace conformationnel possible, de façon efficace et exhaustive. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (Root-Mean-Square Deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du crystal. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms ( $\text{Å}^\circ$ ) au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate. (Vieth, 1998 ; Gabb, 1997)

### VII.5. Fonctions de score

La fonction de score est une donnée numérique nécessaire afin de quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant (**Kollman *et al.*, 2000**) :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{Ligand}} - \Delta G_{\text{Protéine}}$$

L'établissement d'une bonne fonction de score est un important problème du docking moléculaire. Il arrive souvent que la solution évaluée comme étant la plus probable ne soit pas la forme native attendue. Ceci peut être dû au fait que le complexe natif n'est pas forcément celui qui présente la plus grande surface d'accès, ou encore le plus grand nombre de liaisons hydrogène disponibles. L'estimation de l'affinité repose généralement sur un calcul d'énergie contenant un certain nombre d'approximations. Pour cela, il existe différentes fonctions de scores qui sont généralement classées en quatre familles (**Brut, 2009 ; Gohlke et Klebe, 2002 ; Ferrara *et al.*, 2004**) : les fonctions de score basées sur un champ de force, les fonctions de score empiriques, les fonctions de score consensus, et les fonctions de score du type knowledge-based.

### VII.6. Interactions protéines-ligand

Le problème qui se pose pendant l'ancrage du ligand au sein de la protéine (docking) est la prédiction de la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Parmi les interactions qui peuvent exister entre le ligand et la protéine, il y a celles de type polaire (liaisons hydrogène, ioniques et les interactions de Van der Waals) et celles de type hydrophobe qui sont issu d'un contact entre des groupements hydrophobes. (**Leach et Kuntz, 1992 ; Böhm et Ludi, 1992 ; Böhm, 1994**)

#### VII.6.1. Liaison hydrogène

La liaison hydrogène est une liaison chimique non-covalente (faible) de type dipôle-dipôle entre deux molécules ou entre deux groupements d'une molécule. C'est une force d'attraction entre deux molécules dont l'une possède un atome très électronégatif (O, N, F) et l'autre un atome d'hydrogène (OH, NH<sub>2</sub>). Ce type de liaison résulte d'un transfert partiel d'un électron célibataire sur le groupement H et peut être intramoléculaire ou intermoléculaire (Figure 14). Les liaisons hydrogène jouent un rôle très important en chimie et en biochimie, car elles jouent le rôle de stabilisateurs de la structure secondaire des macromolécules biologiques. Elles sont aussi responsables des interactions intermoléculaires (reconnaissance de petites molécules par des récepteurs) (**Atkins et De Paula, 2013**).

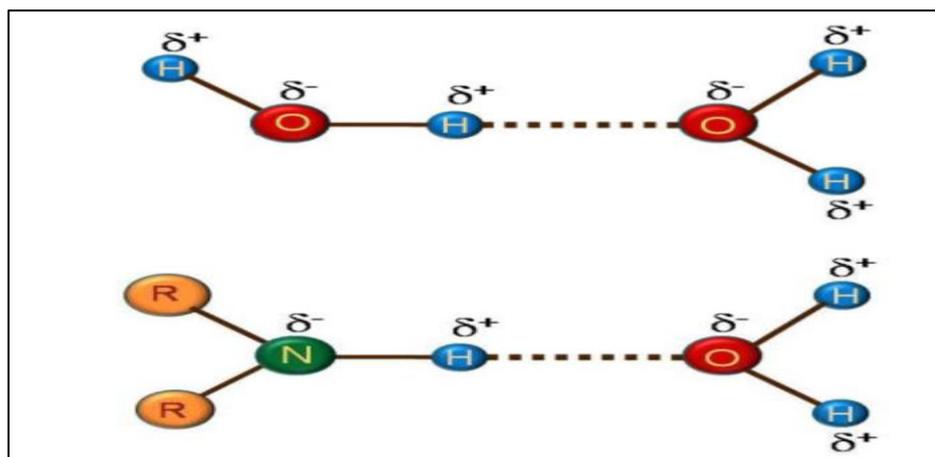


Figure 14 : Formation d'une liaison hydrogène (Gerschel, 2012)

### VII.6.2. Interaction de Van der Waals

Ces interactions reposent sur les interactions entre les dipôles constitués par les molécules ou entre une molécule et un cristal. Il en existe trois types : l'interaction électrostatique entre deux multipôles permanents qui se nomme les forces de Keesom , l'interaction entre un multipôle permanent et un multipôle induit (effets d'induction) appelée les forces de Debye . Enfin, l'interaction électrostatique entre deux multipôles induits (effets de dispersion), appelée les forces de London. Les forces de Van der Waals sont très faibles, mais lorsqu'elles sont présentes dans des macromolécules en nombre important, ça engendre une force importante (Gerschel, 2021).

### VII.6.3. Les interactions hydrophobes

Les molécules non-polaires et peu polarisables (hydrophobes) ont tendance à se regrouper pour créer une force d'interaction hydrophobe. Il s'agit d'interactions entre molécules ou groupements qui ont très peu d'affinité pour l'eau. Les groupements vont se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau. Les groupements vont donc s'attirer mutuellement par des forces de type dispersion (London). Plusieurs acides aminés hydrophobes se trouvent en contact à l'interface par complémentarité hydrophobe. Ces derniers entraînent une interaction stabilisante pour beaucoup de complexes. Les acides aminés non-polaires tendent à créer entre elles des liaisons de type interactions "patch" hydrophobe (Figure 15) (Israelachvili, 2011).

Il existe divers types d'interactions hydrophobiques, mais les plus fréquentes sont celles qui se forment entre le centre d'un cycle aromatique et les atomes d'un autre cycle, d'un amide ou de groupements méthyles. Pour le placement du ligand dans le site actif de la protéine, les interactions hydrogènes sont utilisées en premier, ensuite celles hydrophobes. (Rarey *et al.*, 1999)

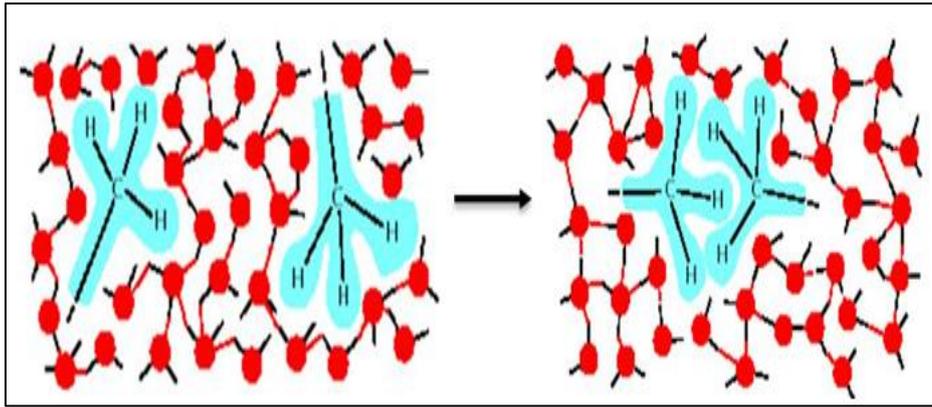


Figure 15 : Formation d'une interaction hydrophobe (Gerschel, 2012)



## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

### Cadre de l'étude

Mon travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire de recherche en Technologie Alimentaire (LRTA) de l'université M'hamed Bougara de Boumerdès (UMBB) et du laboratoire Ethnobotanique et Substances Naturelles de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba. Ce travail repose sur le protocole expérimental suivant :

-Evaluation des propriétés physico-chimiques par GC/FID et GC/SM des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* réalisée au niveau du laboratoire de chimie et de biomasse de l'université de Corse (France).

-Evaluation *in vivo* de la toxicité orale aiguë réalisée au niveau de l'animalerie du centre de recherche (CRD) du laboratoire pharmaceutique SAIDAL (Djasr Kasentina, Alger). L'étude histopathologique a été réalisée au niveau du laboratoire d'Anatomie et de Cytopathologie Vétérinaire de l'institut PASTEUR Algérie (Annexe El Hamma).

-Evaluation de la cytotoxicité des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* par test MTT réalisée au niveau du Laboratoire de Cytologie des Plantes et de Biotechnologie, du département des substances naturelles et d'innovation en systèmes biologiques de l'université de Tuscia (Viterbo, Italie).

-Etude *in vitro* de l'activité antibactérienne des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* vis-à-vis de 10 souches bactériennes à Gram positif et négatif réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'ADE de Boumerdès.

- Etude *in vitro* de l'activité antifongique des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* vis-à-vis de 9 souches de levures et de champignons filamenteux (moisissures) au niveau du laboratoire de Mycologie de l'institut Pasteur d'Alger (Deli-brahim)

- Evaluation de l'activité antioxydante des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* par deux tests (DPPH et ABTS) différents.

-Application des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* comme conservateurs antimicrobiens envers une souche fongique (*S. cerevisiae*) dans un système alimentaire qui est une boisson commerciale gazeuse à base d'agrumes (Orangina®). De plus, l'effet de l'association des deux HEs à un traitement thermique modéré sur la conservation antifongique de la boisson choisie a aussi été investigué. L'expérience a été réalisée au niveau du Centre Technique des Industries Agroalimentaires (CTIAA) de Boumerdès. Alors que l'identification moléculaire de la souche testée a été effectuée au niveau du laboratoire Gene Life Sciences (Sidi bel abbés, Algérie).

-Evaluation *in silico* des propriétés ADME des composés des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* et l'étude par docking moléculaire du mécanisme d'action impliqué dans l'effet antifongique des deux HEs étudiées envers la souche *S. cerevisiae*.

## Partie I. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon nardus*

### I.2. Matériel végétal

Les deux HEs du *T. vulgaris* et le *C. nardus* ont été fournies par la société ZIPHEE-Bio (Lakhdaria, Bouira, Algérie). Les deux plantes ont été cueillies de la wilaya de Djelfa et les HEs ont été obtenues par entraînement à la vapeur de leurs parties aériennes.

### I.3. Analyse en CG/FID combinée à une GC/SM

Les deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont subi une GC/FID combinée à une GC/SM.

#### I.3.1. Analyse en CG/ FID

Les échantillons des deux HEs ont été analysés par un chromatographe en phase gazeuse, de la marque Clarus associé à un détecteur à ionisation de flamme (FID) et à deux colonnes capillaires de polarité opposées. Les conditions d'analyses des échantillons sont regroupées dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : Conditions opératoires de la CG/FID**

Composant	Particularité et température
Clarus Perkin Elmer	500
FID	300 °C
Injecteur	250° C
Volume injecté	0,5 µL
Mode	Split (1/60)
Colonne 1 (apolaire)	BP-1(polydiméthylsiloxane)
Gaz vecteur	Hélium
Colonne 2 (polaire)	BP-20 (polyéthylène glycol)
Dimension des colonnes (Longueur, diamètre intérieur, épaisseur du film)	50 m, 0,22 mm,0,25µm
Température du four	60°C à 2°C/min jusqu'à 220°C (20 min)
Gaz vecteur	Hélium, Débit : 0,8 mL/min

#### I.3.2. Analyse en GC/SM

Les spectres de masse des composés volatils ont été obtenus par un spectromètre de masse à quadripôle et à ionisation par bombardement électronique Clarus, couplé directement à un chromatographe Clarus Perkin-Elmer équipé d'une colonne dotée d'un injecteur automatique. Les conditions d'analyses des échantillons sont résumées dans le Tableau 7.

**Tableau 7 : Conditions opératoires de la GC/SM**

Composant	Particularité et température
Clarus Perkin-Elmer	Autosystem XL
FID	300 °C
Injecteur	250 °C
Volume injecté	0,2 µL
Mode	Split (1 :80)
Colonne	BP-1(polydiméthylsiloxane)
Gaz vecteur	Hélium
Dimension de la colonne (Longueur, diamètre intérieur, épaisseur du film)	60 m, 0,22 mm, 0,25µm
Gradient	60 °C à 2 °C/min jusqu'à 230 °C (45 min)
Gaz vecteur	Hélium, Débit : 1 mL/min
<b>SM</b>	
Détecteur, quadripôle	Clarus SQ8S Perkin Elmer TurboMass
Type d'ionisation	Impact électronique à 70 eV
Balayage automatique (La masse du scan)	40-400 Da
Source d'ion	230°C

#### I.4. Identification des composés volatils

L'identification des composés volatils a été réalisée par CG/FID combinée à une GC/SM après une double séparation des échantillons sur deux types de colonnes capillaires polaire BP-20 (polyéthylène glycol) et apolaires BP-1 (polydiméthylsiloxane). L'identification des composés qui constituent les deux HEs se fait grâce au calcul de leurs indices de rétentions (IR). Ces IRs sont calculés sur les deux types de colonnes apolaire et polaire en utilisant les temps de rétention (TR) des composés élués et des alcanes d'un mélange de n-alcanes analysés dans les mêmes conditions chromatographiques. Les IR obtenus sont ensuite comparés avec ceux présents dans des bases de données commerciales (Adams, 2007 ; Joulain et König ,1998 ; NIST, 2014). Le calcul de l'indice de rétention se fait selon l'équation suivante (Van Den Dool et Kratz, 1963) :

$$IR = 100x[(tr(i) - tr(n))/(tr(n+1) - tr(n))]$$

Avec :

**tr(i)**: temps de rétention absolu du composé inconnu

**tr(n)**: temps de rétention absolu de l'alcane à n atomes du carbone qui précède le soluté

**tr(n+1)**: temps de rétention absolu de l'alcane à n+1 atomes du carbone qui suit le soluté

**n** : différence du nombre d'atomes de carbone entre les deux alcanes (généralement n = 1)

### **I.5. Quantification des composés volatils**

Les proportions relatives des constituants des deux HEs ont été exprimées en pourcentages obtenus à partir des données de la surface des pics, sans utilisation de facteurs de correction.

## **Partie II. Evaluation de la toxicité *in vivo* et *in situ* des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus***

### **II.1. Evaluation de la toxicité aiguë orale des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus***

#### **II.1.1. Principe**

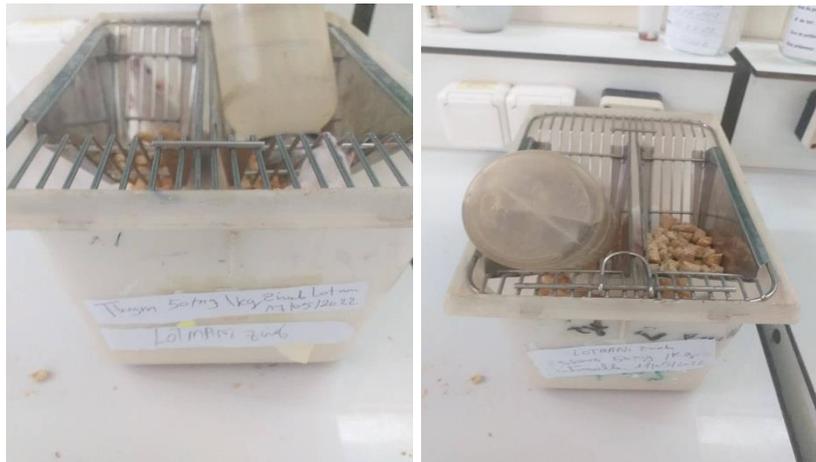
L'évaluation de la toxicité aiguë des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* selon la méthode de « toxicité aiguë par classe », un processus séquentiel utilisant trois souris d'un seul sexe par étape, avec l'utilisation de doses croissantes prédéterminées à chacune d'elles. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë des HEs. Cette procédure est facile à reproduire, utilise un nombre très restreint d'animaux comparativement aux autres méthodes d'évaluation de toxicité aiguë (**Lignes directrices OCDE 420 et 425**), mais elle ne permet pas le calcul précis de la dose létale médiane (DL50). La méthode permet de classer la toxicité des HEs dans la gamme de doses qui est considérée comme létale dû au fait que la mort des animaux est le principal fait observer.

#### **II.1.2. Protocole expérimental**

##### **II.1.2.1. Conditions d'expérience**

Des souris femelles NMRI, saines et non gestantes ont été utilisées, âgées de 8 à 12 semaines, pesant 25 g provenant de l'élevage de l'animalerie de l'institut PASTEUR (Kouba, Alger). Un éclairage artificiel est utilisé et la séquence doit être de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité, alors que de la nourriture classique de laboratoire est utilisée pour l'alimentation des animaux avec un accès *ad libitum* à l'eau potable.

Les animaux sont choisis au hasard, marqués et numérotés pour permettre une identification individuelle et gardés dans leurs cages pour les acclimater aux conditions de laboratoire quatre jours avant l'expérience (Figure 16).



**Figure 16 : Préparation des lots de souris**

### **II.1.2.2. Niveaux de doses administrées aux différents lots**

Les doses administrées des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* sont les suivantes : 50, 300 et 2 000 mg/kg de poids corporel (p.c) basées sur les recommandations de l'OCDE (**Ligne directrice 423**). Le niveau choisi est celui pour lequel une mortalité parmi les animaux traités peut s'observer. Chaque étape nécessite trois animaux auxquels la même dose est administrée et ceux qui survivent se voient administrer la dose supérieure. Un lot de 3 souris a servi de groupe témoin et ne s'est vu administrer aucune substance. Le schéma d'essai selon la ligne directrice 423 est présenté dans l'annexe I.

### **II.1.2.3. Voie d'administration**

Les HEs ont été administrées en une seule dose par gavage (Figure 17) à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 0,5 mL pour 20g de p.c. Les animaux ont été laissés à jeun pendant 3 à 4 h avant l'administration de la substance. Après la période de jeun, les animaux ont été pesés et puis la substance d'essai leur a été administrée.

L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose est dicté par le moment du début, la durée et la sévérité des effets toxiques observés.



### Figure 17 : Gavage des animaux

#### II.1.2.4. Observations macroscopiques

Les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 min ainsi que pendant 4 h. Des observations ont aussi été réalisées régulièrement pendant 24 h après le traitement, et quotidiennement pendant 7 jours après l'administration de la substance. Toutefois, la durée d'observation n'a pas été fixée d'une manière rigide. Elle a été fixée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération.

Toutes les observations ont été enregistrées de façon systématique (Tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma...etc.). Chaque animal a été pesé avant l'administration des HEs et régulièrement durant toute l'expérience. Les animaux d'essai survivants ont subi une euthanasie, une dissection et une autopsie à l'échelle macroscopique. Ensuite, quatre organes ont été prélevés qui sont : le foie, les reins et les poumons, qui ont été conservés dans du formol à 10 % afin de les préserver de toute altération tissulaire. Les altérations pathologiques au niveau microscopique ont été constatées grâce à la réalisation d'une étude histopathologique.

#### II.1.2.5. Étude histopathologique

Cette étude comprend plusieurs étapes successives énoncées ci-dessous :

##### II.1.2.5.1. Fixation

Les organes prélevés ont été découpés en fragments à l'aide d'une lame et placés dans des cassettes préalablement étiquetées. Elles ont ensuite été plongées dans du formol à 10 % pour au moins 24 h à température ambiante. Le but histologique de la fixation est d'immobiliser les cellules dans un état proche de l'état vivant (Figure 18).



Figure 18 : Découpage et fixation des organes

### II.1.2.5.2. Déshydratation et inclusion

Les cassettes ont été placées dans un automate afin de subir une déshydratation par submersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (60 %, 70 %, 90 %, 95 % et 100 %) de 1 h chacun. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion. Ensuite, les échantillons sont passés dans deux bains de xylène pendant 2 h afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Ensuite, l'inclusion a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine fondue à 56 °C pendant 12 h. Le xylène occupe la place de l'eau et par conséquent facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe.

### II.1.2.5.3. Enrobage et confection des coupes

A l'aide d'un appareil d'inclusion, les quatre organes (foie, rein et poumons) ont été placés dans des moules en inox et recouverts de paraffine fondue (Figure 19). Après cela, les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine et mis au congélateur. Ensuite, les blocs de paraffine ont été démoulés pour être placés dans un microtome afin de confectionner des coupes d'environ 5 µm d'épaisseur. Ces rubans ont été déposés sur des lames marquées, qui sont immergées un court instant dans un bain-marie de 60 °C. Après cela, les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pour une durée de 30 min.



**Figure 19 : Enrobage des fragments d'organes dans de la paraffine**

### **II.1.2.5.3. Déparaffinage et réhydratation**

Les coupes obtenues ont été d'abord déparaffinées et réhydratées par submersions successives dans deux bains de xylène de 5 min chacun. Les coupes ont été ensuite immergées dans trois bains d'alcool à différents degrés (2 min à 100 %, 2 min à 96 % et 2 min à 90 %) suivi d'un rinçage avec de l'eau de robinet pendant au moins 3 min. Cette étape permet d'éliminer toute trace de paraffine et de permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

### **II.1.2.5.4. Coloration des lames**

La coloration des lames s'est faite suivant le protocole de coloration à l'Eosine/Hématoxyline de Mayer (HE : l'hématoxyline basique colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (**Kierszenbaum, 2006**).

Les coupes réhydratées ont été placées dans un bain d'hématoxyline pendant 45 secondes et l'excès de colorant a été enlevé par rinçage à l'eau de robinet pendant 3 min. Les coupes ont ensuite été passées dans l'alcool absolu pendant 1 min et dans trois bains de xylène de 2 min chacun suivi d'un rinçage à l'eau. Elles ont été mises ensuite dans un bain d'éosine pendant 1 min et l'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau courante. Enfin, les lames ont été

déshydratées en les passant dans trois bains d'alcool (1 min à 90 % et 1 min à 96 % et 1 min à 100 %) et dans deux bains de xylène de 2 min chacun (Figure 20).



**Figure 20 : Coloration des coupes**

### **II.1.2.5.5. Montage des lames**

Les lames ont été recouverte par des lamelles couvre-objet à l'aide d'une colle EUKITT. Les lames ainsi préparées sont protégées, peuvent se conserver pendant une période illimitée et sont prêtes pour l'observation au microscope optique.

### **II.6. Evaluation *in situ* des propriétés cytotoxiques des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus***

L'activité cytotoxique des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a été évaluée grâce à la méthode MTT à l'encontre de deux lignées cellulaires (Mosmann, 1983).

#### **II.6.1. Lignées cellulaires utilisées**

Au cours de cette étude, deux lignées cellulaires ont été testées l'une tumorale issue de cellules d'adénocarcinome de sein humain (MDA-MB-231) et l'autre non tumorale issue de cellules épithéliales de sein humain (MCF10A-CRL-10317™). Les deux lignées cellulaires ont été mises en culture dans des conditions spécifiques qui sont regroupées dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : Lignées cellulaires testées et milieux utilisés pour leur croissance.**

Lignées cellulaires	Source	Milieu de culture
(MDA-MB-231) human adenocarcinoma breast cells	ATCC (American Type Culture Collection)	Les cellules sont cultivées dans du DMEM F-12 supplémenté avec 10 % de FBS, 1 % de glutamine et 1 % de pénicilline-streptomycine.
(MCF10A-CRL-10317™) normal breast epithelial cell	ATCC (American Type Culture Collection)	Les cellules sont maintenues dans le milieu DMEM F-12 supplémenté avec 100 ng/mL de la toxine de choléra, 20 ng/mL d'EGF, 0,01 mg/mL d'insuline, 500 ng/mL d'hydrocortisone, 5 % d'HS, 1 % de glutamine et 1 % de pénicilline-streptomycine.

DMEM F-12, Milieu de Eagle modifié par Dulbecco F12 (contient notamment 21 acides aminés, 10 vitamines, du glucose, du fer et du zinc ; FBS, sérum bovin fœtal ; EGF, facteur de croissance épidermique ; HS, sérum de cheval

Après la mise en culture des lignées cellulaires, le milieu de culture a été privé d'EGF et l'HS a été réduite à 2 %, les lignées cellulaires ont été maintenues à 37 °C dans des conditions humidifiées à 5 % de CO<sub>2</sub>. Toutes les expériences ont été réalisées avec les cellules dans leur phase de croissance logarithmique.

## II.6.2. Test MTT

### II.6.2.1. Principe

Le test MTT repose sur l'utilisation des sels de tétrazolium (MTT), qui sont employés pour évaluer la cytotoxicité des composés génotoxiques. Cette technique repose sur la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale présente au niveau des cellules vivantes et donc métaboliquement active (Figure 21). Cette enzyme va provoquer la rupture du cycle tétrazolium, et par conséquent transformer le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan de couleur bleu violet. La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan causant ainsi leur accumulation intracellulaire et l'addition d'un détergent va engendrer leur solubilisation. L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale est directement corrélée avec la viabilité cellulaire ainsi qu'avec la densité cellulaire.

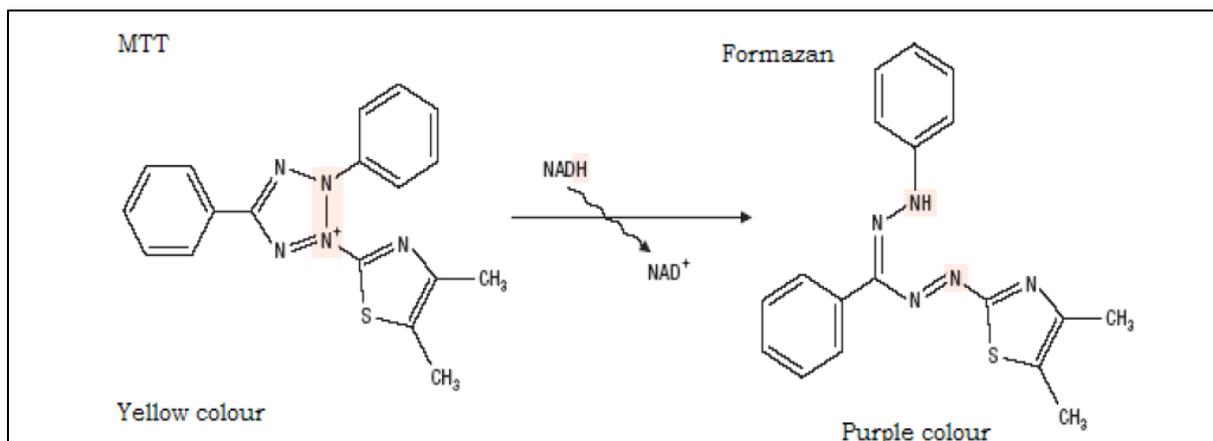


Figure 21 : Principe du test MTT (Prakash *et al.*, 2011)

### II.6.2.2. Protocole expérimental

La cytotoxicité des HEs étudiées a été évaluée en utilisant le test MTT comme décrit par Masci *et al.* (2023). Afin de réaliser ce test, les cellules ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits à  $1 \times 10^5$  cellule/mL pour les deux lignées cellulaires (MDA, MCF10). La microplaque a ensuite été incubée dans un incubateur humidifié avec 5 % CO<sub>2</sub> à 37 °C durant 24 h.

En parallèle, les deux HEs ont subi 10 dilutions aux 1/2 à des concentrations allant de 0,5 à 0,0156 mg/mL, préparées préalablement dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (50 % v/v). Ensuite, chaque extrait d'HE a été ajouté au milieu, sachant que le DMSO et l'eau ont servi de contrôles négatifs.

Après 24 h de traitement, le milieu contenant les extraits testés a été aspiré et un volume de 100 µL de la solution de MTT (0,5 mg/mL) a été ajouté dans chaque puit, puis le tout a été incubé pendant 3 h dans l'obscurité. Ensuite, la solution de MTT a été retirée et 100 µL de DMSO ont été ajoutés afin de solubiliser les cristaux de formazan.

L'absorbance a été lue à 595 nm au spectrophotomètre UV-visible et la concentration qui inhibe 50 % de la population cellulaire (CI50) pour les deux HEs a été déterminée pour les deux lignées cellulaires testées. La viabilité cellulaire exprimée en pourcentage a été calculée comme suit :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Moyenne de l'absorbance des cellules traitées}}{\text{Moyenne d'absorbance des cellules non traitées (Contrôle)}} \times 100$$

### Partie III : Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

#### III.1. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

##### III.1.1. Test DPPH

##### III.1.1.1. Principe

Le test repose sur l'utilisation de la molécule de DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl) qui est un radical libre stable, dont la solution est de couleur violette. Une solution de DPPH mélangée avec une substance, antioxydante, donneuse d'atomes d'hydrogène aboutit à la formation d'une molécule réduite (DPPH-H) (Figure 22). Cette transition entraîne la perte de la coloration violette de la solution de DPPH qui devient jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

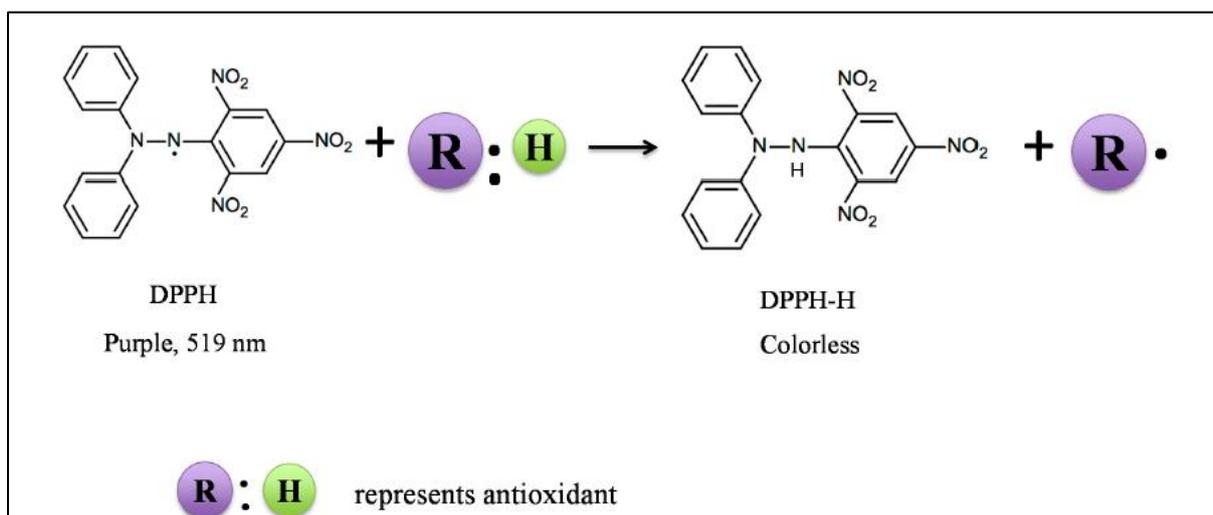


Figure 22 : Principe du test DPPH (Liang et Kitts, 2014)

##### III.1.1.2. Protocole expérimental

L'activité antioxydante des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a été mesurée en utilisant le test DPPH (2,2 diphényl 1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams, 1995). Le DPPH a été préparé en le dissolvant dans de l'éthanol et l'absorbance a été ajustée à 0,5 au spectrophotomètre UV-visible afin d'obtenir une solution homogène de DPPH.

Des extraits éthanoliques d'HE ont été préparés dont la concentration varie de 0,5 à 10mg/mL. Ensuite, un volume de 1,8 mL de chaque extrait préparé est ajouté à 0,2 mL de la solution de DPPH et le tout a été homogénéisé au vortex. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 30 min dans l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance de chaque mélange a été mesurée à 517 nm contre un blanc contenant de l'éthanol qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). L'activité antioxydante est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition\%} = (\text{Abs } 0 - \text{Abs } 1 / \text{Abs } 0) \times 100$$

Avec

**Abs 0** : l'absorbance du témoin

**Abs 1** : l'absorbance du composé testé à différentes concentrations.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de L'HE permet de déterminer la CI50 correspondant à 50 % d'inhibition des radicaux libres et qui constitue l'activité antioxydante de l'HE. Cette valeur est comparée à celle trouvée pour les contrôles positifs. La vitamine C a été utilisée comme substance de référence. Toutes les expériences ont été reproduites trois fois.

### III.1.2. Test ABTS

#### III.1.2.1. Principe

Le test ABTS est basé sur la capacité d'une substance antioxydante à transformer le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> (L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) de coloration verte bleue en sa forme réduite non radicalaire ABTS qui est incolore (Figure 23). La forme réduite est caractérisée par une bande d'absorption à 734 nm. Le radical préformé ABTS<sup>•+</sup> est généré exclusivement en présence des ions persulfates (S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>).

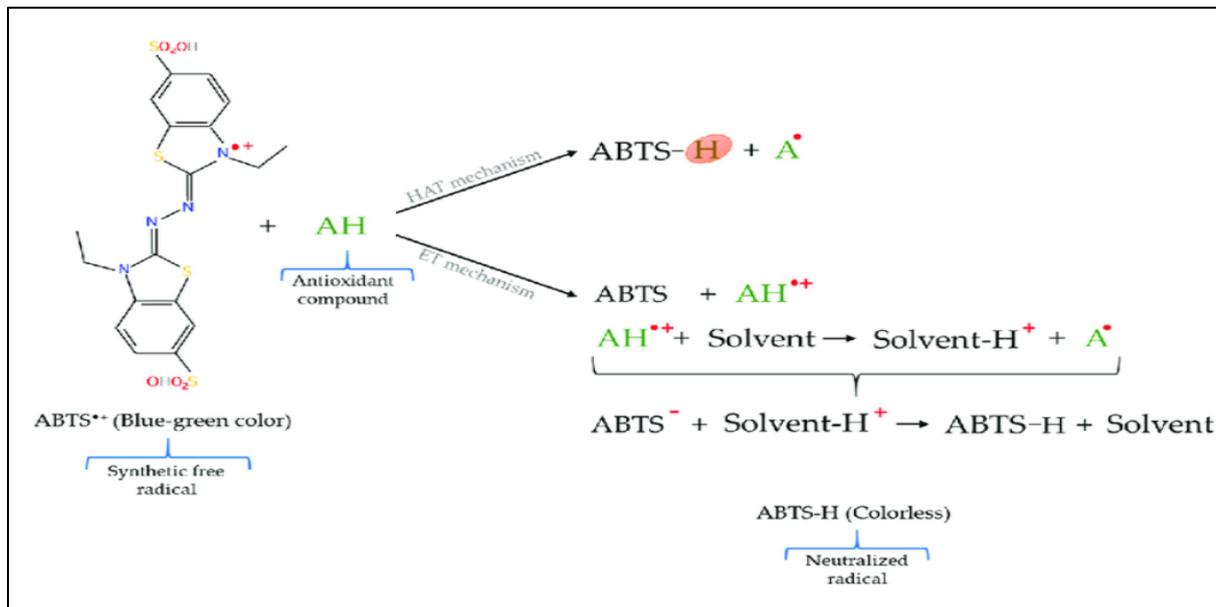


Figure 23 : Principe du test ABTS (Echegaray *et al.*, 2021)

### III.1.2.2. Protocole expérimental

Le test ABTS a été utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des deux HEs en utilisant les cations ABTS<sup>•+</sup> (Chen *et al.*, 1997). Le radical ABTS<sup>•+</sup> a été obtenue par le mélange d'une solution d'ABTS (7mmol/L) avec du persulfate de potassium (2,45mM) qui ont ensuite été dissous dans l'eau distillée. Le mélange réactionnel a été mis au réfrigérateur à l'abri de la lumière pour au moins 16 h. Avant son utilisation, le réactif a été dilué dans de l'éthanol et l'absorbance a été ajustée à 0,7 (±0,02) mesurée à 734 nm. Par la suite, un volume de 1,8 mL des extraits éthanoliques des deux HEs (0,5mg-10mg/mL) a été mélangé avec 0,2 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup>. Le mélange a été incubé dans l'obscurité pour 10 min et la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel s'est faite à 750 nm contre un blanc (éthanol). Les résultats sont exprimés en CI50 (concentration capable de réduire de 50 % l'activité radicalaire). La vitamine C a servi de substance de référence.

### III.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

Les activités antibactérienne et antifongique des deux HEs étudiées ont été testées sur un large panel de souches microbiennes en utilisant deux tests différents (diffusion sur disque et vapeur) et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont aussi été évaluées.

#### III.2.1. Microorganismes testés

##### III.2.1.1. Souches bactériennes testées

L'activité antibactérienne des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a été testée sur des souches de références et d'origine alimentaire. La liste des souches testées est énoncée dans le Tableau 9.

**Tableau 9 : Les souches bactériennes de références utilisées**

Souches à Gram-positif	Souches à Gram- négatif
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
<i>Listeria innocua</i> CLIP 74915	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline (SARM) ATCC 43300	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC853

Les deux souches d'origine alimentaires utilisées sont : la *Staphylococcus aureus* et la *Pseudomonas aeruginosa*. Elles ont été fournies par le service de microbiologie alimentaire de l'institut Pasteur d'Alger (Deli Ibrahim).

### III.2.1.2. Souches fongiques testées :

Les souches fongiques utilisées sont des souches cliniques identifiées macroscopiquement, microscopiquement et biochimiquement. Elles ont été fournies par le laboratoire de Mycologie de l'institut Pasteur Algérie (Deli Ibrahim) et sont regroupées dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Les souches fongiques utilisées**

Souches de levures	Souches de moisissures
<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Fusarium sp</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

### III.2.3. Antibiogramme des souches bactériennes testées

Les disques d'antibiotiques utilisés pour tester la sensibilité des souches bactériennes utilisées sont les suivants : Chloramphénicol (30mg), Amoxicilline (25mg), Ciprofloxacine (5mg), Rifamycine (5mg), Fosfomycine (20mg), Erythromycine (15mg), Tétracycline (30mg), Azithromycine (15mg)

### III.2.4. Les milieux de cultures utilisés

La gélose nutritive (GN) a été utilisée pour conserver et repiquer les souches bactériennes et le milieu Muller Hinton (MH) a été utilisé pour tester les propriétés antibactériennes des HEs. Le milieu Sabouraud supplémenté de chloramphénicol (SAB) a été utilisé pour faire pousser les souches fongiques.

### III.2.4. Test de diffusion sur disque

#### III.2.5.1. Principe

Le test de diffusion sur disque (Figure 24 a) est principalement employé pour des études préalables à des études plus poussées, du fait qu'il fournit des résultats surtout qualitatifs. Elle a pour principe d'utiliser des disques de papiers filtres imprégnés des substances testées. Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la souche microbienne à tester. Chaque substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y délimite une zone d'inhibition en fonction de la concentration et de l'efficacité de la substance. Les souches microbiennes poussent sur toute la surface du milieu

de culture hormis là où une concentration suffisante de la substance y est rencontrée, il en découle une zone circulaire dépourvue de colonies, nommée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est important, plus le microorganisme est sensible à la substance. Plus il est petit, plus la souche microbienne est résistante (Bauer et Kirby, 1967).

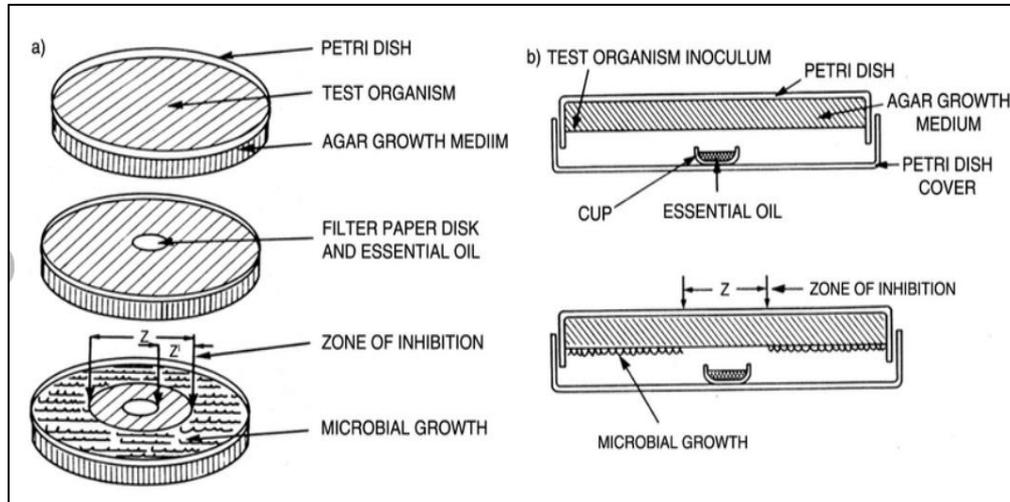


Figure 24 : Principe du test de diffusion sur disque (a) et vapeur (b) (Zaika, 1988)

### III.2.5.2. Protocole expérimental

#### III.2.5.2.1. Préparation des boîtes de Pétri

Un volume de 15 mL du milieu de culture approprié (Muller Hinton et Sabouraud supplémenté de chloramphénicol pour les bactéries et les champignons, respectivement) a été coulé dans les boîtes de Pétri qui ont été ensuite mise à refroidir jusqu'à solidification.

#### III.2.5.2.2. Préparation des suspensions microbiennes

##### *Suspension bactérienne*

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive incubées à 37°C pendant 24 h, afin d'obtenir des colonies bactériennes jeunes et bien isolées. Par la suite, quelques colonies bactériennes ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, puis introduites dans un tube contenant de l'eau physiologique, agitée au vortex et ajustée à l'aide du spectrophotomètre UV-Visible à une DO entre 0,08 à 0,13 à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ  $1 \text{ à } 2 * 10^8 \text{ UFC/mL}$  (0,5 Mc Farland) (Bonnet *et al.*, 2013).

##### *Suspension fongique*

Une colonie jeune de levures de 48 h est transférée dans un tube contenant 5 mL d'eau physiologique stérile et le tout a été homogénéisé pour obtenir une suspension fongique correspondant approximativement à  $10^4 \text{ UFC/mL}$ . En ce qui concerne les moisissures, la suspension a été préparée en prélevant à ce qui correspond à 1 gramme d'une culture jeune à

l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensuite introduite dans 5mL d'eau physiologique et le tout a été homogénéisé au vortex.

### III.2.5.2.3. Ensemencement

Un écouvillon stérile a été introduit dans le tube contenant la suspension microbienne, puis un ensemencement en stries très serrées a été effectué sur toute la surface des boîtes de Petri. Alors que pour les moisissures, un volume de 30  $\mu$ L a été prélevé à l'aide d'une micropipette et dispersé sur toute la surface des boîtes de Petri selon la méthode du râteau.

### III.2.5.2.4. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen, les disques papiers filtres de 9 mm ont été placés au centre des boîtes gélosées préalablement ensemencées. Ensuite, trois différents volumes d'HEs (10, 20, et 30  $\mu$ L) ont été déposés sur les disques afin d'être testés. Les boîtes ont été maintenues à température ambiante pendant 30 min afin de permettre la pré-diffusion des HEs. Enfin, elles ont été incubées à 30 °C, 25°C et 37 °C pendant 24 h, 48 h et 92 h pour les bactéries, les levures et les moisissures, respectivement.

### III.2.5.2.5. Contrôles positifs

La solution de chloramphénicol (1 %) a servi de contrôle positif pour tester l'activité antibactérienne des deux HEs étudiées. Alors que la solution commerciale d'isoméline (Laboratoire Sidal) dont le principe actif est l'hexamidine (0,1 %) a servi de contrôle positif pour évaluer l'effet des HEs envers les souches de levures. Enfin, la solution de nystatine à 1 % a été utilisée comme contrôle positif pour tester l'effet des HEs vis-à-vis des souches de moisissures.

### III.2.5.2.6. Lecture des boîtes

Après l'incubation des boîtes de pétri, le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) a été mesuré (en mm) et la sensibilité des différentes souches vis-à-vis de l'HE étudiée est classée selon le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) selon les classes suivantes :

- Non sensible - pour  $\varnothing < 17$  mm ;
- Sensible - pour 18-23 mm
- Très sensible - pour  $\varnothing$  24-28 mm
- Extrêmement sensible -pour  $\varnothing > 29$  mm (**Ponce *et al.*, 2003**)

Pour les espèces de moisissures le diamètre moyen de la croissance du mycélium est exprimé en termes de pourcentage d'inhibition de la croissance du mycélium (MCI ; %), comme indiqué dans l'équation suivante : (**Shao *et al.*, 2015**).

$$\text{MCI} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100\%$$

Avec :

**dc** : représente le diamètre de la croissance du mycélium du contrôle

**dt** : représente le diamètre de la croissance du mycélium traité par l'HE

### III.2.6. Test de diffusion vapeur

#### III.2.6.1. Principe

Le test de diffusion vapeur a pour objectif d'explorer le potentiel antimicrobien de la phase vapeur des deux HEs (Figure 24 b). Le principe de la technique repose sur le fait que lorsque la vapeur des substances volatiles de l'HE entre en contact avec les microorganismes ensemencés préalablement sur le milieu gélosé, elle va inhiber leur croissance et va générer une zone d'inhibition. (Maruzzella et Liguori, 1958)

#### III.2.6.2. Protocole expérimental

##### III.2.5.2.1. Préparation des boîtes de Pétri

Le même Protocole que pour le test de diffusion sur disque

##### III.2.5.2.2. Préparation de la suspension microbienne

Le même Protocole que pour le test de diffusion sur disque

##### III.2.5.2.3. Ensemencement

Le même protocole que pour le test de diffusion sur disque

##### III.2.5.2.4. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen, les disques papiers filtres ont été déposés à l'intérieur du couvercle supérieur des boîtes de Petri afin d'éviter le contact direct de l'HE avec les microorganismes. Puis, trois différents volumes d'HEs (10, 20, et 30 µL) ont été déposés sur les disques à l'aide d'une micropipette. Les boîtes ont été retournées immédiatement et maintenues à température ambiante pendant 30 min afin de permettre la pré-diffusion. Enfin, elles ont été incubées à 37 °C, 25 °C, 30 °C pendant 24 h, 48 h et 92 h pour les souches bactériennes, de levures et de moisissures, respectivement.

### III.2.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont été évaluées par la méthode de macrodilution sur gélose (Wiegand *et al.*, 2008). Un volume de 250 µL d'HE a été mélangé avec le DMSO, les milieux de cultures appropriés (50 mL), pour obtenir une concentration finale de 0,5 % (v/v). Ensuite, ce mélange a subi successivement des dilutions aux 1/2 jusqu'à atteindre une concentration finale de 0,015 % (v/v). Un volume de 25mL de chaque concentration a été coulé dans une boîte pétrie, puis inoculée avec des suspensions

microbiennes fraîches et incubées pendant 24 h ou 72 h, pour les bactéries et les levures, respectivement.

La méthode appelée "poisoned food technique" a été employée pour déterminer les CMI des deux HEs envers les souches de moisissures. Elle consiste à découper un disque de mycélium d'environ 6 mm de diamètre provenant d'une culture fongique fraîche de cinq jours. Le disque a ensuite été placé au centre des boîtes de Pétri (Grover et Moore, 1962), qui ont été incubées pendant 5 jours à 37 °C. La CMI correspond à la concentration d'HE à laquelle il n'y a aucune croissance microbienne perceptible.

### **Partie IV : Evaluation de l'effet conservateur des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *C.nardus* envers la souche fongique d'origine *Saccharomyces cerevisiae* dans un système alimentaire (boisson Orangina®)**

#### **IV.1. Principe**

Après avoir testé le pouvoir antimicrobien *in vitro* des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* contre un large spectre de souches bactériennes et fongiques. La potentielle utilisation des deux HEs comme conservateur alimentaire antimicrobien a été investiguée. L'expérience a été réalisée selon la méthode proposée par Tyagi *et al.* (2014) avec quelques modifications et la boisson commerciale gazeuse à base d'agrumes Orangina® (unité Djuaguen, Blida) est le système alimentaire choisi. Cette boisson acide devrait constituer un milieu défavorable à la croissance microbienne due à son pH (3,2) et à sa composition. Toutefois, certaines levures et moisissures sont résistantes et poussent dans un milieu acide et carbonaté en engendrant des contaminations et altérations des caractéristiques organoleptiques (odeur et goût) des boissons.

La boisson fruitée Orangina® est conservée par l'association de deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) dont les effets néfastes sont de notoriété publique. De ce fait, leur chercher des substituants plus naturels comme les HEs est un enjeu de santé publique. Ce qui nous a emmené dans cette expérience à étudier l'effet conservateur antifongique des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* dans une boisson Orangina® inoculée avec la souche fongique *S. cerevisiae*, qui contamine usuellement les jus et les boissons. Dans cette étude, les HEs ont été testées seules ou en association avec un traitement thermique modéré afin d'éventuellement réduire leur quantité dans la préservation des produits alimentaires et d'améliorer en conséquence leurs propriétés organoleptiques.

#### **IV.2. Microorganisme testé**

Le microorganisme utilisé pour cette étude est la souche *S. cerevisiae* isolée à partir de selles humaines. La souche a été identifiée macroscopiquement, microscopiquement et biochimiquement par le laboratoire de Mycologie de l'institut PASTEUR-Algérie (Deli Ibrahim).

### IV.3. Identification moléculaire de la souche

#### IV.3.1. Extraction d'ADN et amplification PCR des ITS et EF

L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le kit commercial NucleoSpin Plant II. L'amplification par PCR a été réalisée en employant deux amorces ITS (Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer) (Tableau 11) et le facteur d'élongation EF (Elongation factor 1-alpha) (**Gardes et Bruns, 1993**). Les conditions de températures de la PCR sont regroupées dans le Tableau 12.

**Tableau 11 : Les amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire**

Nom	Séquence 5'-3'	Th	Taille fragment
ITS1	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	55	600bp
ITS4	TCC TCC GCT TATT GAT ATGC	55	

Th :température d'hybridation

**Tableau 12 : Conditions de Température PCR**

<b>Dénaturation initiale (35 cycles)</b>	95 °C pendant 5 min
<b>Dénaturation</b>	95 °C pendant 30 min
<b>Hybridation</b>	55 °C pendant 30 min
<b>Élongation</b>	72 °C pendant 45 min
<b>Élongation finale</b>	72 °C pendant 7 min
<b>Stockage avant révélation</b>	10 °C jusqu'à utilisation

#### IV.3.2. Révélation et purification des produits PCR.

Les produits d'amplification ont été révélés après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % d'un dépôt de 10 µL de produits de PCR. La migration est suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). Cela étant, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV en utilisant le Gel doc système de biorad. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit NucleoSpin® Gel et le PCR Clean-up de Macherey- Nagel.

#### IV.3.3. Séquençage des produits PCR

Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger (**Sanger et al., 1977**). Les séquences obtenues ont été analysées et nettoyées grâce au logiciel CHROMAS PRO. Les séquences finales ont ensuite été comparées avec celles de la banque de données GenBank en utilisant le programme de comparaison de séquence BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hébergé par NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cet outil permet l'identification des isolats étudiés en se basant sur le pourcentage d'homologie de séquences avec les souches de références.

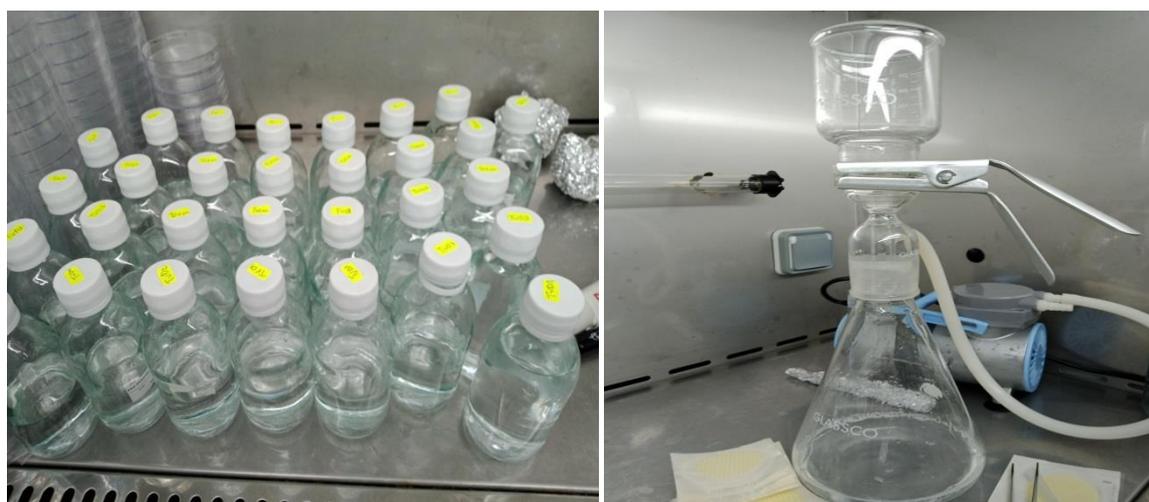
#### IV.4. Préparation de la suspension fongique de la souche *Saccharomyces cerevisiae*

Une colonie bien jeune de la souche *S. cerevisiae* a été introduite dans un tube contenant 5mL d'eau physiologique et mélangée au vortex afin d'obtenir une solution homogène d'approximativement  $10^4$ UFC/mL.

#### IV.5. Préparation des boissons inoculées par la souche fongique (*Saccharomyces cerevisiae*)

La boisson Orangina® utilisée dans la présente étude provient de la compagnie locale productrice (Djgaguen, Blida, Algeria) de cette boisson. Dans cette expérience, deux types différents de boissons Orangina ont été utilisé : celles présentées dans des bouteilles en verre, qui sont pasteurisées et dépourvues de conservateurs chimiques. Alors que les boissons Orangina® présentées dans des bouteilles en plastique contiennent deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium). La composition chimique de la boisson commerciale Orangina® est présentée dans l'annexe II.

Les boissons ont été réparties dans des flacons de 100 mL, puis étiquetées et dégazées en les secouant. La boisson Orangina® dépourvue de conservateurs chimiques, inoculée avec 30  $\mu$ L de la suspension fongique de *S. cerevisiae* a servi de contrôle négatif. Alors que celle contenant les deux conservateurs chimiques et inoculée avec 30  $\mu$ L de la suspension de *S. cerevisiae* a servi de contrôle positif. Photos de l'expérience regroupées dans les Figures 25 et 26.



**Figure 25 : Photos illustrant la préparation des flacons et le dispositif de Filtration sur membrane.**

#### IV.6. Effet des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* uniquement

Un volume de 100 mL de la boisson testée dépourvue de conservateurs chimiques a été mélangée avec 30  $\mu$ L de la suspension de la souche *S. cerevisiae* et du Tween 80 (0,5 %). Les HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont été testées aux quatre concentrations suivantes, 0,6 ; 1,25 ; 4 et 4 $\mu$ L/mL qui ont été ajoutées au mélange précédent.

Le mélange obtenu a été homogénéisé au vortex et 1 mL de chaque échantillon a été prélevé, dilué au 1/100 dans de l'eau physiologique (0,9 % NaCl), mélangé au vortex et filtré sur membrane. Les membranes filtrantes ont été récupérées et déposées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu SDA et incubées à 25 °C pendant 48 ou 72 h. Cette opération correspond alors au début de l'expérience (jour 0). Le même procédé a été reproduit au 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, et 8<sup>ème</sup> jour pour les différents échantillons. Les flacons sont conservés au réfrigérateur à 4 °C et tirés au 0, 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour afin d'établir une cinétique de croissance de la souche fongique *S. cerevisiae*.



Figure 26 : Incubation des boîtes de pétri contenant les membranes filtrantes

#### IV.7. Effet des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* associées à un chauffage modéré

Un volume de 100 mL de la boisson Orangina® dépourvus de conservateurs chimiques est mélangé avec 30  $\mu$ L de la suspension du *S. cerevisiae* et du Tween 80 (0,5 %). Les HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont été testées aux quatre concentrations suivantes : 0,6 ; 1,25 ; 4 et 6  $\mu$ L/mL, qui ont été incorporées au mélange précédent. Ce dernier est homogénéisé au vortex

et chauffé à 70 °C pendant 2 min. Un volume de 1 mL de chaque échantillon est prélevé, dilué au 1/100 dans de l'eau physiologique (0,9 % NaCl), mélangé au vortex et filtré sur membrane. Les membranes filtrantes ont été récupérées et étalées sur des boîtes contenant le milieu SDA, et incubées pendant 48 h ou 72 h à 25 °C. Cette opération correspond alors au jour 0 (début de l'expérience). Le même procédé a été reproduit au 2<sup>ème</sup>, jour 5<sup>ème</sup>, et 8<sup>ème</sup> jour pour les différents échantillons qui sont dans l'intervalle conservés au frais à 4 °C.

### IV.8. Expression des résultats

Après incubation, les unités formant colonie (UFC) de la souche *S. cerevisiae* qui ont poussé sur les membranes filtrantes ont été dénombrées. Une cinétique de croissance est établie à partir des résultats obtenus pour les huit jours d'expérience. Les résultats sont représentés graphiquement en Log UFC/mL en fonction du temps (jours).

### IV.9. Etude statistique

Tous les tests biologiques ont été reproduits trois fois et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel statistique GraphPad Prism 8.00 (Californie, États-Unis). Les comparaisons entre groupes de l'activité antimicrobienne et du test de l'effet conservateur des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont été effectuées grâce au test non paramétrique Kruskal wallis (Test H) suivi par le test de comparaison multiple de Dunnett. De plus, les comparaisons entre deux groupes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Le niveau de significativité statistique a été fixe à  $\alpha=0,05$  et une valeur de  $p < 0,05$  est considéré comme significative. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart type.

## Partie V. Evaluation *in silico* des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* et investigation par docking moléculaire des mécanismes impliqués dans leur action antifongique

### V.1. Evaluation *in silico* des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés des deux huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

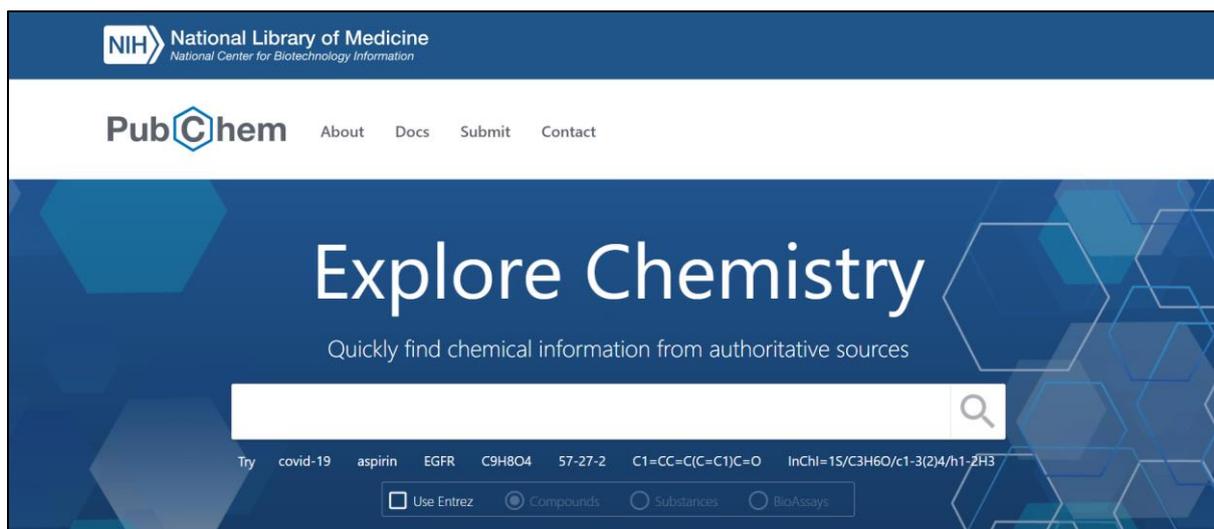
#### V.1.1. Principe de l'étude

Cette étude a pour objectif d'investiguer *in silico* les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des molécules composant les deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus*. Cette évaluation est faite en utilisant le site Web SwissADME et la base de données PubChem qui fournit les structures canoniques simplifiées (SMILES) des molécules a testées.

#### V.1.2. Base de données PubChem

PubChem est une base de données ouverte de chimie conçue en 2004 par l'institut National de la santé (NIH) (Figure 27). Cette base de données contient principalement de petites molécules, mais aussi des molécules plus volumineuses telles que des nucléotides, des glucides,

des lipides, des peptides et des macromolécules chimiquement modifiées. PubChem englobe des informations sur les structures chimiques, les identifiants, les propriétés chimiques et physiques, les activités biologiques, les brevets, la santé, la sécurité, les données sur la toxicité et bien d'autres données. De ce fait, cette base de données est devenue une ressource clé d'informations sur les produits chimiques pour les scientifiques, les étudiants et le grand public (Kim *et al.*, 2015).



**Figure 27 : Interface de PubChem**

### V.1.3. Programme SwissADME

SwissADME est une plateforme d'accès libre qui permet l'estimation des propriétés ADME (Absorption, distribution, métabolisme et excrétion) des molécules. A la différence des autres plateformes de prédictions, SwissADME est caractérisé par certains avantages : l'apparition rapide du nom de la molécule saisie ou son identité avec le résultat d'évaluation, le calcul et l'évaluation pour plusieurs molécules simultanément, la possibilité d'enregistrer et de partager les résultats par molécules individuelles ou sous forme de graphes. De plus, SwissADME est intégré directement dans la plateforme SwissDrugDesign (Daina *et al.*, 2022).

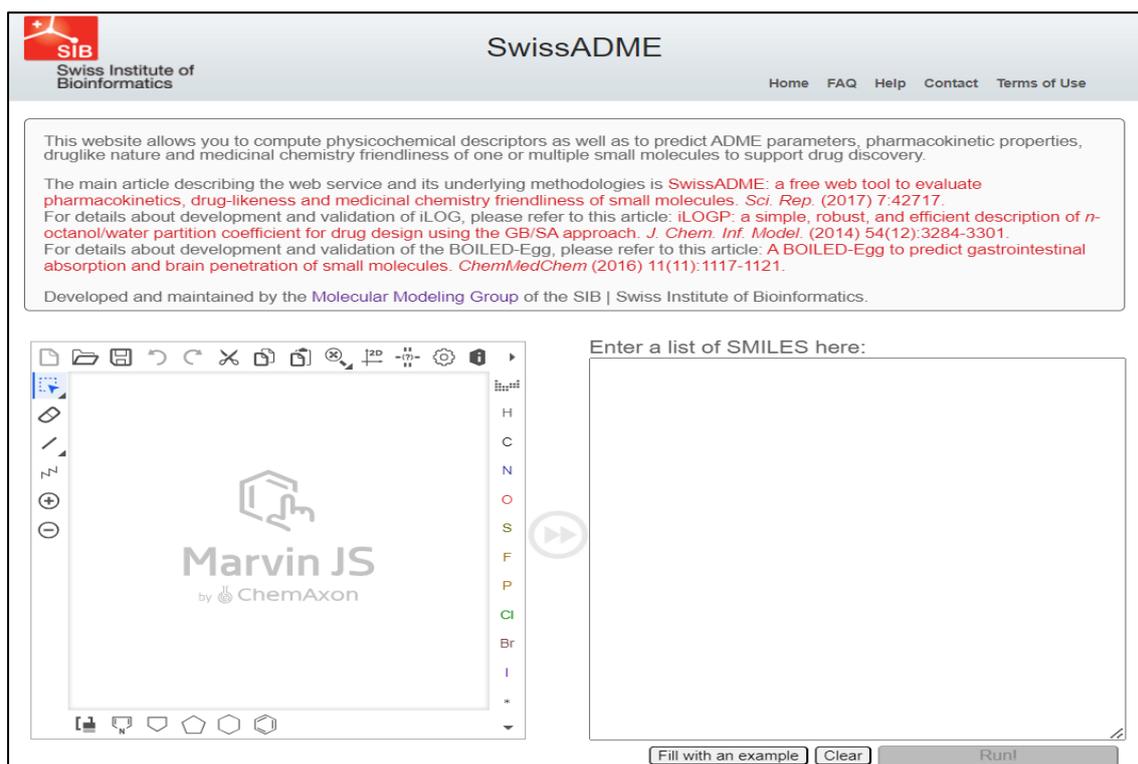
La plateforme est élaborée de façon ludique où les structures canoniques SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) des molécules exportées à partir de PubChem sont introduites directement dans le serveur de prédiction puis il suffit de cliquer sur RUN et l'évaluation est lancée (Figure 28). Afin d'effectuer cette expérience, les structures SMILES des composés de l'HE du *T. vulgaris* (Tableau 13) et du *C. nardus* (Tableau 14) ont été collectées et introduites dans le moteur de recherche de SwissADME (Figure 29 et 30).

Tableau 13 : Les structures SMILES des molécules composant l'HE du *T. vulgaris*

Molécules	Structures canoniques (SMILES)	Identifiant PubChem
Carvacrol	<chem>CC1=C(C=C(C=C1)C(C)C)O</chem>	10364
p-Cymène	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)C</chem>	7463
$\gamma$ -Terpinène	<chem>CC1=CCC(=CC1)C(C)C</chem>	7461
$\beta$ -Caryophyllène	<chem>CC1=CCCC(=C)C2CC(C2CC1)(C)C</chem>	5281515
Linalool	<chem>CC(=CCCC(C)(C=C)O)C</chem>	6549
Myrcène	<chem>CC(=CCCC(=C)C=C)C</chem>	31253
$\alpha$ -Terpinène	<chem>CC1=CC=C(CC1)C(C)C</chem>	7462
Bornéol	<chem>CC1(C2CCC1(C(C2)O)C)C</chem>	64685
Terpinène -4-ol	<chem>CC1=CCC(CC1)(C(C)C)O</chem>	11230
$\alpha$ -Pinène	<chem>CC1=CCC2CC1C2(C)C</chem>	440968
Sabinène	<chem>CC(C)C12CCC(=C)C1C2</chem>	18818
$\alpha$ -Thuyène	<chem>CC1=CCC2(C1C2)C(C)C</chem>	17868
Trans-Sabinène hydrate	<chem>CC(C)C12CCC(C1C2)(C)O</chem>	12315151
1,8 Cinéol	<chem>CC1(C2CCC(O1)(CC2)C)C</chem>	2758
Carvacryl acétate	<chem>CC1=C(C=C(C=C1)C(C)C)OC(=O)C</chem>	80792
Thymyl acétate	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)OC(=O)C</chem>	68252
Oxyde de caryophyllène	<chem>CC1(CC2C1CCC3(C(O3)CCC2=C)C)C</chem>	1742210
Limonène	<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)C</chem>	22311
$\beta$ -Bisabolène	<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)CCC=C(C)C</chem>	10104370
$\alpha$ -Phellandrène	<chem>CC1=CCC(C=C1)C(C)C</chem>	442482
Camphène	<chem>CC1(C2CCC(C2)C1=C)C</chem>	6616
Thymol	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>	6989
Octan-3-ol	<chem>CCCCC(C)CO</chem>	11527
$\alpha$ -Humulène	<chem>CC1=CCC(C=CCC(=CCC1)C)(C)C</chem>	5281520
$\alpha$ -Terpinéol	<chem>CC1=CCC(CC1)C(C)(C)O</chem>	17100

Tableau 14 : Les structures SMILES des molécules composant l'HE du *C. nardus*

Molécules	Structures canoniques (SMILES)	Identifiant PubChem
Citronellal	<chem>CC(CCC=C(C)C)CC=O</chem>	7794
Géraniol	<chem>CC(=CCCC(=CCO)C)C</chem>	637566
Citronellol	<chem>CC(CCC=C(C)C)CCO</chem>	8842
β-Elémol	<chem>CC(=C)C1CC(CCC1(C)C=C)C(C)(C)O</chem>	6429032
Géranyl acétate	<chem>CC(=CCCC(=CCOC(=O)C)C)C</chem>	1549026
Limonène	<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)C</chem>	22311
Citronellyl acétate	<chem>CC(CCC=C(C)C)CCOC(=O)C</chem>	9017
β-Elémène	<chem>CC(=C)C1CCC(C(C1)C(=C)C)(C)C=C</chem>	6918391
δ-Cadinène	<chem>CC1=CC2C(CCC(=C2CC1)C)C(C)C</chem>	441005
Germacrène D	<chem>CC1=CCCC(=C)C=CC(CC1)C(C)C</chem>	5317570
Linalool	<chem>CC(=CCCC(C)(C=O)O)C</chem>	6549
Isopulégol	<chem>CC1CCC(C(C1)O)C(=C)C</chem>	170833
γ-Cadinène	<chem>CC1=CC2C(CC1)C(=C)CCC2C(C)C</chem>	92313
Géranial	<chem>CC(=CCCC(=CC=O)C)C</chem>	638011
α-Muuroène	<chem>CC1=CC2C(CC1)C(=CCC2C(C)C)C</chem>	12306047
α-Cadinol	<chem>CC1=CC2C(CCC(C2CC1)(C)O)C(C)C</chem>	10398656
Néral	<chem>CC(=CCC/C(=C\C=O)/C)C</chem>	643779
β-Caryophyllène	<chem>CC1=CCCC(=C)C2CC(C2CC1)(C)C</chem>	5281515
α-Humulène	<chem>CC1=CCC(C=CCC(=CCC1)C)(C)C</chem>	5281520
Myrcène	<chem>CC(=CCCC(=C)C=C)C</chem>	31253
β-Bourbonène	<chem>CC(C)C1CCC2(C1C3C2CCC3=C)C</chem>	62566
1,4 Cadinadiène	<chem>CC1CCC(C2C1=CCC(=C2)C)C(C)C</chem>	6427091

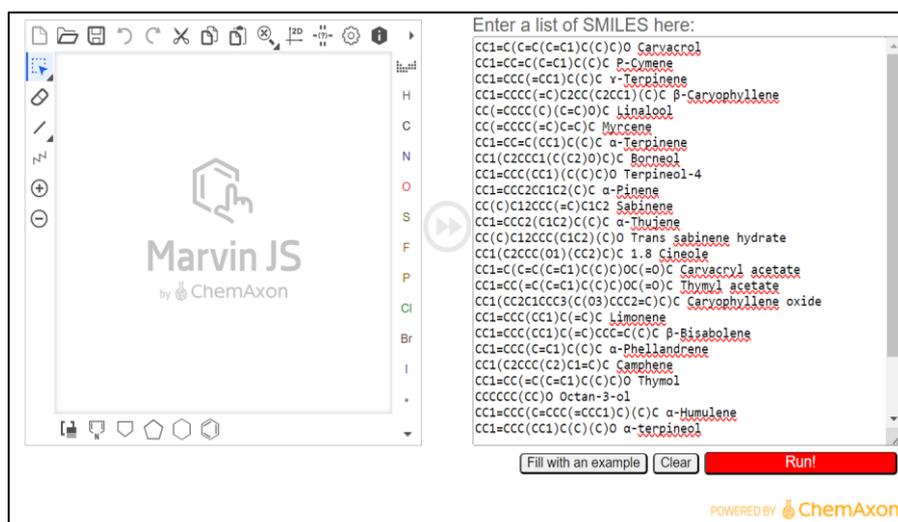


**Figure 28 : Interface du site Web SwissADME.SMILES**

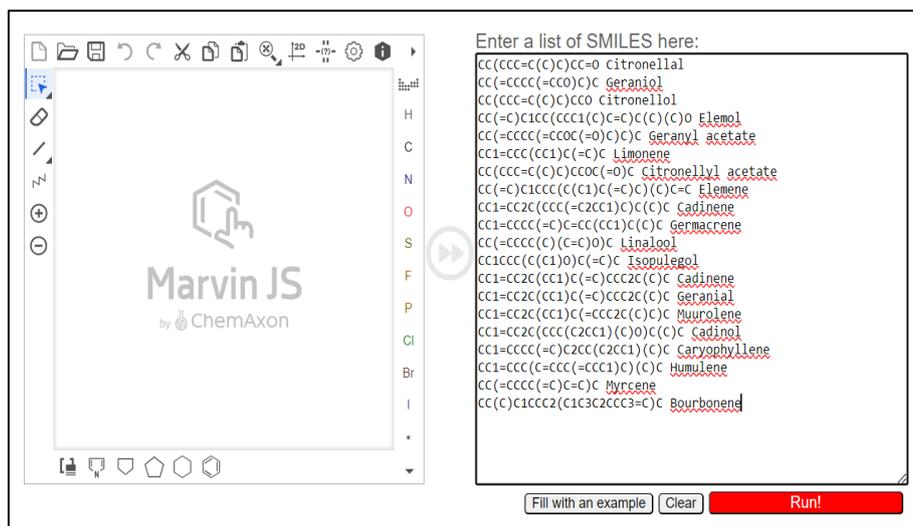
#### V.1.4. Méthode d'évaluation *in silico* des propriétés ADME

Une molécule puissante et efficace doit atteindre sa cible dans le corps en concentration suffisante et y rester sous une forme bioactive assez longtemps pour que les événements biologiques attendus se produisent. Le développement de médicaments implique l'évaluation de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (ADME) de plus en plus tôt dans le processus de découverte, à un stade où les composés considérés sont nombreux, mais où l'accès aux échantillons physiques est limité.

Le site Web SwissADME se base sur trois critères pour évaluer les propriétés physicochimiques des molécules : la règle de Lipinski, la règle de Veber et la solubilité dans l'eau. Alors que l'évaluation des propriétés pharmacocinétiques des molécules se base sur leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), à inhiber les cytochromes P450, et à constituer un substrat pour la glycoprotéine P (PgP).



**Figure 29 : Introduction des structures canoniques (SMILES) de toutes les molécules constituant de l'HE du *T. vulgaris* dans la fenêtre de prédiction du site WEB SwissADME. SMILES : Simplified Molecular Input Line Entry System**



**Figure 30 : Introduction des structures canoniques (SMILES) de toutes les molécules constituant de l'HE du *C. nardus* dans fenêtre de prédiction du site WEB SwissADME. SMILES : Simplified Molecular Input Line Entry System**

#### V.1.4.1. Règle de Lipinski

La règle de Lipinski dite « règle des 5 » prédit qu'une molécule absorbée oralement ne peut être active que si elle obéit au moins à trois des quatre critères que Lipinski a établis. Ces critères concernent les propriétés physico-chimiques suivantes : le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da), le logarithme décimal du coefficient de partage.

eau/1-octanol, noté log P, doit être inférieur à 5, le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5 et le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10 (Lipinski *et al.*, 1997). Cette règle dite des cinq délimite la relation entre les paramètres

pharmacocinétiques et physico-chimiques. Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins deux des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité (**Daina et al., 2017**).

### V.1.4.2. Règle de Veber

Veber a introduit deux critères supplémentaires à ce qui est aujourd'hui communément appelé "la règle des 5". D'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments chez GlaxoSmithKline (GSK), la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 Å<sup>2</sup> et le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale (**Veber et al., 2002**).

La surface polaire est représentée par la somme des surfaces des atomes polaires de la molécule (calcul basé sur la topologie de la molécule ou TPSA) et qui permet de prédire l'absorption intestinale et le passage de la barrière hémato-encéphalique. En effet, l'absorption intestinale devient difficile pour un composé de surface polaire supérieure à 140 Å<sup>2</sup>, tandis que 60 Å<sup>2</sup> est le seuil maximal pour le passage de la barrière hémato-encéphalique (**Cecchelli et al., 2007**).

### V.1.4.3. Solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau est une mesure de la quantité de substance chimique pouvant se dissoudre dans l'eau à une température donnée. L'unité de solubilité est généralement exprimée en mg /L ou en ppm (parties par million).

### V.1.4.4. Pénétration de la BHE (barrière hémato-encéphalique)

La barrière hémato-encéphalique est très sélective, elle sépare le sang circulant du système nerveux central. Les molécules qui agissent au niveau du système nerveux central doivent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre leur cible biologique.

### V.1.4.5. Inhibition des cytochromes P450

Le cytochrome P450 est une enzyme de détoxification dans le corps, elle peut inhiber plusieurs molécules comme elle peut en activer d'autres. Le cytochrome P450 joue un rôle dans l'oxydation des médicaments pour faciliter leur excrétion. La famille du cytochrome P450 humain (enzymes de phase I) contient 57 isoenzymes dont les principales sont : 1A2, 3A4, 2C9, 2C19 et 2D6 (**ADMETlab, 2022, pkCSM, 2022**).

### V.1.4.6. Substrat de la Pgp

La glycoprotéine P est une protéine membranaire de la superfamille des transporteurs de la cassette de liaison à l'ATP (ABC). C'est probablement le transporteur d'efflux le plus important, car il reconnaît un certain nombre de médicaments structurellement différents dont beaucoup d'entre eux sont également des substrats de la CYP3A4 (**ADMETlab, 2022, pkCSM, 2022**).

La modulation du transport médiée par la glycoprotéine P a des implications pharmacocinétiques importantes pour les substrats de la Pgp qui peuvent être exploitées pour des avantages thérapeutiques spécifiques ou entraîner des contre-indications.

### **V.2. Investigation par docking moléculaire du mode d'action des principaux composés des deux huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* étudiées envers la souche fongique *Saccharomyces cerevisiae***

#### **V.2.1. Principe**

La présente étude a évalué *in silico* par docking moléculaire l'interaction de deux ligands : le carvacrol et le citronellal, avec trois enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol chez l'espèce fongique *S. cerevisiae*. Les enzymes ciblées sont : la C-8 stérol isomérase (ERG2), la C-5 stérol désaturase (ERG3) et la Lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase (ERG11).

Le choix s'est porté sur le carvacrol et le citronellal puisque ce sont les composés majoritaires des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus*, respectivement. Durant cette expérience, deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) usuellement utilisés dans la conservation des boissons ont également été testés et ont servi de ligands de comparaison.

#### **V.2.2. Présentation du logiciel de docking moléculaire**

Le logiciel Arguslab (<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>), est un programme de modélisation moléculaire, de graphisme et de conception de médicaments. Ce programme est convivial, très répondu et connu pour sa fiabilité et son pouvoir de reproduire des ligands déjà complexés. Le moteur d'accueil ArgusDock, implémenté dans ArgusLab 4.0 se rapproche d'une méthode de recherche exhaustive, avec des similitudes avec d'autres programmes de docking tel que DOCK et Glide.

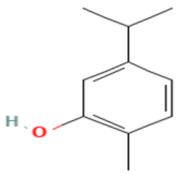
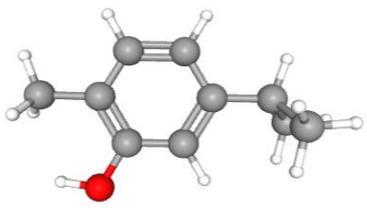
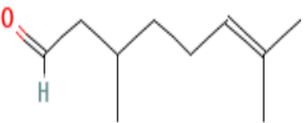
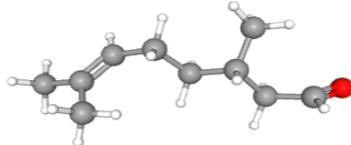
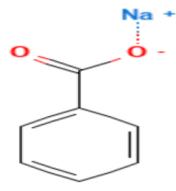
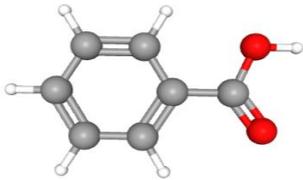
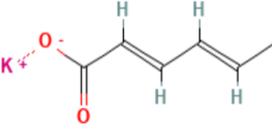
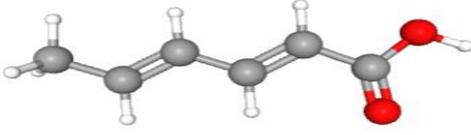
L'amarrage flexible du ligand est possible avec ArgusLab, où le ligand est décrit comme un arbre de torsion et des grilles sont construites recouvrant le site de liaison avec la protéine cible. Le nœud racine du ligand (groupe d'atomes liés qui n'ont pas de liaisons rotatives) est placé sur un point de recherche dans le site de liaison avec la protéine cible et un ensemble de rotations diverses et énergétiquement favorables est créé. Pour chaque rotation, les torsions sont construites dans l'ordre de largeur et les poses qui survivent à la recherche de torsion sont notées. Les poses d'énergie les plus basses sont conservées et l'ensemble final des poses subit une minimisation grossière, un regroupage et un classement (Thompson, 2014).

#### **V.2.3. Préparation des ligands**

La structure 3D des ligands a été téléchargée via la chimiothèque PubChem sous format SDF puis convertie en fichiers PDB en utilisant le logiciel OpenBabel version 2.0.

(<https://sourceforge.net/projects/openbabel/>). Enfin, l'optimisation géométrique des molécules sélectionnées a été réalisée grâce à la méthode de calcul développée par le logiciel Arguslab. La structure des ligands étudiés est regroupée dans le Tableau 15.

**Tableau 15 : Structure des ligands testés**

Ligand	Structure 2D	Structure 3D
Carvacrol		
Citronellal		
Benzoate de sodium		
Sorbate de potassium		

#### V.2.4. Structure des récepteurs étudiés

Les enzymes ciblées dans cette étude sont impliquées dans la synthèse de l'ergostérol comme illustré précédemment (Figure 10). Il est impératif que les protéines sélectionnées soient sous format PDB, qui est une structure tridimensionnelle obtenue essentiellement par cristallographie (rayons X), RMN, ou par modélisation.

##### V.2.4.1. C-8 stérol isomérase (ERG2)

La C-8 stérol isomérase communément appelée ERG2 est une enzyme constituée de 222 acides aminés synthétisée naturellement dans le réticulum endoplasmique rugueux des cellules fongiques. Cette protéine est impliquée dans la synthèse de l'ergostérol et précisément elle catalyse la réaction qui entraîne une insaturation du 7<sup>ème</sup> carbone dans le cycle B des stérols. L'ERG2 est identifiée par le code C7GRE9 dans la base de données Uniport et sa structure tridimensionnelle est obtenue grâce à la base de données de structures modélisées AlphaFold protein. (Argueso *et al.*, 2009). L'enzyme choisie appartient à une souche de *S. cerevisiae* (Figure 29).

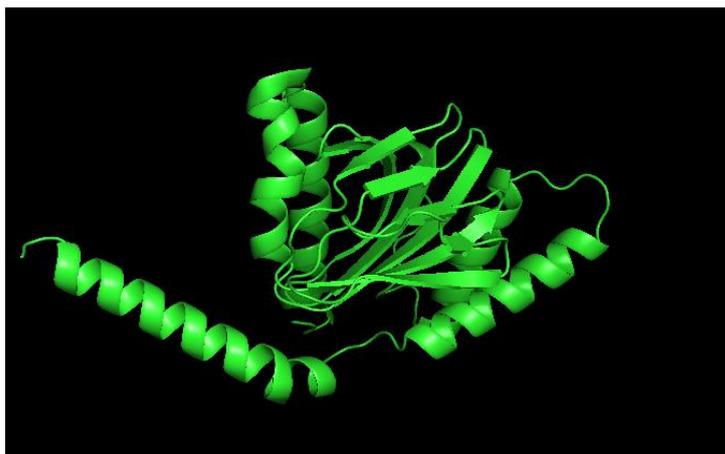
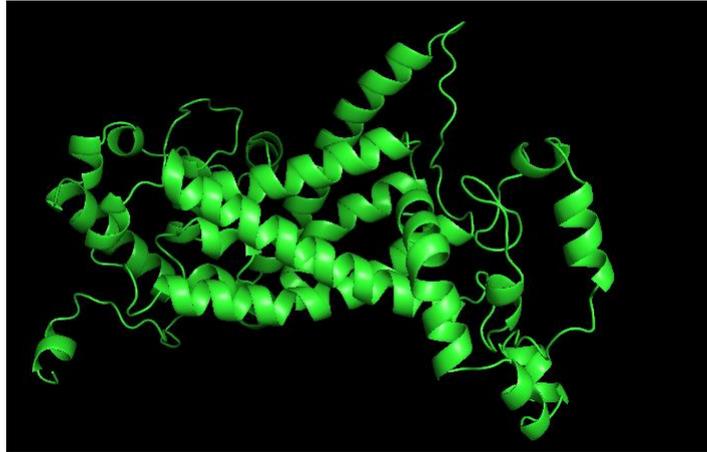


Figure 31 : Structure tertiaire du C-8 stérol isomérase (ERG2)

##### V.2.4.2. C-5 stérol désaturase (ERG3)

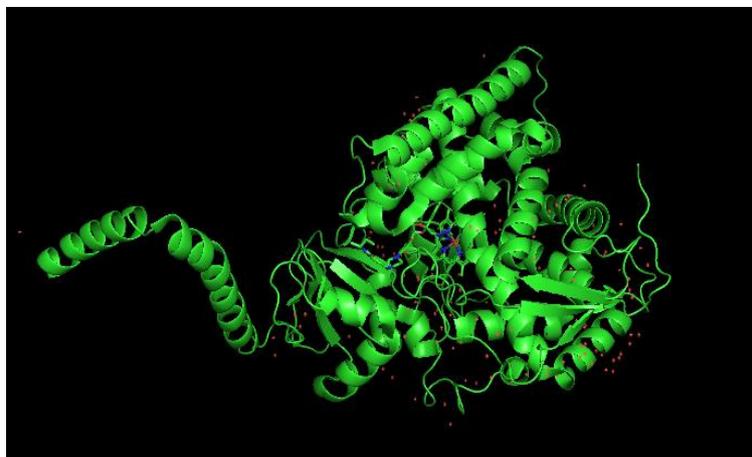
La C-5 stérol désaturase communément appelée ERG3 est une enzyme de 365 acides aminés. L'ERG3 catalyse l'introduction d'une double liaison au niveau du 5<sup>ème</sup> carbone du cycle B des stérols pour produire du 5-déhydroépistérol qui sera à son tour est converti en ergostérol. L'enzyme choisie pour le docking moléculaire est celle de l'espèce fongique *S. cerevisiae*, identifiée par le code P32353 dans la base de données Uniprot. Sa structure sous format PDB a été obtenue grâce à la base de données des structures modélisées AlphaFold protein (Arthington *et al.*, 1991) (Figure 32).



**Figure 32 : Structure tertiaire du C-5 stérol désaturase (ERG3)**

#### **V.2.4.3. Lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase (ERG11)**

La lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase, appelée aussi l'enzyme P450 cytochrome est un élément essentiel dans le troisième module de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Elle catalyse l'élimination du groupe C-14 $\alpha$ -méthyle du lanostérol et donc sa conversion en ergostérol. La structure tridimensionnelle choisie est obtenue à partir de la base de données protéique RCSB Protéine Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) identifiée par le code 4WMZ. L'enzyme choisie est isolée à partir d'une souche de *S. cerevisiae* ; elle se présente en complexe avec une molécule inhibitrice (le fluconazole) (Wei *et al.*, 2007) (Figure 33).



**Figure 33 : Structure tertiaire du Lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase (ERG11)  
Complexée avec l'inhibiteur Fluconazole dans son site actif**

#### **V.2.5. Détermination du site actif**

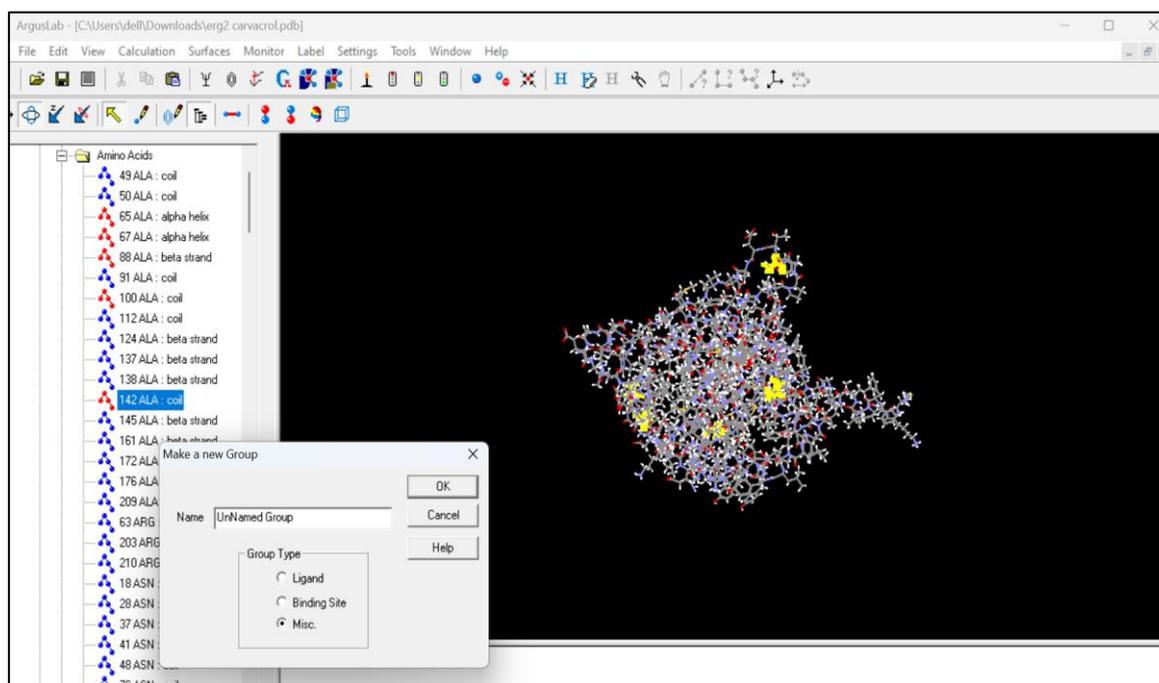
La détermination des sites de liaison des ligands est souvent le point de départ pour l'identification de la fonction des protéines. Le serveur Castp version 3.0 (Computed Atlas of Surface Topography of proteins) (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?2was>) a prédit le site actif

et donc les sites de liaisons (acides aminés) des deux enzymes ciblées : ERG2 et ERG3. En revanche, pour l'ERG11, le site actif est connu grâce aux sites de liaisons de l'inhibiteur (fluconazole) en complexe avec l'enzyme.

### V.2.6. Préparation des récepteurs ciblés

Les enzymes étudiées ont été préparées grâce au logiciel Arguslab 4.0. Des molécules d'hydrogène ont d'abord été ajoutées à toute la structure des protéines, afin de permettre l'établissement des interactions entre ligands et récepteurs. Pour les deux enzymes ERG2 et ERG3, les acides aminés impliqués dans le site actif déterminés par le logiciel Castp ont été sélectionnés et un site de liaison (Binding site) a été créé (Figure 34).

Alors que pour l'ERG11, l'inhibiteur lié avec l'enzyme a été éliminé afin de libérer le site actif et de permettre la liaison du ligand. En outre, toutes les molécules d'eau ont été éliminées afin d'éviter la perturbation des interactions entre le récepteur et les ligands.

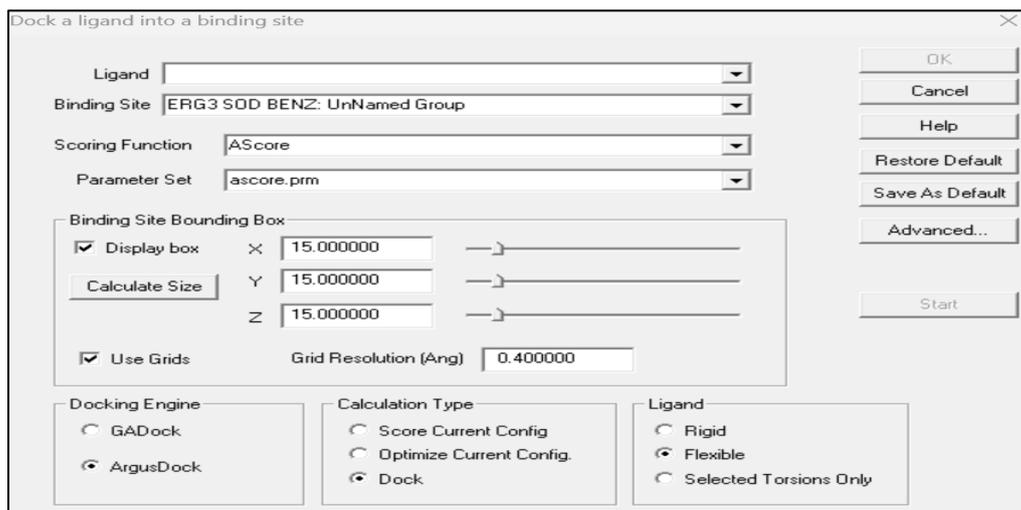


**Figure 34 : Sélection des acides aminés pour définir le site de liaison de la protéine grâce à la l'interface du logiciel Arguslab**

### V.2.7. Docking moléculaire

La fenêtre de docking est ouverte après avoir préparé les ligands, les récepteurs et sélectionné les sites de liaison. Par la suite, le calcul de la taille de la Grid box est effectué afin que le récepteur et le ligand soient plongés dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée. Le centre de la Grid box est déterminé par les coordonnées X et Y et Z avec les dimensions en Å et une résolution de la grille à 0,4 Å. La boîte est alors

centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille du ligand étudié puis le docking est lancé grâce au bouton Start (Figure 35).



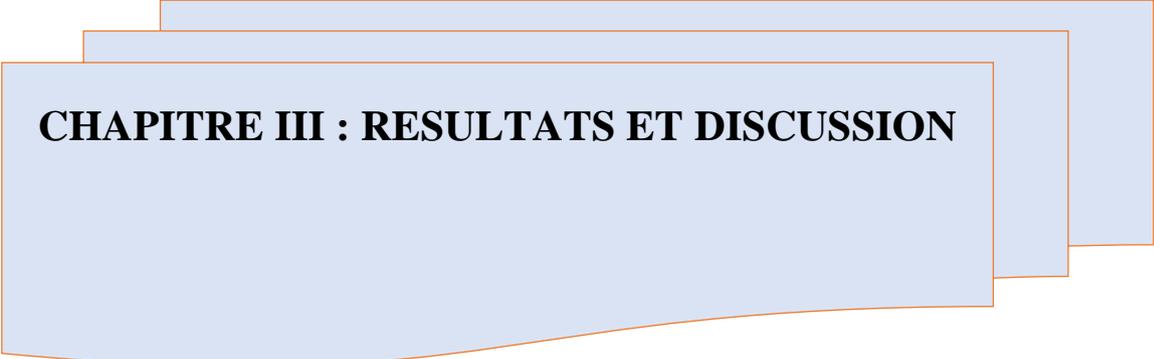
**Figure 35 : Fenêtre permettant de régler les paramètres du docking moléculaire réalisé avec le logiciel Arguslab**

### V.2.8. Evaluation des résultats

La première phase (le docking) est l'étape de sélection, qui consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, les positions et les orientations possibles, tout en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. La deuxième phase (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées. Cette opération a permis d'avoir les meilleures conformations du ligand au niveau du site actif classées par scores d'affinité décroissants exprimés en kcal/mol, sachant que plus l'énergie de la pose est négative plus l'interaction récepteur-ligand est forte (Aurélien, 2007).

### V.2.9. Visualisation des résultats

La visualisation des interactions (2D) et des meilleures poses entre ligands et enzymes a été effectuée avec BIOVIA Discovery Studio software version 2021 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).



## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

## Partie I. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

### I.1. Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

L'analyse chimique de l'HE du *T. vulgaris* a été réalisée par CG/FID combinée à une CG/SM. L'identification des constituants a été effectuée en comparant les indices de rétention calculés sur les deux colonnes polaires et apolaires avec ceux répertoriés dans les bases de données électroniques (NIST, 2014) et bibliographiques (Adams, 2007 ; Joulain et Konig, 1998). Les composés identifiés sont regroupés dans le Tableau 16 selon l'ordre d'élution sur la colonne apolaire (BP-1). Les indices de rétention sur les deux colonnes capillaires, les pourcentages relatifs (grâce à la CG/FID sur colonne BP-1) sont aussi rapportés dans le Tableau 16. Le chromatogramme de l'HE du *T. vulgaris* est présenté dans l'annexe III

L'analyse détaillée de l'HE du *T. vulgaris* a permis l'identification de 28 composés, qui présentent une aire cumulée qui correspond à 97,92 % des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'HE. Les monoterpènes oxygénés dominent la composition de l'HE du *T. vulgaris* avec un pourcentage atteignant 74,54 %. Cette fraction est dominée par le carvacrol dont le pourcentage atteint 68,20 % et qui représente le composé majoritaire de l'HE étudiée. Les monoterpènes hydrocarbonés constituent la deuxième classe la plus abondante avec un pourcentage de 19,35 %. Parmi ceux-ci, le p-cymène (8,12 %) est le composé prédominant, suivi du  $\gamma$ -terpinène (5,73 %). Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont quant à eux peu présents (3,79 %) avec le  $\beta$ -caryophyllène comme composé prédominant (3,45 %). Enfin, les sesquiterpènes oxygénés sont quasi absents de la composition de l'HE avec un pourcentage de 0,24 % due à la présence du caryophyllène oxyde uniquement. Le pourcentage restant est constitué par des composés dont la teneur est inférieure à 3 % dans l'HE du *T. vulgaris* (Figure 36 et 37).

Tableau 16 : Composition chimique de l'HE du *T. vulgaris*

No.	Composé	IR <sup>a</sup>	IRL <sup>a</sup>	IR <sup>P</sup>	IRL <sup>P</sup>	[%]
1	$\alpha$ -Thuyène	925	924	1022	1027	0,45
2	$\alpha$ - Pinène	933	932	1019	1110	0,63
3	Camphène	946	946	1070	1069	0,16
4	Sabinène	964	969	1022	1022	0,46
5	Octan-3-ol	973	974	1116	1392	0,12
6	Myrcène	983	988	1165	1161	1,79
7	$\alpha$ -Phellandrène	1000	1002	1170	1168	0,21
8	$\delta$ -3-Carène	1008	1008	1153	1147	tr
9	$\alpha$ -Terpinène	1012	1014	1186	1178	1,45
10	p-Cymène	1014	1020	1276	1270	<b>8,12</b>
11	Limonène *	1023	1024	1205	1198	0,23
12	1.8 Cinéol *	1023	1026	1214	1186	0,31
13	e- $\beta$ -Ocimène	1039	1032	1254	1250	tr
14	$\gamma$ -Terpinène	1051	1054	1250	1245	<b>5,73</b>
15	Cis- Sabinène hydrate	1057	1056,3	1465	1460	0,44
16	Linalool	1087	1095	1549	1543	2,77
17	Bornéol	1152	1164	1702	1700	0,75
18	Terpinène -4-ol	1165	1174	1603	1601	1,22
19	$\alpha$ - Terpinéol	1174	1186	1610	1694	0,10
20	Thymyl acétate	1270	1342,7	1876	1867	0,3
21	Thymol	1273	1289	2204	2164	0,14
22	Carvacrol	1282	1298	2216	2211	<b>68,20</b>
23	Carvacryl acétate	1347	1370	1876	1880	0,31
24	$\beta$ - Caryophyllène	1419	1417	1598	1599	<b>3,45</b>
25	$\alpha$ - Humulène	1452	1452	1670	1667	0,11
26	$\beta$ -Bisabolène	1503	1505	1728	1728	0,23
27	$\gamma$ -Cadinène	1516	1513	2278	1763	tr
28	Oxyde de caryophyllène	1572	1582	1979	1986	0,24
Total identifié						97,92

IR<sup>a</sup> : indice de rétention sur colonne apolaire (BP-1) ; RI<sup>P</sup> : indice de rétention sur colonne polaire (BP-20). Ordre d'élution et pourcentages des composés individuels estimés sur colonne apolaire (BP- 1), excepté pour ceux avec un astérisque (\*). RIL<sup>a</sup> : indice de rétention sur colonne apolaire de la littérature (Adams, 2007). LIR<sup>P</sup> : indice de rétention sur colonne polaire de la littérature (Babushok *et al.*,2011). tr : traces (< 0,01%). Les composés majoritaires avec des pourcentages notables sont en gras.

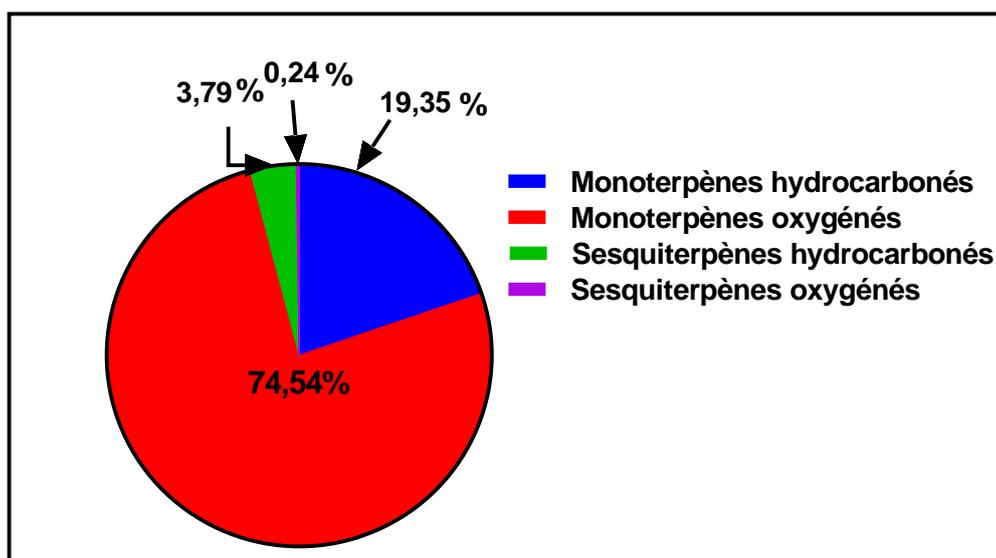


Figure 36 : Pourcentage de chaque catégorie de molécules présentes dans l'HE du *Thymus vulgaris*

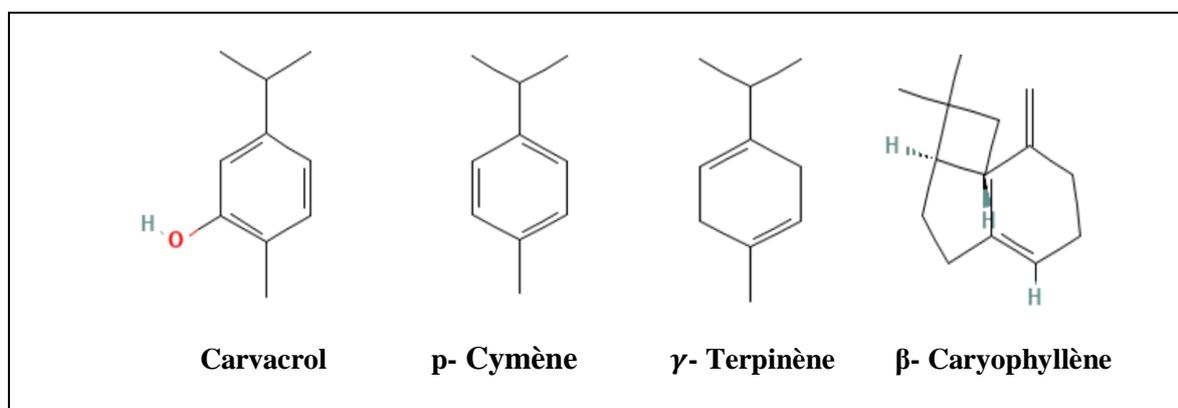


Figure 37 : Les principales molécules constituant l'HE du *T. vulgaris*

La présente expérience a établi que L'HE du *T. vulgaris* est largement dominée par le carvacrol (68,20 %), ce qui concorde avec un certain nombre d'investigations menées précédemment.

Parmi lesquelles celles de Dash *et al.* (2021), qui ont exposé un profil chimique d'une HE du *T. vulgaris* originaire d'Inde dont le carvacrol (45,53 %) est le composé majoritaire. De même que différents pourcentages de carvacrol ont été décrits pour des HES du *T. vulgaris* de divers pays : 56,79 % d'Algérie, 70,3 % du Portugal, 45,5 % du Brésil, et même jusqu'à 86,1 % de Jordanie (Boukhatem *et al.*, 2021 ; Pina-Vas *et al.*, 2004 ; Iten *et al.*, 2009 ; Hudaib et Aburjai, 2007).

A l'opposé, Abdelli *et al.* (2017) ont présenté une HE du *T. vulgaris* dont le composé majoritaire est le thymol (59,5 %), qui est un isomère de position (position de l'hydroxyle) de la molécule de carvacrol. Alors que Satyal *et al.* (2016) et Llorens et Molina. (2016) ont exposé

des HEs du *T. vulgaris* dominées par le linalool (76,15 %) et par le 1,8 cinéol (68,5 %), respectivement.

L'HE du *T. vulgaris* est réputée pour sa grande variété polymorphique en ce qui concerne la production des molécules monoterpéniques. Ce polymorphisme a permis d'identifier jusqu'à 13 grands chémotypes pour l'HE étudiée, dont les plus répandus sont ceux dominés par le thymol, le p-cymène, le linalool, l' $\alpha$ -terpinéol, le thujanol-4, le carvacrol et le géraniol (**Thompson et al., 2003**). L'élaboration de ces monoterpènes chez le *T. vulgaris* dépend de facteurs externes qui influencent leur production tels que la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement et la composition du sol. (**Bruneton, 1999**)

A titre d'illustration, des travaux ont clairement établi une corrélation directe entre le type de chémotype de l'HE du *T. vulgaris* et le taux d'humidité du sol. Dans les environnements xériques stables, le *T. vulgaris* exprime les chémotypes chimiquement les plus élaborés (thymol et carvacrol). Tandis que, dans des environnements perturbés et plus humides, c'est les chémotypes non phénoliques qui sont favorisés (**Granger et Passet, 1973**).

Autrement dit, les chémotypes phénoliques dominés par le thymol et le carvacrol, se retrouvent généralement dans les climats relativement doux et secs de la région méditerranéenne ; et ceux non phénoliques, caractérisés par la forte prévalence de monoterpènes aliphatiques oxygénés sont adaptées à une plus large gamme d'environnements, et même aux plus extrêmes (**Kulevanova et al., 1996**).

Le profil chimique de l'HE du *T. vulgaris* se caractérise en termes d'abondance par l'enchaînement des trois molécules terpéniques : le carvacrol suivi du p-cymène et du  $\gamma$ -terpinène. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le carvacrol provient de l'hydroxylation du p-cymène qui a son tour est issu de l'aromatisation du  $\gamma$ -terpinène (**Thompson et al., 2003**).

Toutefois, des données récentes contredisent cette affirmation et exposent que le  $\gamma$ -terpinène produit du carvacrol sans passage par le p-cymène. Cela se fait grâce aux enzymes cytochrome P450 monooxygénases de la sous-famille des CYP71D (180 et 181). Ces enzymes produisent des intermédiaires alcooliques instables (cyclohexadiénol). Ces derniers subissent une oxydation en C-6 pour donner naissance à un intermédiaire du carvacrol.

Les cyclohexadiénols obtenus après action des CYP71D subissent une déshydrogénation en cétones grâce à des déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR) et plus précisément des SDR1(TvSDR1). La dernière étape qui conduit à la formation du carvacrol se produit via une tautomérie céto-énol. (**Krause et al., 2021**).

### I.2. Composition chimique de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'analyse chimique de l'HE de *C. nardus* s'est faite par CG/FID combinée à une CG/SM. L'identification et la quantification des constituants se sont faites de la même façon que pour l'HE du *T. vulgaris* (page 68). Le chromatogramme de l'HE du *C. nardus* est présenté dans l'annexe IV

L'analyse détaillée de l'HE du *C. nardus* a permis l'identification de 23 composés qui présentent une aire cumulée qui correspond à 95,1 % des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'HE. La classe des monoterpènes oxygénés domine la composition de l'HE du *T. vulgaris* avec un pourcentage de 82,4 %. Cette fraction est dominée par le citronellal (37,1%), suivi du géraniol (24,4 %) et du citronellool (13,8 %). Les monoterpènes hydrocarbonés représentent quant à eux 2,8 %, avec le limonène (2,7 %) comme composé principal de cette classe de molécules. Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent un pourcentage de 6,5 % avec le  $\delta$  cadinène (1,7 %) suivi du germacrène D (1,5 %). Enfin, les sesquiterpènes oxygénés représentent un pourcentage de 3,4 % dû principalement à la présence du  $\beta$ -élémol (3,2 %). Le pourcentage restant représente des composés dont la teneur est inférieure à 3 % dans l'HE du *C. nardus*. (Tableau 17, Figure 38 et 39).

**Tableau 17 : Composition chimique de l'HE du *C. nardus***

No.	Composé	IR <sup>a</sup>	IRL <sup>a</sup>	IR <sup>p</sup>	IRL <sup>p</sup>	[%]
1	$\alpha$ -Pinène	933	932	1100	1110	tr
2	Myrcène	983	988	1165	1161	0,1
3	Limonène	1024	1024	1205	1198	2,7
4	Linalool	1086	1095	1485	1543	1,0
5	Citronellal	1135	1148	1485	1475	<b>37,1</b>
6	Isopulégol	1145	1145	1566	1586	0,5
7	Citronellol	1213	1212	1769	1764	<b>13,8</b>
8	Néral	1217	1220,3	1683	1679	0,2
9	Géraniol	1238	1249	1850	1839	<b>24,4</b>
10	Géranial	1246	1264	1724	1725	0,4
11	Citronellyl acétate	1336	1336	1665	1657	2,2
12	Géranyl acétate	1362	1379	1758	1751	2,8
13	$\beta$ - Bourbonène	1385	1387	1520	1523	0,1
14	$\beta$ -Elémène	1389	1389	1592	1591	2,0
15	(E)- $\beta$ - Caryophyllène	1419	1417	1597	1599	0,1
16	$\alpha$ - Humulène	1450	1452	1670	1667	0,1
17	Germacrène D	1477	1484	1709	1708	1,5
18	$\alpha$ - Muurolène	1494	1500	2048	1723	0,4
19	$\gamma$ - Cadinène	1502	1513	1760	1763	0,5
20	$\delta$ - Cadinène	1516	1522	1760	1756	1,7
21	1,4 Cadinadiène	1532	1533	1792	1788	0,1
22	$\beta$ - Elémol	1536	1548	2079	2079	<b>3,2</b>
23	$\alpha$ -Cadinol	1641	1640	2229	2227	0,2
Total identifié						95,1

IR<sup>a</sup> : indice de rétention sur colonne apolaire (BP-1) ; RI<sup>p</sup> : indice de rétention sur colonne polaire (BP-20). Ordre d'élution et pourcentages des composés individuels estimés sur colonne apolaire (BP-1). IRL<sup>a</sup> : indice de rétention sur colonne apolaire de la littérature (Adams, 2007). IRL<sup>p</sup> : indice de rétention sur colonne polaire de la littérature (Babushok *et al.*, 2011). tr : traces (< 0,01%). Les composés majoritaires avec des pourcentages notables sont en gras.

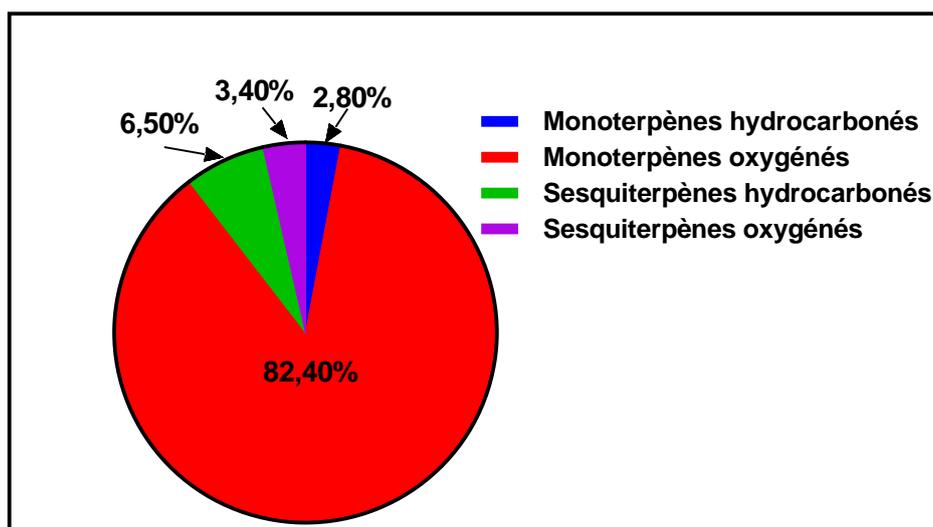


Figure 38 : Pourcentage de chaque catégorie de molécules présentes dans l'HE du *C. nardus*

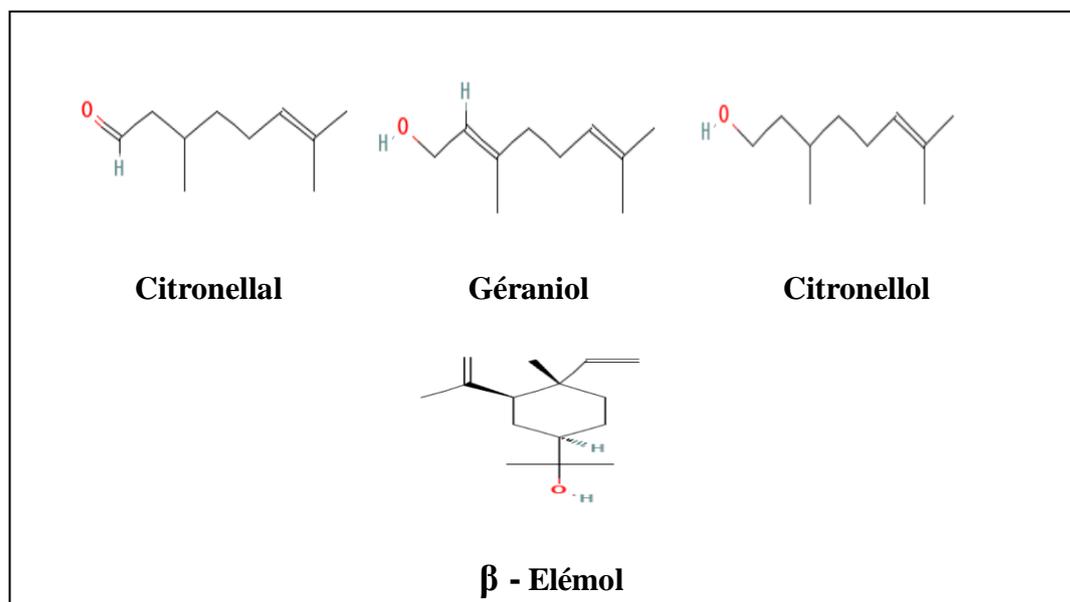


Figure 39 : Les principales molécules constituant l'HE du *C. nardus*

L'HE du *C. nardus* se caractérise par la prédominance du citronellal (37,1%), suivi du géranol (24,4 %) et du citronellol (13,8 %). Ces résultats s'accordent avec un nombre considérable de travaux qui documentent des HEs dominées par les trois mêmes composés majoritaires et dans des proportions comparables aux nôtres.

Parmi lesquelles celle de Quintanella *et al.* (2012), qui ont rapporté une HE du *C. nardus* native de Colombie dont le citronellal est prédominant (45,7 %) suivi du géranol (20,4 %) et du citronellol (9,9 %). En Malaisie, l'HE de *C. nardus* a exposé le citronellal (39,66 %) comme composé principal, suivi du géranol (18,83 %) et du citronellol (12,98 %) (Weng *et al.*, 2015).

Au Togo, c'est le citronellal (35,5 %) suivi du géraniol (27,9 %) et du citronellole (10,7 %) qui dominent la composition chimique de l'HE étudiée (Koba *et al.*, 2009). Enfin, une HE du *C. nardus* native de France a exposé un profil chimique où c'est le citronellal (42 %) qui domine, suivi du géraniol (20,8 %) et du citronellole (14,5 %) (Billerbeck *et al.*, 2001).

D'autre part, des travaux réalisés sur l'HE du *C. nardus* ont mis en exergue des profils chimiques légèrement différents de celui exposé pour notre HE, toujours avec le citronellal comme composé prédominant, mais avec des composés secondaires différents. A titre d'illustration, Gimenez Martinez *et al.* (2022) ont exposé une composition chimique d'une HE du *C. nardus* dominée par le citronellal (21,78 %) suivi du citronellole (16,22 %), et du géranyl acétate (14,93 %). En Indonésie, une HE de *C. nardus* a exposé le citronellal (35,97 %) comme composé majoritaire suivi du nérol (17,28 %) et du citronellole (10,03 %) (Setiawati *et al.*, 2011). Ou encore, Mahalwal et Ali. (2003) qui ont rapporté un profil chimique de l'HE étudiée dominé par le citronellal (29,7 %), du géraniol (24,2 %) et de l' $\alpha$ -terpinéol (9,2 %).

En outre, l'HE de *C. nardus* peut aussi présenter une composition chimique dominée par le géraniol, avec des études exposant une grande variation de pourcentages : 35,7 % au Japon, 75,1 % en Malaisie et 29,3 % en Côte d'Ivoire (Nakahara *et al.*, 2013 ; Chong Jen Weng *et al.*, 2015 ; Doumbia *et al.*, 2014). D'un tout autre côté, Kobenan *et al.* (2018) ont exhibé une HE de *C. nardus* avec un profil exceptionnel dont le  $\delta$ -3-carène (29,09 %) constitue le composé majoritaire.

Le *C. nardus* à chémotype citronellal est le plus abondant et le plus répandu dans la nature, associé presque toujours avec le géraniol et le citronellole. Tandis que, le chémotype à géraniol vient en seconde position en termes de présence même s'il est nettement moins abondant. Cette variabilité chimique au sein l'HE de *C. nardus* dépend avant tout du procédé d'extraction, de l'origine géographique, des conditions environnementales et pédoclimatiques, des stades phénologiques, du moment de la récolte et de la génétique (Kaur *et al.*, 2021).

Le profil chimique de l'HE du *C. nardus* est caractérisé par l'enchaînement de trois composés : le citronellal, le géraniol et le citronellole. Cette composition moléculaire s'explique du fait que le géraniol constitue le point de départ pour la synthèse des deux autres composés (citronellole et citronellal) (Akhila, 2010). La conversion du géraniol en citronellole et son oxydation en citronellal se fait grâce à l'intervention d'une alcool déshydrogénase (ADH) et d'une aldo-kéto réductase (AKR) (Iijima *et al.*, 2014).

### Partie II. Evaluation de la toxicité *in vivo* et *in situ* des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

#### II.1. Evaluation de la toxicité aiguë orale des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *C.nardus*

##### II.1.1. Evaluation de la toxicité aiguë orale de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

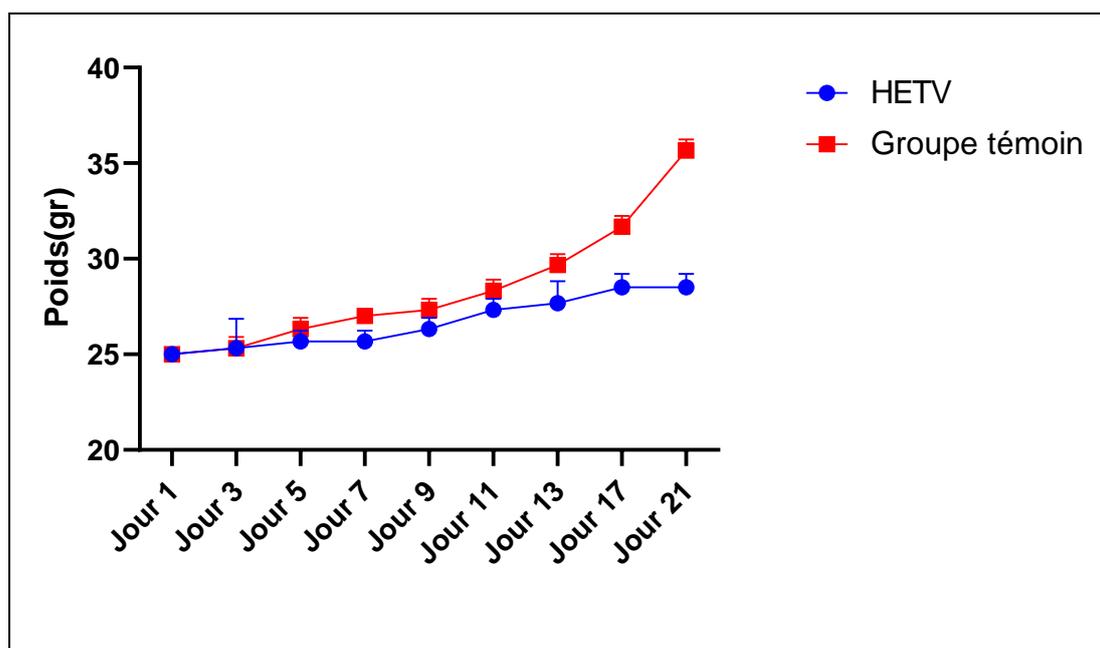
L'évaluation de la toxicité orale aiguë de l'HE du *T. vulgaris* s'est faite selon la méthode par classe suivant la ligne directrice 423 de l'OCDE. L'expérience a été réalisée en administrant aux souris les trois concentrations d'HE suivantes : 50 mg/kg p.c suivi de 300mg/kg p.c et enfin 2000mg/kg p.c.

L'administration de l'HE de *T. vulgaris* à 50 mg/kg p.c aux souris n'a donné lieu à aucun signe de toxicité immédiate. Une demi-heure après l'administration, aucun changement de comportement inhabituel n'a été décelé chez les animaux et aucun signe de toxicité n'a été noté. Par ailleurs, au cours des 24 heures et des 7 jours qui ont suivi l'administration de l'HE aux trois animaux aucune manifestation inhabituelle et aucune mortalité animale n'a été observée.

Les trois animaux survivants ont reçu la dose supérieure d'HE de *T. vulgaris* qui est celle à 300mg/kg p.c. Cette dernière n'a donné lieu à aucune mortalité chez les animaux, ni à aucun signe de toxicité particulière ou d'anomalies durant les 7 jours d'expérience.

En revanche, l'administration de l'HE à 2000mg/kg p.c a conduit à la mort d'un des trois animaux sans manifestation préalable de quelque nature qu'elle soit. D'autre part, le suivi pondéral des animaux au cours de l'expérience a révélé une stabilité relative, contrairement au groupe témoin où le poids des animaux était en augmentation ( $p < 0,05$ ) (Figure 40).

Les résultats obtenus indiquent clairement que l'HE du *T. vulgaris* présente une toxicité aiguë modérée faisant partie de la catégorie 5, c'est-à-dire que sa DL50 (dose létale médiane) est supérieure à 2000mg/kg p.c. Le schéma d'essai de la ligne directrice 423 (OCDE) est indiqué par l'annexe III.



**Figure 40 : Suivi pondéral des animaux après administration de l'HE du *T. vulgaris*.** HETV : Huile essentielle du *Thymus vulgaris* ; Groupe témoin : Souris n'ayant reçu aucune dose d'huile essentielle. Les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  écart-type, n=3 souris/groupes.

### II.1.2 Observations macroscopiques et histopathologique

A la fin de l'expérience, l'étude à échelle macroscopique des animaux après dissection n'a révélé aucune anomalie particulière au niveau des organes observés. En outre, l'observation macroscopique a indiqué l'absence d'hépatomégalie avec la présence d'une légère cardiomégalie.

L'étude histopathologique réalisée au niveau du foie a exposé la présence d'une congestion vasculaire multifocale, d'une ectasie, d'une congestion des sinusoides hépatiques marquée et d'une dégénérescence hépatocytaire minime centro-lobulaire a multifocale. L'observation microscopique des poumons a clairement indiqué la présence d'œdèmes intra alvéolaires. Enfin, les coupes réalisées au niveau reins ont indiqué une légère congestion vasculaire cortico-médullaire (Annexe V).

L'évaluation la toxicité orale aiguë de l'HE du *T. vulgaris* a chémotype carvacrol a permis de la classer dans la catégorie 5 (DL50 supérieur à 2000mg/kg). Ce qui contredit les investigations menées par Armas *et al.* (2019) et Tisserand et Young. (2013) qui ont évalué la toxicité aiguë d'une l'HE du *T. vulgaris* dont le thymol est le composé majoritaire. Les résultats ont indiqué une DL50 comprise entre 300 et 2000mg/kg p.c (Catégorie 4) pour les deux travaux. La différence entre nos résultats et les leurs s'explique forcément par la différence de composition chimique entre les HEs.

Les lésions pulmonaires induites par l'HE du *T. vulgaris* sont probablement due à l'activation des récepteurs membranaires cationiques TPRA1 (The transient receptor potential cation channel,

subfamily A, member 1). C'est des protéines fortement exprimées dans les nerfs sensoriels des cellules qui projettent les fibres C vagues des branches pulmonaires. (Belvisi *et al.*, 2011). Des recherches plus poussées ont même établi un lien direct entre le thymol et l'activation de ces TRPA1. De ce fait, il est logique d'attribuer au thymol la responsabilité de l'apparition des lésions pulmonaires. Cette dernière affirmation pourrait facilement être étendue au carvacrol et de déduire comment cette molécule induit des lésions pulmonaires chez les souris. (Lee *et al.*, 2008)

L'HE du *T. vulgaris* n'est pas forcément responsable des lésions rénales constatées. Ces dernières peuvent apparaître spontanément dues à une néphropathie chronique, affection très courante chez les rongeurs. Cette lésion débute entre trois et six mois chez les souris et se manifeste par élargissement des membranes glomérulaires et entraîne une fibrose interstitielle, des foyers d'infiltrations cellulaires et une glomérulosclérose (Lagarto *et al.*, 2005).

L'administration d'une dose de 2000 mg/kg d'HE du *T. vulgaris* aux souris a induit un certain nombre de lésions au niveau organes prélevés. Toutefois, ces altérations sont facilement évitables en employant des concentrations d'HE inférieures à celles utilisées lors de notre expérience. Pour preuve, Armas *et al.* (2019) qui ont rapporté que l'administration de l'HE à 300mg/kg chez les rats n'a donné lieu à aucune anomalie au niveau hépatique.

Cette dernière affirmation est d'autant plus logique dans la mesure où le carvacrol administré à 100mg/kg a exercé un effet hépato-protecteur contre un certain nombre de maladies hépatiques (Stéatose, fibrose...etc.) chez des souris. La molécule a aussi réduit le niveau des cibles de la voie de la MAP kinase telle que le facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B et ceux des marqueurs pro-inflammatoires qui en découlent (TNF $\alpha$ , IL6...etc.) (Khan *et al.*, 2019).

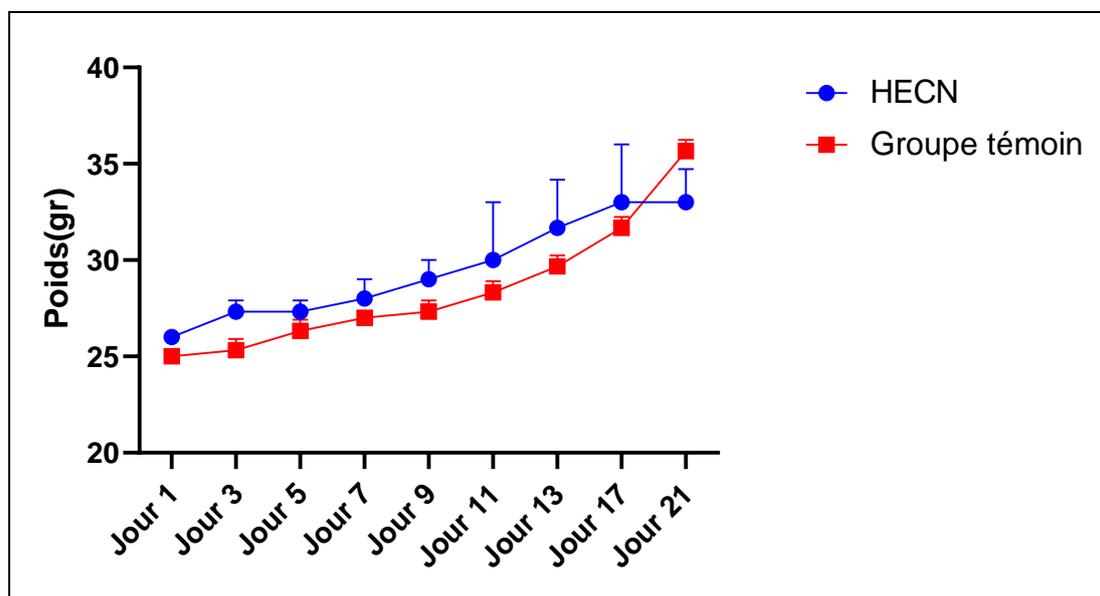
### II.1.4. Evaluation de la toxicité aiguë de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'évaluation de la toxicité orale aiguë de l'HE du *C. nardus* a été effectuée selon la méthode par classe suivant la ligne directrice 423 de l'OCDE. Le choix des doses d'HE administrées est identique à celles choisies pour l'HE du *T. vulgaris*

L'administration de la dose initiale (50 mg/kg p.c) de l'HE du *C. nardus* aux trois souris n'a donné lieu à aucun signe immédiat de toxicité ou de changement de comportement. L'observation des animaux après quelques heures, et même 7 jours après le début de l'expérience n'a indiqué aucun signe de toxicité particulière. Les mêmes constatations ont été rapportées pour les deux autres concentrations supérieures d'HE administrées (300 et 2000mg/kg p.c).

Les résultats du suivi pondéral des animaux après administration de l'HE du *C. nardus* en comparaison avec un groupe témoin sont présentés dans la Figure 41. Le suivi du poids a révélé une augmentation constante et normale du poids des souris, qui se rapproche de celle du groupe

témoin ( $p= 0,13$ ). Les résultats obtenus ont permis de déduire que la toxicité aiguë de l'HE fait partie de la catégorie 5, c'est-à-dire que la valeur de DL50 est supérieure à 2000 mg/kg p.c.



**Figure 41 : Suivi pondéral des animaux après administration de l'HE du *C. nardus*.**  
 HECN : Huile essentielle du *Cymbopogon nardus*; Groupe témoin : Souris n'ayant reçu aucune dose d'HE.  
 Les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=3$  souris/groupes.

### II.1.5. Observations macroscopiques et histopathologique

L'observation à l'échelle macroscopique des animaux après dissection n'a montré aucune anomalie aux niveaux des organes (absence d'hépatomégalie et de cardiomégalie).

L'étude histopathologique des organes prélevés a révélé la présence au niveau du foie d'une dégénérescence hépatocytaire périvasculaire. Les coupes pulmonaires ont révélé la présence de foyers congestivo-hémorragique modéré avec accumulation d'hémosidérine et d'une hémorragie alvéolaire minime. Alors que pour les reins une congestion corticale glomérulaire et interstitielle minime a été constatée avec une congestion médullaire interstitielle modérée (Annexe VI).

L'HE étudiée du *C. nardus* présente une toxicité orale aiguë faible de catégorie 5 (DL50 supérieure à 2000 mg/kg). Ce qui est en accord avec les investigations menées par Ouédraogo *et al.* (2016) et Andersen *et al.* (1997). Ces auteurs ont exposé des HEs de l'espèce étudiée à un chémotype citronellal qui présentent une très faible toxicité orale aiguë (DL50 de 5000mg/kg p.c.).

A l'opposé, Ranjitkar *et al.* (2019) ont indiqué qu'une HE du *C. nardus* présente une toxicité orale aiguë modérée (DL50 de 500mg/kg p.c) estimée selon la ligne directrice 423 de l'OCDE. La valeur de DL50 obtenue pour l'HE est très inférieure à celle estimée par nos travaux.

Notre étude histopathologique a mis en lumière des altérations au niveau des organes prélevés après administration d'une dose de 2000mg/kg de l'HE chez les souris. Néanmoins, l'utilisation de l'HE du *C. nardus* a des concentrations inférieures permettrait à coup sûr d'éviter l'apparition de lésions organiques.

Pour preuve, Ouedraogo *et al.* (2016) qui ont souligné que l'administration de l'HE du *C. nardus* à 1000 mg/kg chez des souris n'a donné lieu à aucune anomalie au niveau d'organes vitaux (le foie, les reins, la rate, les poumons et le cœur). De plus, les auteurs ont rapporté l'absence de changement pondéral chez les animaux traités en comparaison avec les autres.

Des travaux antérieurs ont même signalé l'effet protecteur du citronellal à 200mg/kg sur la réduction des altérations hépatiques induites par la doxorubicin (un médicament anticancéreux) chez les rats. La molécule induit cet effet hépatoprotecteur en atténuant l'apoptose des hépatocytes via l'activation de la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B (PI3K/Akt).

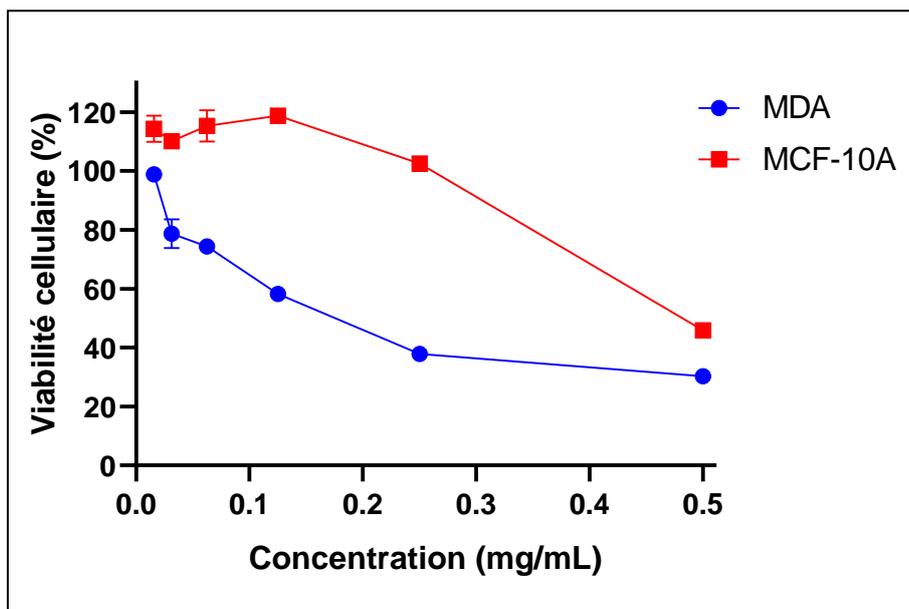
Le géraniol ne présente aucun effet toxique sur le foie même administré à une dose de 120 mg/kg pendant un mois chez les souris (Pavan *et al.* 2018). Le composé exerce même un effet protecteur sur les poumons lorsqu'il est administré à une dose de 50 mg/kg chez les souris. (Jiang *et al.*, 2017).

Bien plus récemment, Younis *et al.* (2021) ont souligné l'action protectrice du géraniol sur la fonction rénale lorsqu'il est administré à 200 mg/kg chez les rats. Cet effet s'exerce en agissant sur la voie de signalisation Keap-1/Nrf2, un élément vital dans l'action antioxydante au niveau rénal (Younis *et al.*, 2021).

## II.2. Evaluation de la toxicité *in situ* des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *C.nardus*

### II.2.1. Evaluation de la toxicité *in situ* de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

L'évaluation de la cytotoxicité de l'HE du *T. vulgaris* s'est faite contre deux lignées cellulaires en employant le test MTT. La première lignée est d'origine tumorale issue d'un adénocarcinome humain (MDA) et la deuxième non tumorale normale issue de cellules épithéliales de sein humain (MCF10A). La cytotoxicité a été évaluée de manière dose-dépendante pendant 24 h selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (page 43). Les résultats ont révélé que l'HE du *T. vulgaris* présente une CI50 de  $0,26 \pm 0,005$  mg/mL vis-à-vis de la lignée cellulaire MDA. Alors que l'HE a exhibé une valeur de CI50 de  $0,53 \pm 0,083$  mg/mL vis-à-vis de la lignée cellulaire MCF10A (Figure 42).



**Figure 42 : Evaluation de l’action cytotoxique de l’HE du *T. vulgaris* en fonction de sa concentration (mg/mL).** MDA : Lignée tumorale issue d'un adénocarcinome humain ; MCF-10A : Lignée non tumorale normale issue de cellules épithéliales de sein humain. Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage (%)

La présente expérience a établi que l’HE du *T. vulgaris* présente une cytotoxicité modérée pour les deux lignées cellulaires testées (Sylvestre *et al.*, 2006). Nos résultats concordent avec un certain nombre de travaux rapportant une cytotoxicité modérée de l’HE en dépit des chémotypes et des lignées cellulaires testées (Sertel *et al.*, 2011 ; Shahrani *et al.*, 2017 ; Khalaf *et al.*, 2021).

A titre d’exemple, Dash *et al.* (2021) ont évalué les propriétés cytotoxiques d’une l’HE du *T. vulgaris* a chémotype carvacrol envers deux lignées cellulaires cancéreuses qui proviennent du foie (HepG-2) et de la prostate (PC-3). L’HE a présenté une cytotoxicité modérée avec des valeurs de CI50 de 135,46 et de 98,59  $\mu\text{g/mL}$  envers les lignées cellulaires HepG et PC-3, respectivement (Dash *et al.*, 2021).

En revanche, nos résultats divergent avec ceux de Miladi *et al.* (2013) qui ont évalué la cytotoxicité d’une HE du *T. vulgaris* a chémotype thymol (41,33 %). L’HE a exposé une forte cytotoxicité envers la lignée cellulaire de cellules épithéliales d’un adénocarcinome de poumons humains (A549) avec une CI50 atteignant 10,50  $\mu\text{g/mL}$ .

L’HE étudiée du *T. vulgaris* présente une faible cytotoxicité qui est attribuée au mélange complexe de monoterpènes et de sesquiterpènes qui la compose. Néanmoins, la teneur très élevée en carvacrol de l’HE laisse à penser qu’il est responsable de cet effet cytotoxique.

De nombreux travaux ont investigué la cytotoxicité du carvacrol et envers diverses lignées cellulaires (Mehdi *et al.*, 2011 ; Al-Fatlawi *et al.*, 2014 ; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2014).

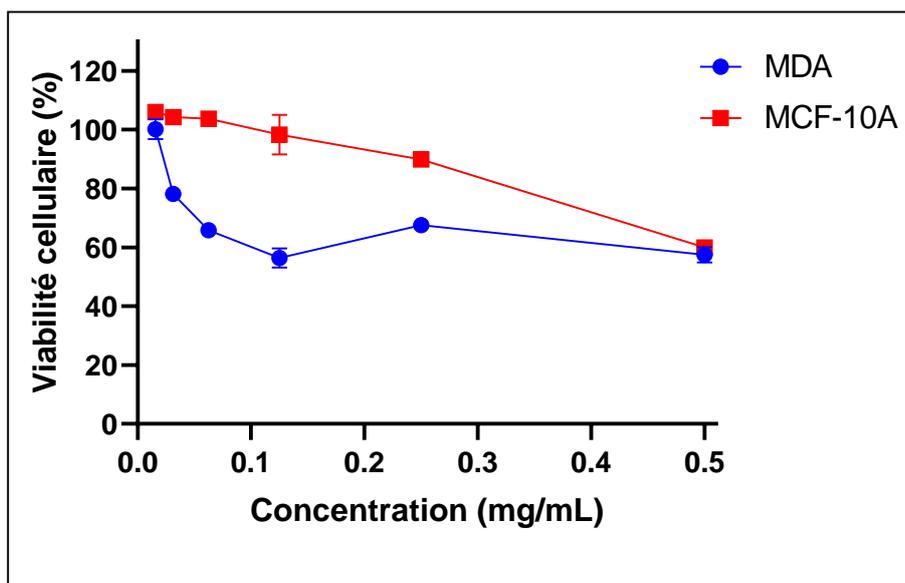
Parmi lesquels, Ranjitkar *et al.* (2021) qui ont indiqué que le carvacrol présente une faible cytotoxicité avec une CI50 de 100 µg/mL envers des lignées cellulaires cancéreuses immortelles (Hela) et normales issues de fibroblastes de la peau.

Le carvacrol induit cette cytotoxicité en provoquant un phénomène d'apoptose et des changements morphologiques au niveau de la membrane plasmique (mouvements de bascule de la phosphatidylsérine de la membrane interne à la membrane externe de la membrane plasmique (Koparal et Zeytinoglu, 2003 ; Arunasree, 2010). La molécule provoque aussi une perméation de la membrane mitochondriale cellulaire (Al-Fatlawi *et al.*, 2014 ; Parrish *et al.*, 2013) à cause de l'activation de l'enzyme P53 et de son interaction avec la famille des gènes Bcl2. (Basu *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2014).

Amara *et al.* (2022) ont même documenté un effet protecteur du carvacrol contre le stress oxydatif induit par le phtalate de di (2-éthylhexyle) (DEHP) dans des cellules rénales embryonnaires humaines (cellules HEK-293). La molécule a même significativement augmenté la viabilité cellulaire et a également diminué la fragmentation de l'ADN des lignées cellulaires testées.

### II.2.2. Evaluation de la toxicité *in situ* de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'activité cytotoxique de l'HE du *C. nardus* a été évaluée contre deux lignées cellulaires en employant le test MTT. La première lignée d'origine tumorale issue d'un adénocarcinome humain (MDA) et la deuxième lignée non tumorale normale issue de cellules épithéliales de sein humain (MCF10A). L'effet cytotoxique de l'HE a été testé manière dose-dépendante pendant 24 h comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes (page 43). Les résultats ont indiqué que l'HE du *C. nardus* présente une CI50 de  $0,56 \pm 0,009$  mg/mL vis-à-vis de la lignée cellulaire MDA. En revanche, l'HE a exprimé une CI50 de  $0,63 \pm 0,00$  mg/mL vis-à-vis de la lignée cellulaire MCF10A. (Figure 43).



**Figure 43 :** Evaluation de l'action cytotoxique de l'HE du *C. nardus* en fonction de sa concentration (mg/mL). MDA, Lignée tumorale issue d'un adénocarcinome humain MCF-10A, Lignée non tumorale normale issue de cellules épithéliales de sein humain. Viabilité cellulaire exprimée en pourcentage (%)

La présente expérience a établi que l'HE du *C. nardus* présente une cytotoxicité modérée envers les deux lignées cellulaires testées (Sylvestre *et al.*, 2006). Nos résultats sont en accord avec la totalité des travaux qui portent sur l'évaluation de la cytotoxicité de l'HE du *C. nardus* pour tous les chémotypes et envers toutes les lignées cellulaires testées (Cunha *et al.*, 2020 ; Prado *et al.*, 2024 ; De Toledo *et al.*, 2016; Sujatha et Sirisha, 2019)

A titre d'exemple, Bayala *et al.* (2020) ont investigué les propriétés cytotoxiques de l'HE du *C. nardus* à chémotype citronellal envers deux lignées cellulaires cancéreuses. Ces dernières sont issues d'un adénocarcinome humain de la prostate (LNCAP) et de la région cervicale humaine (Hela). Les auteurs ont indiqué que l'HE a présenté des valeurs de CI50 de 58,0 µg/mL et de 142µg/mL pour les lignées cellulaires LNCAP et Hela, respectivement.

De manière plus générale, Kpoviessi *et al.* (2014) ont évalué la cytotoxicité de quatre HEs du genre *Cymbopogon* comprenant celle du *C. giganteus*, du *C. schoenanthus*, du *C. nardus* et du *C. citratus* envers des lignées cellulaires ovariennes (CHO) et celles de fibroblaste humains (WI38). Parmi les HEs testées celle du *C. nardus* est la moins cytotoxique parmi les quatre HEs testées et de même pour ses composés majoritaires le citronellal et le citronellool.

A l'opposé, l'HE du *C. citratus* présente une cytotoxicité relativement élevée, qui est sûrement due à la présence du néral et du géranial. Cette constatation est confirmée par Koba *et al.* (2009), qui ont établi que le citronellal présente une faible cytotoxicité (300 µL/mL) par

rapport à celle du néral (100 µL/mL) et du géranial (250 µL/mL) envers les lignées cellulaires de kératinocytes HaCat.

L'action cytotoxique du citronellal et du citronellol envers les lignées cellulaires MDA se fait grâce à l'activation de l'enzyme P53 et de son interaction avec les protéines Bax (Yathsoeung Ho *et al.*, 2020). Le citronellal induit aussi une cytotoxicité envers les lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire humain (Hein7) (Maßberg *et al.*, 2015) en augmentant les niveaux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires. Sachant que la mobilisation et l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> cellulaire dans ce contexte se font grâce à l'activation d'une de signalisation dépendante de l'AMP cyclique (Enfissi *et al.*, 2004 ; Gaspers et Thomas, 2005).

En ce qui concerne le géranol, l'évaluation de sa cytotoxicité envers la lignée cellulaire d'un adénocarcinome de l'endomètre (Ishikawa) a indiqué une valeur de CI50 de 263,027 µM, ce qui indique une faible cytotoxicité (Kuzu *et al.*, 2021). La molécule induirait cette cytotoxicité en provoquant l'arrêt de la croissance des lignées cellulaires à l'interphase G0/G1 du cycle cellulaire et en affectant la synthèse de l'ADN cellulaire (Crespo *et al.*, 2020).

### **Partie III. Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus***

#### **III.1. Evaluation de l'effet antioxydant des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus***

##### **III.1.1. Potentiel antioxydant de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris***

Le pouvoir antioxydant de l'HE du *T. vulgaris* a été évaluée en utilisant les tests DPPH et ABTS et exprimés en CI50. Cette dernière exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de l'oxydant de 50 %. La CI50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé ou d'une HE, c'est-à-dire que plus cette valeur est basse plus l'action antioxydante est importante.

Pour le test DPPH, l'HE du *T. vulgaris* a pu ramener le radical libre stable 2,2- diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH) violet en diphényl-picrylhydrazine jaune avec une valeur de CI50 de 10,4 ± 0,2 µg /mL. Cependant, l'activité antioxydante de l'HE reste inférieure (p=0,63) à celle de la substance de référence (vitamine C), qui présente une valeur de CI50 de 3,15 µg ± 0,87 µg/mL (Figure 44).

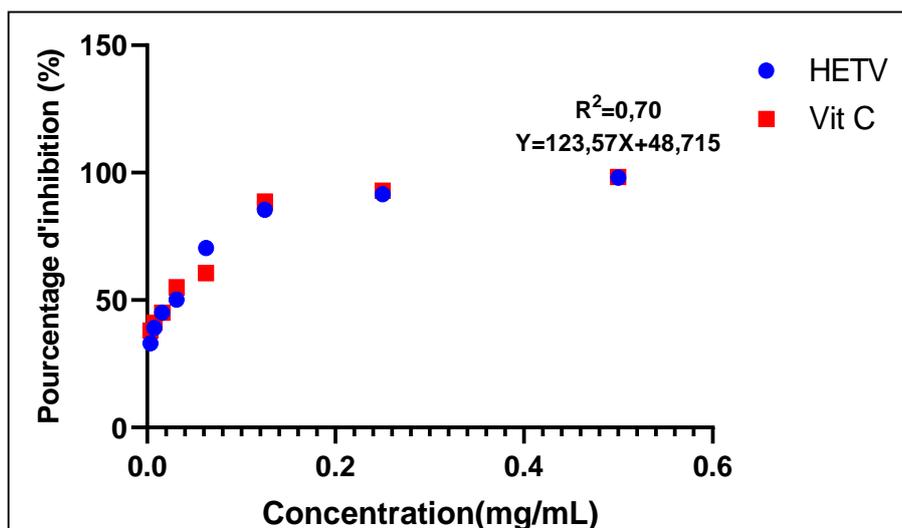


Figure 44 : Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'HE du *T. vulgaris* sur le radical DPPH. HETV : Huile essentielle du *Thymus vulgaris*. Vit C : Vitamine C.

Pour le test ABTS, L'HE du *T. vulgaris* est parvenue à transformer le radical cationique ABTS •+(L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) de coloration verte bleue en sa forme réduite non-radicalaire ABTS qui est incolore avec une CI50 de  $8,78 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ . Néanmoins, l'effet antioxydant de l'HE reste inférieur à celui de la substance de référence (vitamine C), qui présente une valeur de CI50 de  $2,84 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,84$ ) (Figure 45).

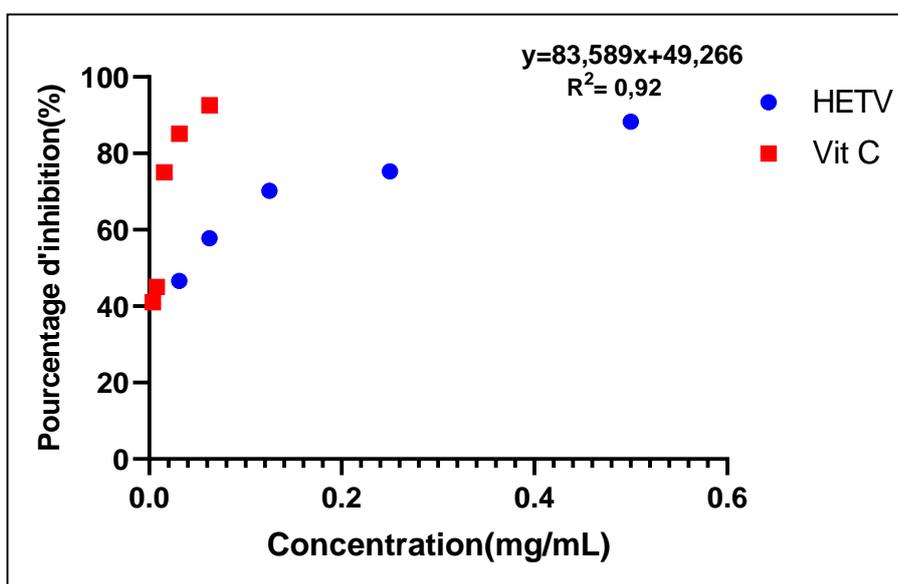


Figure 45 : Cinétique de l'activité antioxydante de l'HE du *T. vulgaris* sur le radical ABTS. HETV : Huile essentielle du *Thymus vulgaris*. Vit C : Vitamine C.

La présente expérience a établi la puissante action antioxydante de l'HE du *T. vulgaris* dont la teneur en carvacrol est de 68,20 % en utilisant les deux tests DPPH et ABTS. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Dash *et al.* (2021) et Elsaraf *et al.* (2020) qui ont investigué l'activité antioxydante par test DPPH de deux HEs du *T. vulgaris* dont la teneur en carvacrol est de 45,55 % et 59,29 %, respectivement. Les deux études ont exposé des valeurs de CI50 très faibles avec 1,71 µg/mL et 23,64 µg/mL, respectivement.

Cette variation s'explique soit par les conditions d'expériences ou par la différence des composés secondaires présents dans la composition chimique. Parmi ces composés secondaires, le thymol et sa teneur dans la composition chimique de l'HE influencent son action antioxydante. Du fait que la molécule exerce un effet synergique avec le carvacrol dans l'amélioration du potentiel antioxydant des HEs (Gavaric *et al.*, 2015).

D'autre part, d'innombrables travaux documentent l'effet antioxydant des HEs de l'espèce *T. vulgaris* avec le test ABTS (Lemos *et al.*, 2017 ; Aljabeili *et al.*, 2018 ; Punya *et al.*, 2019). Pourtant, à notre connaissance, aucune d'entre elles ne porte sur des HEs à chémotype carvacrol. En revanche, il en existe sur des espèces voisines à celle du *T. vulgaris*.

A titre d'exemple, Ballester *et al.* (2017) ont évalué l'activité antioxydante par test ABTS d'une HE appartenant à l'espèce *Thymus capitatus*. Cette dernière est caractérisée par une teneur en carvacrol atteignant les 69,83 %. Les résultats ont exposé une valeur de CI50 de 1,41 mg/mL pour l'HE testée. La valeur trouvée est largement supérieure à celle de notre HE. Ce qui pourrait s'expliquer par la différence de composés secondaires entre les deux HEs ou par leurs teneurs.

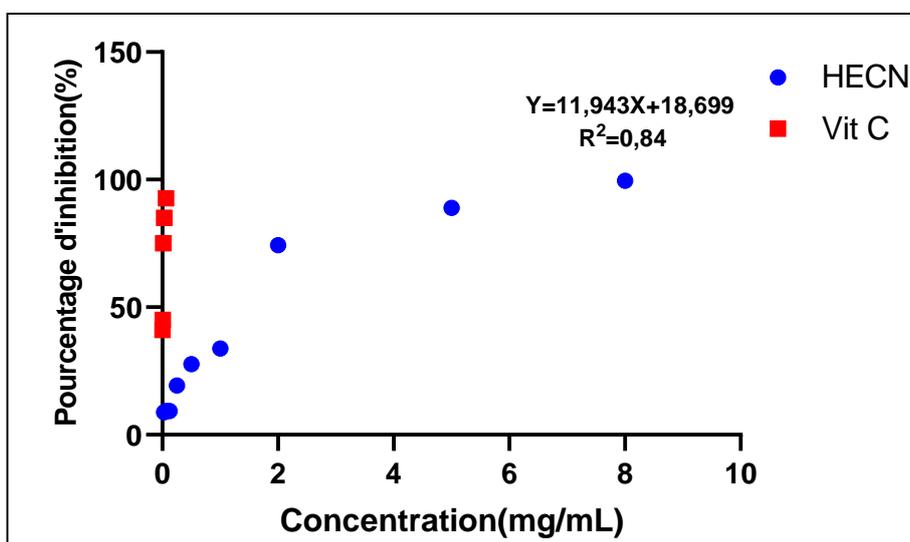
Le pouvoir antiradicalaire de l'HE du *T. vulgaris* est légèrement supérieur pour le test ABTS par rapport à celui du test DPPH. Cette différence tiendrait soit dans la nature même des réactions chimiques mises en jeu ou dans la vitesse de celle-ci. Ce dernier point concerne spécifiquement les composés phénoliques (le carvacrol et le thymol) qui réagissent avec les radicaux DPPH en réalisant un transfert d'électrons rapide, mais qui reste plus lent que celui avec l'ABTS<sup>•+</sup>. Cela en raison de la difficulté d'accès de ces composés au site du radical de la molécule de DPPH. (Chroho *et al.*, 2024 ; İlhami Gulcin *et al.*, 2023).

Le puissant pouvoir antioxydant de l'HE du *T. vulgaris* est attribué à la présence des deux composés phénoliques qui sont le carvacrol et le thymol. Ces derniers sont reconnus pour être les principaux éléments antioxydants des HEs du *T. vulgaris*. A la différence du p-cymène, du linalool et du  $\gamma$ -Terpinène qui ne possèdent pas du tout d'effet antioxydant (Al-Mansori *et al.*, 2020 ; Lemos *et al.*, 2017).

Le carvacrol est connu pour être un puissant capteur de radicaux libres dû à son système d'électrons délocalisés. Ce dernier est mis en place grâce aux groupements fonctionnels (hydroxyle, méthyle et isopropyle) du carvacrol. Ce système sert de donneurs d'hydrogène ou d'électrons permettant la transformation du radical DPPH• vers sa forme réduite DPPHH et du radical ABTS•+ en ABTS (Brewer, 2011).

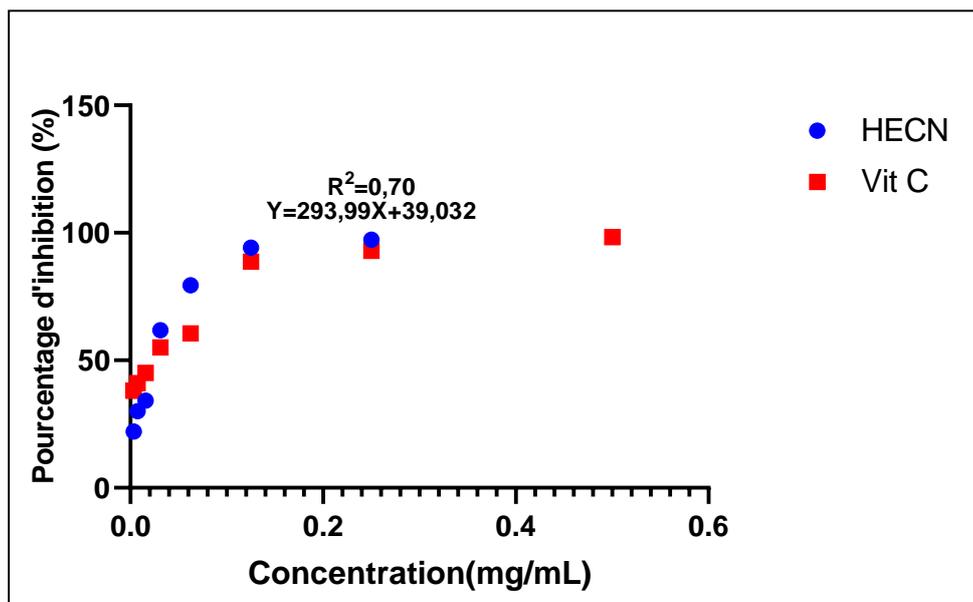
### III.1.2. Potentiel antioxydant de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'activité antioxydante de l'HE du *C. nardus* évaluée par le test DPPH et ABTS, est exprimée en CI50. Pour le test DPPH, l'HE du *C. nardus* a pu ramener le radical libre stable 2,2- diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH) violet en diphényl- picrylhydrazine jaune avec une valeur de CI50 de  $2,62 \pm 0,03$  mg/mL. Toutefois, l'activité antioxydante de l'HE est très significativement inférieure ( $p=0,0057$ ) à celle de la substance de référence (vitamine C), qui exhibe une CI50 de  $3,15 \pm 0,87$  µg/mL (Figure 46).



**Figure 46 :** Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'HE du *C. nardus* sur le radical DPPH. HECN, Huile essentielle du *Cymbopogon nardus* ; Vit C, Vitamine C

Pour le test ABTS, l'HE du *C. nardus* est parvenue à transformer le radical cationique ABTS •+(L'acide2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) de coloration verte bleue en sa forme réduite non radicalaire ABTS qui est incolore avec une CI50 de  $37,3 \pm 1,25$  µg /mL. Cependant, l'activité antioxydante de l'HE est inférieure ( $p=0,43$ ) à celle de la substance de référence (vitamine C), qui présente une valeur de CI50 de  $2,84 \pm 0,75$  µg /mL (Figure 47).



**Figure 47 : Cinétique d’activité antiradicalaire de l’HE du *C. nardus* sur le radical ABTS**  
HECN, Huile essentielle du *Cymbopogon nardus*. Vit C, Vitamine C.

La présente expérience a établi l’effet antioxydant modéré de l’HE du *C. nardus* pour les deux tests DPPH et ABTS. Ces résultats concordent avec un certain nombre de travaux et divergent avec d’autres.

A titre d’exemple, Bayala *et al.* (2020), ont testé l’effet antioxydant d’une HE du *C. nardus* dont le citronellal (33,06 %) et le géraniol (28,40 %) sont les composés majoritaires. Les auteurs ont exposé des valeurs de CI50 de 1,02 mg/mL et 2,25 µg/mL pour les deux tests DPPH et ABTS, respectivement. Les résultats obtenus pour l’HE sont largement inférieurs aux nôtres

A l’opposé, Clain *et al.* (2018) ont évalué l’activité antioxydante de l’HE étudiée avec le test ABTS. Les résultats ont exposé une CI50 de 204 µg/mL, cette valeur est largement supérieure à la valeur exposée pour notre HE. Cette variation du potentiel antioxydant entre les HEs pourrait être liée à la différence de la composition chimique ou aux conditions expérimentales.

Le pouvoir antiradicalaire de l’HE du *C. nardus* est largement supérieur pour le test ABTS en comparaison à celui du test DPPH. Cette différence de résultats est liée à la nature des tests employés. En effet, le test ABTS est plus sensible pour identifier l’activité antioxydante des HEs en raison de la cinétique de sa réaction qui est plus rapide, et sa réponse aux antioxydants qui est plus élevée (Lee *et al.*, 2015).

L’HE du *C. nardus* présente une action antioxydante modérée, qui peut s’expliquer par l’absence de composés phénoliques (carvacrol et thymol). Cela dit, le pouvoir antioxydant qui a été constaté pour l’HE est attribué à son pourcentage élevé en monoterpènes et en sesquiterpènes oxygénés (82,40 %).

Des investigations antérieures menées sur des HEs du *C. nardus* suggèrent que c'est le citronellal, principal composé oxygéné de l'HE qui est responsable de son action antiradicalaire (Quintans-Júnior *et al.*, 2011 ; Miladi *et al.*, 2013 ; Lu *et al.*, 2014). Pourtant, Rastuti *et al.* (2020) contredisent cette affirmation en révélant que le citronellal et le citronellol ne possèdent qu'un très négligeable effet antioxydant. Par contre, le géraniole présente un potentiel antioxydant important et serait responsable de l'effet antiradicalaire de l'HE du *C. nardus*. La molécule exerce son effet antioxydant grâce à l'atome d'hydrogène allylique proche du groupement OH (en position C1) dans sa structure.

### III.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

#### III.2.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

##### III.2.1.1. Test de diffusion sur disque

L'évaluation de l'action antibactérienne de la phase liquide de l'HE du *T. vulgaris* s'est faite par le test de diffusion sur disque, contre dix souches bactériennes. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 18 et la Figure 48. L'antibiogramme des souches bactériennes testées est présenté dans l'Annexe V.

L'HE étudiée a montré un effet dose-dépendant (10, 20 et 30  $\mu$ L) illustré par l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition (DZI). Les cinq souches bactériennes à Gram-positif (4 souches référencées et la souche isolée) testées sont fortement sensibles à l'action de l'HE du *T. vulgaris*. La souche *S. aureus* est la plus sensible à l'effet de l'HE avec un DZI=85 mm aux trois volumes testés (10, 20 et 30  $\mu$ L). En revanche, la souche SARM est la moins sensible à l'action de l'HE du *T. vulgaris* avec un DZI qui varie de 48 à 55 mm.

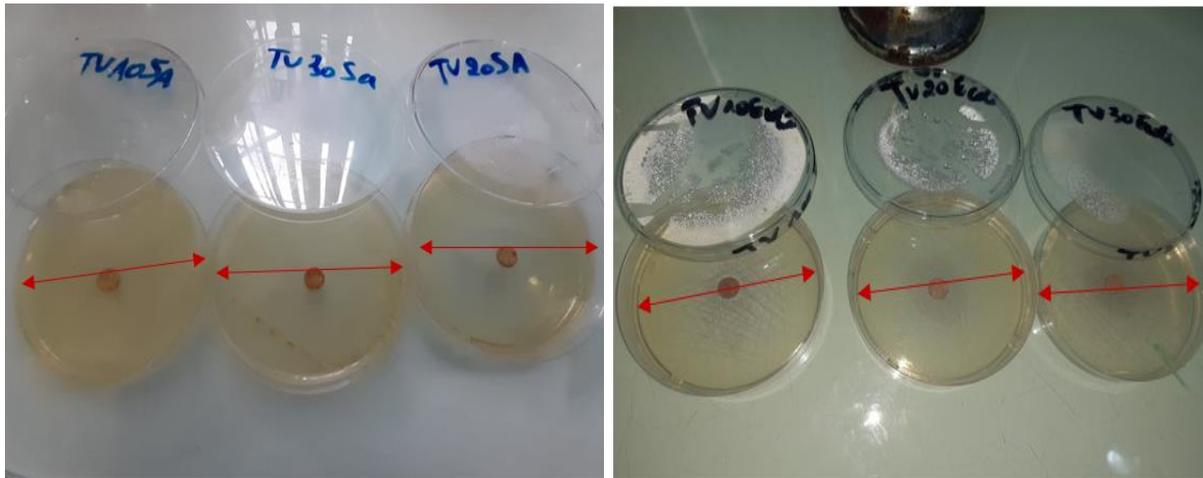
Les cinq souches bactériennes à Gram-négatif sont fortement sensibles à l'effet de l'HE. Même si, les deux souches *E. coli* et *S. typhimurium* sont les plus sensibles à l'action de l'HE et sont totalement inhibées (DZI=85 mm) aux trois volumes testés (10, 20 et 30  $\mu$ L). Alors que la souche *P. aeruginosa* 1 est la moins sensible à l'action de l'HE du *T. vulgaris* avec un DZI variant de 19 mm jusqu'à 40 mm dépendant du volume d'HE testé.

Par ailleurs, les 10 souches bactériennes sont nettement plus sensibles à l'action de l'HE du *T. vulgaris* qu'à celle du contrôle positif (solution de chloramphénicol à 1 %). Ainsi, l'HE étudiée présente un effet antibactérien significativement ( $p < 0,0001$ ) supérieur à celui du contrôle positif.

**Tableau 18 : Effet Antibactérien de l'HE du *T. vulgaris* évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur**

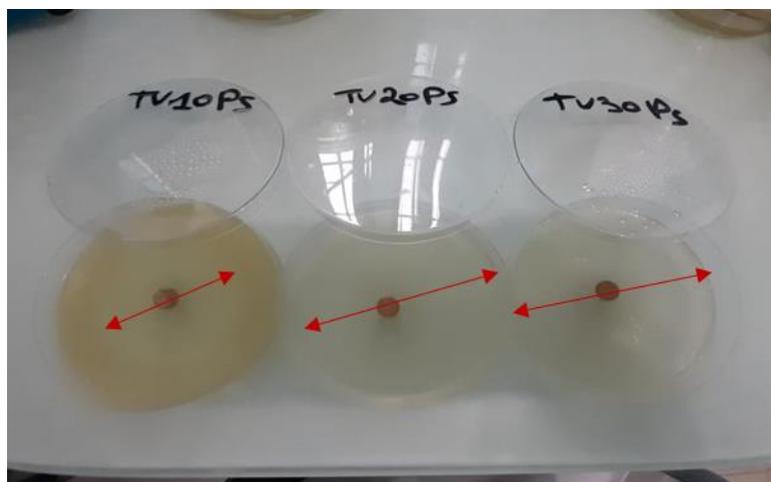
DZI (mm) <sup>a</sup>									
Test de diffusion sur disque			Test de diffusion vapeur			Chloramphénicol <sup>b</sup>			
Volume d'HETV (µL per Disque)									
Espèces bactériennes									
Gram-positif	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>E. faecalis</i> ATCC	50,7±2,9	59,7±3,5	81±6,9	40,7±1,5	43,7±3,8	64,3±10,8	29,3±0,6	31,7±1,5	33,7±1,2
<i>L. innocua</i> ATCC	58,3±10,4	85±0	85±0	43±1	45±2,65	52,3±6,5	38±0	40,7±1,5	41±1
SARM ATCC	48±6,1	52±2,6	55±6,1	46,7±0,6	49,7±1,5	51±1,7	34,7±0,6	36,3±1,5	39,7±0,6
<i>S. aureus</i> ATCC	85±0	85±0	85±0	49±4,3	55,7±15,9	59,7±10	30±0	33,3±1,6	40,3±1,5
<i>S. aureus</i> (1)	56,7±5,8	85±0	85±0	30±4	39,3±0,6	42,3±1,5	32,7±2,9	36,7±2	36,7±4,2
Gram-négatif									
<i>E. coli</i> ATCC	85±0	85±0	85±0	52,3±7,2	85±0	85±0	41,3±0,6	48±1,7	50±0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	62±4	76,7±7,6	83±3,5	49,3±0,6	52±2,7	53,3±6,7	40,3±4,6	43,3±1,6	45,3±0,6
<i>S. typhimurium</i> ATCC	85±0	85±0	85±0	43,7±5,5	49,7±5	55,7±4,2	31±1,7	34±2,7	35,3±0,6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	57±2,6	81±6,9	85±0	54,3±4,5	56,7±5,5	60,7±3,2	29±3,5	32,7±2,31	34,7±0,6
<i>P. aeruginosa</i> (1)	19±3,5	21±7,8	40±0	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-

HETV : huile essentielle du *Thymus vulgaris*. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart type (n= 3). <sup>a</sup> Le DZI (diamètre de la zone d'inhibition) en mm comprend le diamètre du disque (9 mm), <sup>b</sup> La solution de chloramphénicol (1%) sert de control positif. <sup>c</sup> (-) aucune zone d'inhibition.



*Salmonella typhimurium* ATCC

*Escherichia coli* ATCC



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC

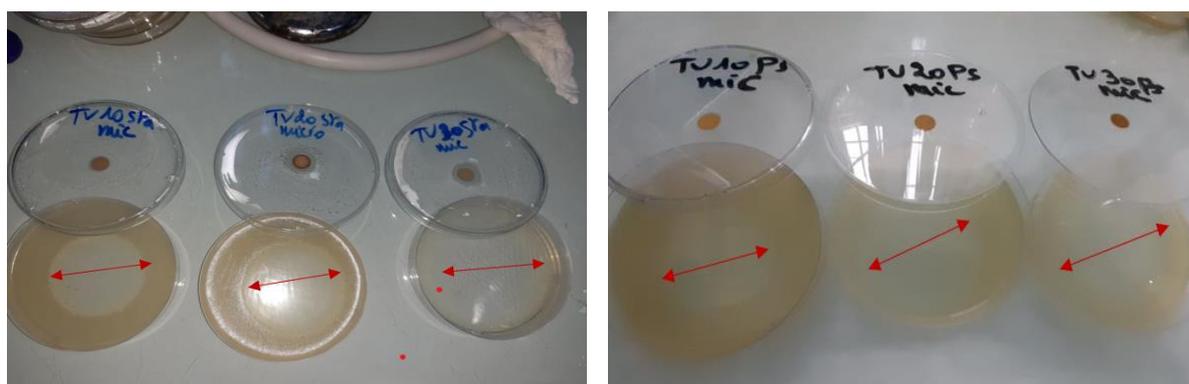
**Figure 48 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *T. vulgaris* envers les espèces bactériennes par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30  $\mu$ L/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ)**

### III.2.1.2. Test de diffusion vapeur

L'effet antibactérien de la phase volatile de l'HE du *T. vulgaris* est évalué avec le test de diffusion vapeur. Ce test s'est fait envers les mêmes souches que celles testées pour le test diffusion sur disque. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 18 et la Figure 49.

Les résultats ont exposé une corrélation entre le volume d'HE testé et l'effet antibactérien illustré par l'augmentation du DZI. La phase vapeur de l'HE du *T. vulgaris* a exhibé un effet antibactérien autant envers les souches à Gram-positif que celles à Gram-négatif. Néanmoins, la souche *E. coli* est la plus sensible à l'action de l'HE avec un DZI allant de 52 mm à 85 mm proportionnellement au volume d'HE testé. A l'opposé, la souche de *P. aeruginosa* (1) est

complètement résistante à l'action de l'HE avec DZI = 0 mm indépendamment du volume testé.



*Staphylococcus aureus* ATCC

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC

**Figure 49 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *T. vulgaris* contre les espèces bactériennes par test de diffusion vapeur en utilisant trois volumes d'HE différents (10, 20 et 30 µL/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ).**

### III.2.1.3. Détermination des CMI

L'évaluation de la CMI de l'HE du *T. vulgaris* a été réalisée avec la méthode de macrodilution sur gélose envers les dix souches bactériennes testées. Les valeurs des CMI de l'HE exprimées en % (v/v) sont représentées dans le Tableau 19. Les résultats ont exposé des valeurs de CMI de l'HE qui varient entre 0,25 et 0,03 % (v/v), avec la valeur la plus élevée (0,25 %) envers la souche *P. aeruginosa* (1). Tandis que l'HE a exhibé une CMI de 0,0625 % (v/v) envers la souche *E. coli* et une valeur de 0,0313 % (v/v) vis-à-vis des 8 espèces bactériennes restantes.

**Tableau 19 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du *T. vulgaris* envers des souches de bactéries**

Espèces bactériennes	CMI % (v/v)
<b>Bactéries à Gram-positif</b>	
<i>E. faecalis</i> ATCC	0,0313
<i>L. innocua</i> ATCC	0,0313
SARM ATCC	0,0313
<i>S. aureus</i> ATCC	0,0313
<i>S. aureus</i> (1)	0,0313
<b>Bactéries à Gram-négatif</b>	
<i>E. coli</i> ATCC	0,0625
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	0,0313
<i>S. typhimurium</i> ATCC	0,0313
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0,0313
<i>P. aeruginosa</i> (1)	0,25

Les phases liquide et vapeur de l'HE du *T. vulgaris* présentent un puissant effet antibactérien contre les souches à Gram-positif et négatif. Nos résultats sont corroborés par d'innombrables investigations menées précédemment sur des HEs de *T. vulgaris* de diverses origines ( **Aljabeili et al., 2018 ; Sienkiewicz et al., 2011 ; Hattabi et al., 2016, Rota et al., 2008 ; Borugă et al., 2014**).

Plus récemment, Dash *et al.* (2021) ont souligné le puissant l'effet antibactérien d'une HE du *T. vulgaris* avec le carvacrol (45,53%) comme composé prédominant. Cet effet antibactérien s'est illustré à travers l'action de l'HE contre neuf bactéries pathogènes d'origine alimentaire avec un DZI atteignant 28 mm.

Les résultats du test de diffusion sur disque sont légèrement supérieurs à ceux du test de diffusion vapeur ( $p > 0,05$ ). Cette information est contredite par un certain nombre de données de la littérature qui attestent de supériorité de l'action antibactérienne de la phase vapeur. Cette dernière permet une fixation libre de l'HE au microorganisme, tandis que les composés hydrophobes de la phase aqueuse s'associent pour créer des micelles. Ces dernières retiennent les molécules bioactives et restreignent par conséquent la liaison au microorganisme (**Antih et al., 2021 ; Inouye et al., 2001**).

L'effet antibactérien de L'HE étudiée se fait de manière indifférenciée sur les deux classes de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif. Cela est probablement dû au carvacrol, composé majoritaire de l'HE du *T. vulgaris*. La molécule grâce à sa structure chimique est capable de

désintégrer la structure des membranes externes des deux classes de bactéries. (Reyes-Jurado *et al.*, 2019).

Sachant que les bactéries à Gram-négatif sont réputées pour être plus résistantes aux HEs que les bactéries à Gram positif (Smith-Palmer *et al.*, 1998 ; Mann *et al.*, 2000). Cette différence tient au fait que les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe rigide, riche en lipopolysaccharide (LPS) et donc plus complexes (Reyes-Jurado *et al.*, 2019). Cette membrane externe est absente chez les bactéries à Gram positif qui sont plutôt entourées d'une paroi épaisse de peptidoglycane avec des extrémités lipophiles due à l'acide lipotéichoïque (Silhavy *et al.*, 2010 ; Hyldgaard *et al.*, 2012 ; Chouhan *et al.*, 2017).

Le potentiel antibactérien des HEs dépend assurément de leurs compositions chimiques et plus spécifiquement de la présence des monoterpènes oxygénés. Ces derniers sont réputés pour leur puissant pouvoir antibactérien, qui est bien plus important que celui des monoterpènes hydrocarbonés qui n'en possèdent presque pas (Kalemba et Kunicka, 2003). Par conséquent l'action antibactérienne de l'HE du *T. vulgaris* est logiquement attribuée à son composé oxygéné principal qui est le carvacrol.

Le carvacrol exerce son effet antibactérien en agissant principalement sur la fluidité et la perméabilité de la membrane des bactéries (Helander *et al.*, 1998). La nature hydrophobe du carvacrol lui permet d'intégrer la membrane cellulaire bactérienne (Khan *et al.*, 2017 ; Ben Arfa *et al.*, 2006) provoquant ainsi une perméabilité accrue d'ATP et une libération accrue d'autres composants cellulaires (Helander *et al.*, 1998 ; Walsh *et al.*, 2003).

Le carvacrol peut fonctionner aussi grâce à sa fonction hydroxyle (OH) comme un transporteur transmembranaire de cations monovalents à travers la membrane, transportant le H<sup>+</sup> à l'intérieur du cytoplasme cellulaire et le K<sup>+</sup> vers l'extérieur (Ultee *et al.*, 2002 ; Ben Arfa *et al.*, 2006). La molécule peut aussi affecter le repliement des protéines bactériennes à travers la production de quantités importantes d'HSP60 (protéines de choc thermique) (Burt *et al.*, 2007).

### III.2.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

#### III.2.2.1. Test de diffusion sur disque

Le potentiel antibactérien de la phase liquide de l'HE du *C. nardus* a été évaluée avec le test de diffusion sur disque envers dix souches bactériennes référencées et isolées. Les résultats sont représentés dans le Tableau 20 et la Figure 50. Les deux classes de bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont fortement sensibles à l'action de l'HE du *C. nardus*. En outre, L'HE exerce un effet antibactérien dose dépendant illustré par l'augmentation du DZI.

## RESULTATS ET DISCUSSION

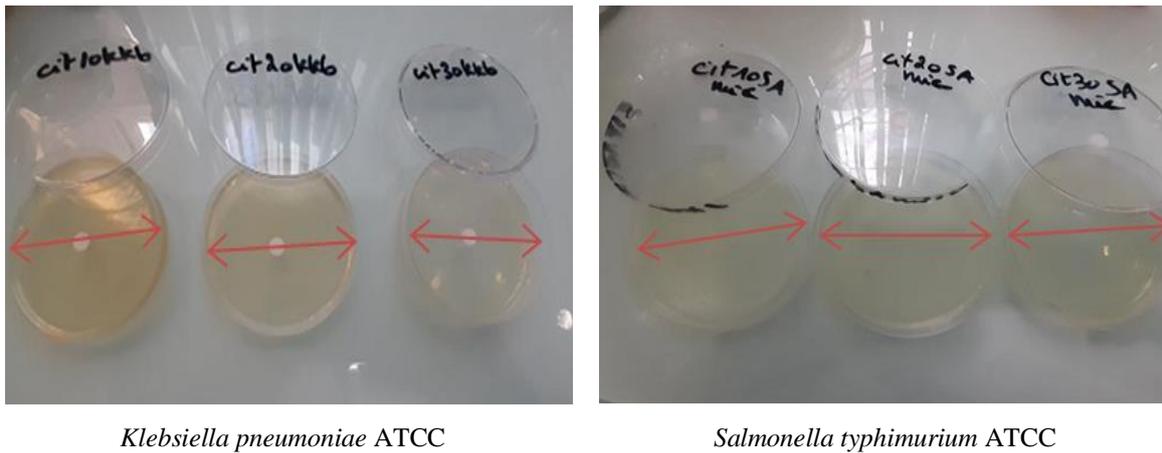
L'HE du *C. nardus* a induit l'inhibition complète (DIZ=85mm) des 4 souches : SARM, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* aux trois volumes d'HE testés (10, 20 et 30 µL). A l'opposé, l'HE a exhibé une faible action antibactérienne envers les deux souches d'origine alimentaire : *P. aeruginosa* (1) et *S. aureus* (1) avec des DZI de 22 à 24 mm et de 30 à 36 mm, respectivement. Par ailleurs, l'effet antibactérien de l'HE du *C. nardus* est significativement supérieur ( $p < 0,0001$ ) à celui du contrôle positif (solution de chloramphénicol à 1 %).

**Tableau 20 : Effet Antibactérien de l'HE du *C. nardus* évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur**

DZI (mm) <sup>a</sup>									
	Test de diffusion sur disques			Test de diffusion vapeur			Chloramphénicol <sup>b</sup>		
Volume d'HECN (µL per Disque)									
Espèces bactériennes									
Gram-positif	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>E. faecalis</i> ATCC	52±7	81±6,9	85±0	40,7±4,5	43,7±0,6	64,3±6,6	29,3±0,6	31,7±1,5	33,7±1,2
<i>L. innocua</i> ATCC	71,3±6,4	77±1	85±0	50,3±2,3	50,3±8	73,3±0,6	30±0	40,7±1,5	41±1
SARM ATCC	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	34,7±0,6	36,3±1,5	39,7±0,6
<i>S. aureus</i> ATCC	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	30±0	33,3	40,3±1,5
<i>S. aureus</i> (1)	30±6,9	32,7±2,3	36±0	30±2,3	63,3±1,2	66,7±0	32,7±2,9	36,7±1,6	36,7±4,2
Gram-négatif									
<i>E. coli</i> ATCC	55,7±4	85±0	85±0	66,3±3,8	85±0	85±0	41.3±0,6	48±2	50±0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	40,3±4,6	43,3±1,7	45,3±0,6
<i>S. typhimurium</i>	85±0	85±0	85±0	80±5	85±0	85±0	31±1,7	34±1,2	35,3±0,6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	63±8,7	85±0	85±0	56,7±8,5	79,7±9,2	85±0	29±3,5	32,7±2,7	34,7±0,6
<i>P. aeruginosa</i> (1)	22±0	22,7±0	24±1,2	-	-	-	-	-	-

HECN : huile essentielle du *Cymbopogon nardus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart type (n= 3).

<sup>a</sup>Le DZI (diamètre de la zone d'inhibition) en mm comprend le diamètre du disque (9 mm), <sup>b</sup> La solution de chloramphénicol (1%) sert de control positif. <sup>c</sup> (-) aucune zone d'inhibition

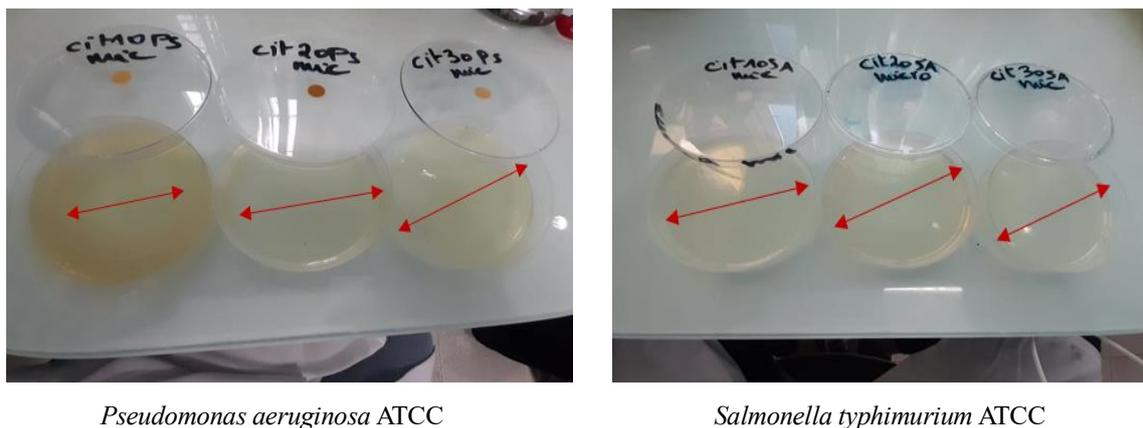


**Figure 50 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *C. nardus* contre les espèces bactériennes par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes différents d'HE (10, 20 et 30  $\mu$ L/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ).**

### III.2.2.2. Test de diffusion vapeur

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la phase vapeur de l'HE du *C. nardus* s'est faite envers dix souches bactériennes en employant le test de diffusion vapeur. Les résultats sont représentés dans le Tableau 20 et la Figure 51.

La fraction volatile de l'HE étudiée a montré un puissant effet antibactérien de manière indistincte sur les deux classes de bactéries : à Gram positif et à Gram-négatif. De surcroît, l'HE du *C. nardus* a induit l'inhibition totale (DIZ=85mm) des trois souches : SARM et *S. aureus* et *K. pneumoniae* même au plus petit volume d'HE testé (10  $\mu$ L). A l'inverse, la souche *P.aeruginosa* (1) est résistante (DZI=0mm) à l'action de l'HE même testée à 30  $\mu$ L.



**Figure 51 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *C. nardus* envers les espèces bactériennes par test de diffusion vapeur en utilisant trois volumes différents d'HE (10, 20 et 30  $\mu$ L/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ).**

**III.2.2.3. Détermination des CMI**

L'évaluation des CMI de l'HE du *C. nardus* s'est faite en employant la méthode de macrodilution sur gélose. Les résultats exprimés en % (v/v) indiquent des valeurs de CMI qui varient de 0,0625 à 0,015 % (v/v).

L'HE a présenté la valeur la plus basse (0,015 %) de CMI vis-à-vis des deux souches bactériennes : *K. pneumoniae* et *P. Aeruginosa*. Alors que l'HE du *C. nardus* a exposé une valeur de CMI de 0,0625 % (v/v) envers les 5 espèces bactériennes à Gram positif et la souche *P. aeruginosa* (1). Enfin, l'HE a exhibé une valeur de CMI de 0,03 % (v/v) envers les deux souches bactériennes restantes (*S. typhimurium* et *E. coli*) (Tableau 21).

**Tableau 21 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du *C. nardus* envers des souches de bactéries**

Espèces bactériennes	CMI % (v/v)
<b>Bactéries à Gram-positif</b>	
<i>E. faecalis</i> ATCC	0,0625
<i>L. innocua</i> ATCC	0,0625
SARM ATCC	0,0625
<i>S. aureus</i> ATCC	0,0625
<i>S. aureus</i> (1)	0,0625
<b>Bactéries à Gram-négatif</b>	
<i>E. coli</i> ATCC	0,0313
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	0,015
<i>S. typhimurium</i> ATCC	0,0313
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0,015
<i>P. aeruginosa</i> (1)	0,0625

La présente expérience a permis d'établir la puissante action antibactérienne de la phase liquide et vapeur de l'HE du *C. nardus* contre les bactéries à Gram positif et négatif. Néanmoins, il existe peu de travaux sur l'effet antibactérien de l'HE du *C. nardus*, parmi lesquels celle de Hammer *et al.* (1999) qui ont exposé le puissant effet antibactérien de l'HE étudiée a une concentration de 2 %. L'HE a été testé contre une série de souches bactériennes d'origine humaine comprenant *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, et *S. aureus*.

Bien plus récemment, Pontes *et al.* (2019) ont investigué l'action antibactérienne de l'HE du *C. nardus* et de ses composés majoritaires : le géraniol (33,88 %), le citronellal (27,55 %) et le citronellol (14,40 %) envers un large panel de souches. Les auteurs ont souligné la puissante action antibactérienne de l'HE étudiée envers la souche *S. aureus* ATCC 6538 avec un DZI

atteignant 41 mm. En revanche, l'effet antibactérien de l'HE est bien plus modéré envers la souche *E. faecalis* ATCC 4083 (DZI=13 mm). L'étude a même souligné l'absence totale d'inhibition de l'HE du *C. nardus* envers les souches *P. aeruginosa* ATCC 115442 et *E. coli* ATCC11303 (DZI=0 mm).

Les résultats du test de diffusion vapeur sont presque comparables à ceux du test de diffusion sur disque ( $p = 0,05$ ). Cependant, l'effet antibactérien de la phase vapeur de l'HE du *C. nardus* n'a fait l'objet d'aucune étude à notre connaissance. Toutefois, Andrade *et al.* (2016) ont investigué l'action antibactérienne de la phase vapeur de l'HE d'une espèce voisine qui est le *Cymbopogon martinii* et de son composé majoritaire le géraniol. L'HE a été testée envers un large panel de souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif référencée et cliniques notamment *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas* et *Klebsiella*. Les résultats obtenus grâce au MEP (microscope électronique à transmission) ont mis en exergue l'efficacité antibactérienne de la phase volatile de l'HE et du géraniol sur la neutralisation des souches bactériennes testées.

L'effet antibactérien de l'HE du *C. nardus* est logiquement attribué à la forte teneur en monoterpènes oxygénés (82,40 %) dont les représentants majeurs sont le citronellal, le géraniol, le citronellol (Guimaraes *et al.*, 2019 ; Naigre *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 2012). D'autres constituants mineurs présents dans l'HE pourraient également être responsables des effets antibactériens observés. De même que la possibilité d'interactions synergiques ou antagonistes entre les constituants d'HEs doivent être prise en considération dans l'action antibactérienne (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

Le citronellal et le géraniol exerceraient leur effet antibactérien grâce à leur interaction avec les constituants de la surface de la cellule bactérienne telle que les protéines membranaires et d'autres molécules vitales à la survie des bactéries. Après la liaison des deux composés à la surface cellulaire, ils formeraient une monocouche autour de la cellule ce qui modifie son potentiel électrostatique et hydrophobe. Cela engendrerait une déstabilisation de l'intégrité membranaire, avec libération de composants cellulaires internes (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

### III.3. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus*

#### III.3.1. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

##### III.3.1.1. Test de diffusion sur disque

Le potentiel antifongique de l'HE du *T. vulgaris* a été évalué par le test de diffusion sur disque contre neuf souches fongiques, dont cinq levures et quatre moisissures (Tableau 22 et Figure 52). L'HE du *T. vulgaris* présente un effet antifongique dose dépendant illustré par une

## RESULTATS ET DISCUSSION

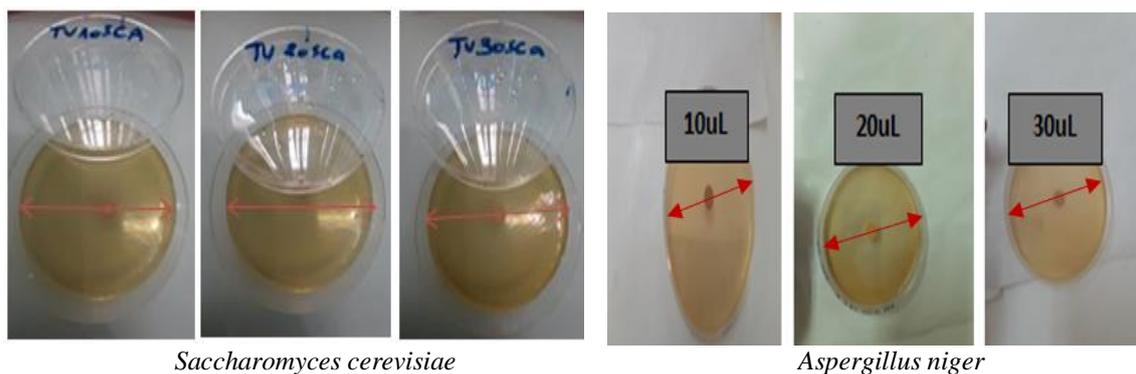
corrélation entre le DZI et le volume testé (10, 20 et 30  $\mu\text{L}$ ). Les neuf souches testées sont fortement sensibles à l'action de l'HE. Toutefois, les 2 souches de levures, *C. albicans* et *S. cerevisiae* (DZI=85 mm), ainsi que les 4 souches de moisissures (100 %) ont été totalement inhibée aux trois volumes d'HE testés (10, 20 et 30  $\mu\text{L}$ ).

L'HE du *T. vulgaris* a exhibé un puissant effet antifongique envers les espèces *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* avec un DZI qui augmente de 40,3 mm jusqu'à 85 mm proportionnellement au volume d'HE testé. Par ailleurs, l'HE du *T. vulgaris* présente un effet antifongique significativement supérieur ( $p < 0,0001$ ) à celui des deux contrôles positifs utilisés (la solution d'Hexamidine® à 0,1 % pour les levures et la solution de nystatine à 1 % pour les moisissures) pour les neuf souches fongiques testées.

**Tableau 22 : Effet Antifongique de l'HE du *T. vulgaris* évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur**

Espèces fongiques	DZI (mm) <sup>a</sup>								
	Test de diffusion sur disque			Test de diffusion vapeur			Contrôle positif <sup>b</sup>		
	Volume d'HETV ( $\mu\text{L}$ per Disque)								
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>C. albicans</i>	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	16 $\pm$ 2,6	17,7 $\pm$ 0,6	18 $\pm$ 0,5
<i>C. parapsilosis</i>	40,3 $\pm$ 1,5	63,3 $\pm$ 2,9	85 $\pm$ 0	46,7 $\pm$ 5,8	53,7 $\pm$ 2,9	74 $\pm$ 9,6	27 $\pm$ 0	33,3 $\pm$ 0,6	37 $\pm$ 1
<i>C. tropicalis</i>	62,7 $\pm$ 0,6	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	52,7 $\pm$ 3,2	64,7 $\pm$ 4,5	71,3 $\pm$ 3,23	33 $\pm$ 1	34 $\pm$ 0	37,4 $\pm$ 1,2
<i>C. glabrata</i>	64 $\pm$ 6	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	53,3 $\pm$ 4	60 $\pm$ 5	70 $\pm$ 5	34,7 $\pm$ 2	38,3 $\pm$ 1,2	45,7 $\pm$ 0,6
<i>S. cerevisiae</i>	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0	33,3 $\pm$ 0,6	35,3 $\pm$ 1	40,7 $\pm$ 0,5
<b>Moisissures</b>									
<i>A. fumigatus</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	20 $\pm$ 1,7	22,4 $\pm$ 0,6	25,9 $\pm$ 4,5
<i>A. niger</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	47,1 $\pm$ 0,6	50,6 $\pm$ 2,7	52,9 $\pm$ 6,4
<i>A. flavus</i>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	36,5 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	41,2 $\pm$ 4,7
<i>Fusarium</i> sp.	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	14,5 $\pm$ 0,6	21,5 $\pm$ 0,6	25,1 $\pm$ 2,5

HETV : huile essentielle du *Thymus vulgaris*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  Ecart type ( $n=3$ ). <sup>a</sup>Le DZI (diamètre de la zone d'inhibition) en mm comprend le diamètre du disque (9 mm). L'inhibition des moisissures par l'HE est exprimée en pourcentage. <sup>b</sup>Les solutions antiseptiques Hexamidine (0,1 %) et nystatine (1 %) sont utilisées comme contrôles positifs pour les espèces de levures et de moisissures respectivement.



**Figure 52 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *T. vulgaris* envers les espèces fongiques par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes différents d'HE (10, 20 et 30 µL/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ).**

### III.3.1.2. Test de diffusion vapeur

L'évaluation de l'effet antifongique de la phase vapeur de l'HE du *T. vulgaris* a été effectuée avec le test de diffusion vapeur envers cinq souches de levures et quatre de moisissures. Les résultats sont présentés dans le Tableau 22.

L'HE du *T. vulgaris* présente un effet antifongique dose dépendant illustré par une corrélation entre le DZI et le volume testés (10, 20 et 30 µL). L'HE a exhibé un effet antifongique très prononcé contre toutes les espèces de levures. Toutefois, l'HE du *T. vulgaris* a complètement inhibé (DZI = 85 mm) les deux espèces *S. cerevisiae* et *C. albicans* aux trois volumes d'HE testés (10, 20 et 30 µL). L'HE a également exhibé un puissant effet antifongique envers les souches *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* avec un DZI qui varie de 46 mm à 74 mm proportionnellement avec le volume d'HE testé (10, 20 et 30 µL). En outre, L'HE du *T. vulgaris* a complètement inhibé (100 %) les quatre souches de moisissures, quel que soit le volume d'HE testé.

### III.3.1.3. Détermination des CMI

L'évaluation des CMI de l'HE du *T. vulgaris* contre les neuf les souches fongiques s'est faite suivant la méthode de macrodilution sur gélose (Tableau 23). L'HE a présenté une valeur de CMI de 0,015 % (v/v) contre les cinq souches de levures testées. En outre, l'HE du *T. vulgaris* a exhibé une valeur de CMI qui varie de 0,0625 à 0,015 % (v/v) pour les 4 souches de moisissures. Sachant que la valeur la plus basse est obtenue envers la souche *A. Fumigatus*, tandis que la valeur la plus élevée est rapportée envers *Fusarium* sp.

**Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du *T. vulgaris* envers des souches de levures et de moisissures**

Espèces fongiques	CMI % (v/v)
<b>Levures</b>	
<i>C. albicans</i>	0,015
<i>C. parapsilosis</i>	0,015
<i>C. tropicalis</i>	0,015
<i>C. glabrata</i>	0,015
<i>S. cerevisiae</i>	0,015
<b>Moisissures</b>	
<i>A. fumigatus</i>	0,015
<i>A. niger</i>	0,0313
<i>A. flavus</i>	0,0313
<i>Fusarium sp.</i>	0,0625

Les phases liquide et vapeur de l'HE du *T. vulgaris* présentent un puissant effet antifongique autant envers les levures que les moisissures. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Pina vaz *et al.* (2004) qui portent sur une HE du *T. vulgaris* riche en carvacrol (70,3 %). L'HE a exhibé une forte action antifongique envers les espèces fongiques *C. tropicalis*, *C. albicans* et *C. glabrata*. Gucwa *et al.* (2018) ont aussi souligné la puissante activité antifongique de l'HE du *T. vulgaris* contre 259 espèces cliniques de *C. albicans* et *C. glabrata*.

A l'opposé, Galovicová *et al.* (2021) ont exposé un effet fongique très modeste d'une l'HE du *T. vulgaris* dominée par le thymol envers les espèces de levures *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata*. La différence avec nos résultats est logiquement attribuée à la différence de composition chimique entre les HEs, mais aussi à la nature et à l'origine des souches fongiques testées.

Dans l'ensemble, le test de diffusion sur disque a exhibé des résultats qui surpassent ceux du test de diffusion vapeur ( $p = 0,01$ ). Même si l'HE du *T. vulgaris* a démontré le même degré d'inhibition contre les souches *C. albicans*, *S. cerevisiae* et les quatre moisissures testées pour les deux tests ( $p > 0,05$ ). Il n'empêche que nos résultats contredisent considérablement les études antérieures montrant que la phase vapeur présente des propriétés antifongiques supérieures à celles de la phase liquide (Inouye *et al.*, 2001 ; Tullio *et al.*, 2007 ; Fisher *et al.*, 2008).

En effet, la phase vapeur permet une adhésion sans restriction des HEs aux micro-organismes (Boukhatem *et al.*, 2014). Parmi ces derniers, les souches de moisissures sont les

plus sensibles aux composés volatils de la phase vapeur des HEs en raison de leur croissance superficielle (Edris *et al.*, 2003).

Les propriétés fongicides de l'HE du *T. vulgaris* sont forcément liées à sa composition chimique et surtout à sa forte teneur en monoterpènes oxygénés. Ces derniers comprennent les composés phénoliques (le carvacrol et le thymol) qui sont réputés pour leur puissante action antifongique (Inouye *et al.*, 2001). En effet, le carvacrol exerce cet effet antifongique grâce à son caractère hydrophobe qui lui est conféré par son squelette hydrocarboné. Ce dernier lui permet de se fixer à la région lipophile de la membrane cellulaire et de la solubiliser. Par ailleurs, le carvacrol peut intégrer la bicouche phospholipidique, ce qui modifie la perméabilité de la membrane plasmique et perturbe l'homéostasie cellulaire. (Yun et Lee, 2017 ; Yan *et al.*, 2020).

Le carvacrol possède un groupement hydrophile (la fonction hydroxyle) qui peut être aussi responsable de son action antifongique. Pour preuve, le p-cymène, qui possède un squelette hydrocarboné identique à celui du carvacrol avec absence du groupement hydroxyle, ne possède pas d'activité antifongique notable (Mota *et al.*, 2012) Le groupement hydroxyle serait à l'origine de la production de radicaux libres durant le processus de phosphorylation oxydative, ce qui provoquerait la mort cellulaire (Kawhena *et al.*, 2021).

Le carvacrol peut aussi inhiber la croissance fongique en interagissant avec l'ergostérol, un stérol membranaire essentiel à la survie de la cellule fongique. Cette interaction conduit à l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol et à l'accumulation cellulaire de son précurseur le lanostérol (Lima *et al.*, 2013 ; Ahmed *et al.*, 2011 ; Khodavand *et al.*, 2018).

### III.3.2. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

#### III.3.2.1. Test de diffusion sur disque

L'évaluation de l'action antifongique de l'HE du *C. nardus* a été réalisé en employant le test de diffusion sur disque envers cinq souches de levures et quatre de moisissures. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 24 et la Figure 53.

L'HE a présenté un effet inhibiteur modéré envers les espèces *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, et *C. glabrata* avec un DZI qui varie de 13,7 à 46,3 mm proportionnellement au volume d'HE testé. En revanche, L'HE a totalement inhibé (DZI=85 mm) les deux souches fongiques *C. albicans* et *S. cerevisiae* à partir du plus petit volume testé (10 µL). Par ailleurs, l'effet antifongique de l'HE du *C. nardus* est significativement supérieur ( $P < 0,0001$ ) à celui des contrôles positifs (solution d'Hexamidine® à 0,1% et nystatine à 1 %). En ce qui concerne les moisissures, l'HE a complètement bloqué la croissance mycélienne (100 %) des quatre souches testées à partir du plus petit volume testé (10 µL).

Tableau 24 : Effet Antifongique de l'HE du *C. nardus* évalué par tests de diffusion sur disque et vapeur

Espèces fongiques	DZI (mm) <sup>a</sup>								
	Test de diffusion sur disques			Test de diffusion vapeur			Contrôle positif <sup>b</sup>		
	Volume d'HECN (µL per disque)								
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<i>C. albicans</i>	18,3±0,5	32,7±0	85±0	85±0	85±0	85±0	16±2,6	17,7±0,6	18±0,5
<i>C. parapsilosis</i>	13,7±3,5	15,7±2,1	22,3±2,5	- <sup>c</sup>	-	34,7±1,5	27±0	33,3±0,6	37±1
<i>C. tropicalis</i>	19,7±0	39,3±4	46,3±6,4	-	13,3±0,5	80±5	33±1	34±0	37,4±1,2
<i>C. glabrata</i>	19,3±1,2	19,7±0,6	31,3±3,2	-	-	-	34,7±2	38,3±1,2	45,7±0,6
<i>S. cerevisiae</i>	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	85±0	33,3±0,6	35,3±1	40,7±0,6
<b>Moisissures</b>									
<i>A.fumigatus</i>	100±0	100±0	100±0	-	38±7	100±0	20±1,7	22,4±0,6	25,9±4,5
<i>A. niger</i>	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	47,1±0,6	50,6±2,7	52,9±6,4
<i>A. flavus</i>	100±0	100±0	100±0	-	-	-	36,47±0	40±0	40±4,7
<i>Fusarium sp.</i>	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	12,3±0,6	18,3±0,6	21,3±2,5

HECN : huile essentielle du *Cymbopogon nardus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart type (n= 3). <sup>a</sup>Le DZI (diamètre de la zone d'inhibition) en mm comprend le diamètre du disque (9 mm). L'inhibition des moisissures par l'HE est exprimée en pourcentage. <sup>b</sup> Les solutions antiseptiques d'Hexamidine (0,1 %) et de nystatine (1 %) sont utilisées comme contrôles positifs pour les espèces de levures et de moisissures respectivement ; <sup>c</sup> (-) aucune zone d'inhibition.

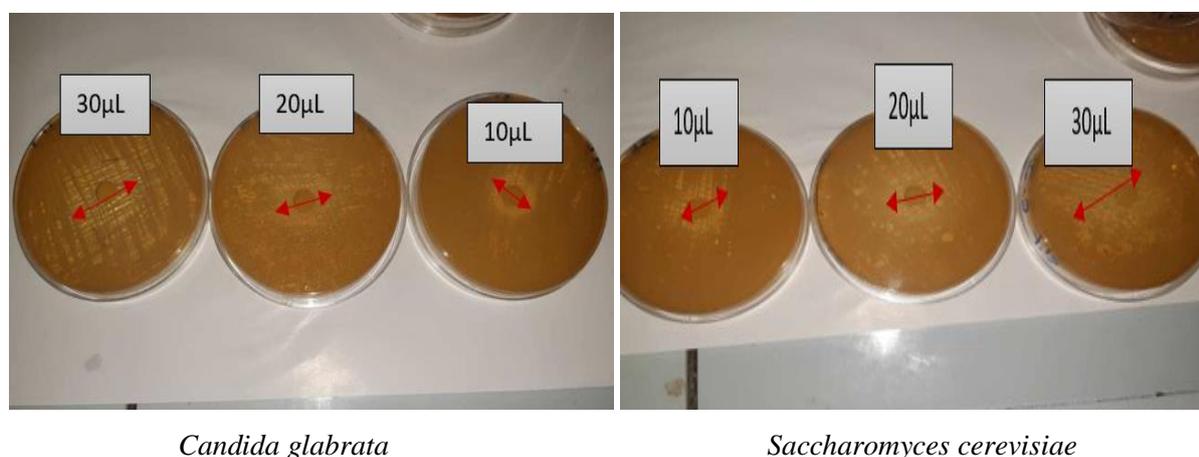


Figure 53 : Activité inhibitrice *in vitro* de l'HE du *C. nardus* envers les espèces fongiques par test de diffusion sur disque en utilisant trois volumes différent d'HE (10, 20 et 30 µL/disque). Les flèches rouges représentent le diamètre de la zone inhibitrice (DIZ).

### III.3.2.2. Test de diffusion vapeur

L'évaluation du potentiel antifongique de la phase vapeur de l'HE du *C. nardus* a été effectuée avec le test de diffusion vapeur envers cinq souches de levures et quatre de moisissures. Les résultats sont présentés dans le Tableau 24.

La phase vapeur de l'HE du *C. nardus* a exprimé un effet antifongique contrasté envers les souches levures testées. L'HE n'a induit aucun antifongique envers la *C. glabrata* (DZI= 0) quel que soit le volume d'HE utilisé. En outre, l'HE à 30 µL a induit une inhibition de la souche *C. parapsilosis* avec un DZI de 34,7 mm. Alors que l'HE testée à 30 µL a inhibé presque complètement (DZI=80 mm) la souche *C. tropicalis*. Contrairement aux deux volumes inférieurs d'HE (10 et 20 µL) qui n'ont pas du tout induit une inhibition de la même souche avec un DZI qui varie de 0 à 13 mm. En revanche, La fraction volatile de l'HE du *C. nardus* a totalement inhibé les deux espèces *C. albicans* et *S. cerevisiae* aux trois volumes testés (10, 20 et 30 µL).

Concernant les moisissures, l'HE du *C. nardus* a inhibé complètement les deux moisissures *A. niger* et *Fusarium* sp aux trois volumes d'HE testés. Alors qu'elle a induit une inhibition qui varie de 0 à 100 % envers l'espèce *A. fumigatus* proportionnellement au volume d'HE testé.

### III.3.2.3. Détermination des CMI

L'évaluation des CMI de l'HE du *C. nardus* a été effectuée suivant la méthode de macrodilution sur gélose. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 25.

L'HE étudié a présenté une valeur de CMI de 0,0625 % (v/v) envers les souches de levures testées à l'exception de la souche *C. glabrata* ou la CMI est de 0,03 % (v/v). Pour ce qui est des moisissures, l'HE du *C. nardus* a exhibé une valeur de CMI qui est supérieure à 0,5 % (v/v) envers les quatre espèces testées.

**Tableau 25 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'HE du *C. nardus* envers des souches de levures et de moisissures**

Espèces fongiques	CMI % (v/v)
<b>Levures</b>	
<i>C. albicans</i>	0,0625
<i>C. parapsilosis</i>	0,0625
<i>C. tropicalis</i>	0,0625
<i>C. glabrata</i>	0,0313
<i>S. cerevisiae</i>	0,0625
<b>Moisissures</b>	
<i>A. fumigatus</i>	>0,5
<i>A. niger</i>	>0,5
<i>A. flavus</i>	>0,5
<i>Fusarium sp.</i>	>0,5

La présente étude a d'établi la puissante activité antifongique de la phase liquide et vapeur de l'HE du *C. nardus* envers une variété de levure et de moisissures. Nos résultats concordent avec ceux de Toledo *et al.* (2016) qui ont exposé un puissant effet antifongique de l'HE vis-à-vis de plusieurs souches de *Candida* de toute origine. Trindade *et al.* (2015) ont aussi exhibé la forte activité antifongique de l'HE du *C. nardus* et de son composé majoritaire le citronellal envers douze souches cliniques de *C. albicans* et de *C. tropicalis*.

Les phase liquide et vapeur de l'HE du *C. nardus* ont présenté une activité antifongique qui est presque identique ( $p = 0,05$ ). Bien que, très peu de travaux documentent l'effet antifongique de la phase vapeur de l'HE du *C. nardus*. Aguiar *et al.* (2014) ont étudié les propriétés antifongiques de la phase vapeur de l'HE du *C. nardus* et de son composé prédominant le citronellal envers trois souches de moisissures, dont une espèce d'*Aspergillus*. Les auteurs ont souligné que la phase vapeur de l'HE étudiée a inhibé complètement la croissance des espèces fongiques.

Le puissant effet fongicide de l'HE du *C. nardus* est logiquement attribué à la présence des monoterpènes oxygénés. Ces derniers sont fortement représentés dans la composition de l'HE du *C. nardus* par le citronellal, le géraniol et le citronellool. En effet, l'activité antifongique de l'HE étudiée n'est pas attribuable au citronellal seul ou à un autre composé uniquement, mais probablement à une forme d'interaction synergique entre les différents composants (De Toledo *et al.*, 2016).

L'HE du *C. nardus* exerce son effet antifongique en agissant comme inhibiteur de la chaîne respiratoire et en provoquant la perte de composants cytoplasmiques, qui affectent la formation et la croissance des cellules fongiques (Murbach Teles Andrade *et al.*, 2014).

Le mode d'action antifongique de l'HE étudiée peut aussi s'exercer en agissant sur l'ergostérol ; le stérol le plus abondant et principal des membranes fongiques. D'ailleurs, Ouyang *et al.* (2021) ont rapporté que le citronellal exerce un effet fongicide envers l'espèce *penicillium digitatum* en ciblant l'ergostérol. Les auteurs ont également exposé que dans les cellules traitées au citronellal, l'intégrité de la membrane et la teneur en ergostérol ont diminué de manière significative.

### **Partie IV. Evaluation de l'effet conservateur des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* contre une souche fongique d'origine alimentaire (*Saccharomyces cerevisiae*) dans un système alimentaire (boisson Orangina®)**

#### **IV.1. Caractérisation de la souche testée**

L'identification de la souche alimentaire utilisée pour la présente expérience a été isolée à partir de selles humaines. Son identification s'est faite en s'appuyant sur les observations en laboratoire avec celle de l'identification moléculaire.

L'observation macroscopique, microscopique et biochimique réalisée au niveau du laboratoire de Mycologie de l'institut Pasteur a conclu que la souche appartient à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. L'identification moléculaire réalisée avec PCR et séquençage de Sanger grâce à l'utilisation des amorces ITS1, ITS4 et EF1 a permis d'obtenir une séquence de 476 Pb. La séquence obtenue a été comparée aux séquences de la base de données GenBank (BLASTn <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). L'alignement des séquences a permis de déduire que la souche identifiée est la *Saccharomyces cerevisiae* isolat NN/BKS/R3 avec un score d'identification supérieur à 97,71 % et un Query cover supérieur à 90 % (Figure 54). Les résultats du séquençage de Sanger de la souche identifiée sont présentés dans l'annexe VII.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate NN/BKS/R3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	749	749	91%	0.0	97.71%	497	<a href="#">MN809217.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain EBT6 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	638	638	72%	0.0	100.00%	345	<a href="#">KC182625.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae culture CBS:435 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	603	603	90%	1e-170	91.59%	625	<a href="#">KY105066.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain JYC558 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	320	320	40%	1e-85	96.86%	730	<a href="#">MN244399.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain JYC2599 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	320	320	40%	1e-85	96.86%	776	<a href="#">MK044078.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain 9066 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RN...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	303	303	40%	1e-80	95.29%	575	<a href="#">ON365720.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain RT50 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	296	296	40%	2e-78	94.39%	386	<a href="#">MN749673.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae isolate E1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	289	289	42%	4e-76	92.54%	482	<a href="#">KM603603.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain B05 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	289	289	42%	4e-76	92.54%	550	<a href="#">MK629653.1</a>
<a href="#">Saccharomyces cerevisiae strain UCDFST:40-231 internal transcribed spacer 1, partial sequence. 5.8S rib...</a>	<a href="#">Saccharomyces...</a>	279	279	42%	2e-73	91.04%	579	<a href="#">MH595355.1</a>

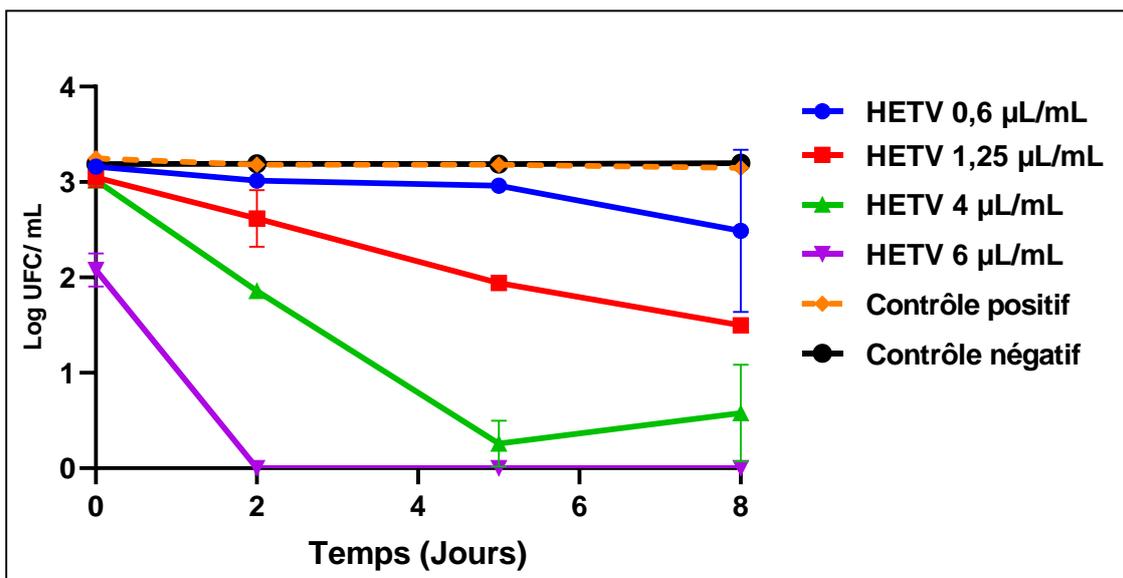
Figure 54 : Liste des dix premiers résultats d'identification de la souche de *Saccharomyces cerevisiae* sur le site NCBI blastn

## IV.2. Evaluation de l'effet conservateur de l'huiles essentielle du *Thymus vulgaris* envers une souche fongique (*Saccharomyces cerevisiae*) dans un système alimentaire (Orangina®)

### IV.2.1. Effet de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

L'évaluation de l'utilisation de l'HE du *T. vulgaris* comme conservateur antifongique alimentaire s'est faite en la testant envers la souche *S. cerevisiae* dans un système alimentaire. Ce dernier est une boisson gazeuse commerciale à base d'agrumes (Orangina®). L'HE du *T. vulgaris* a été testée à quatre concentrations différentes (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6 µL/mL) et en fonction des jours de stockage de la boisson (0, 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour) afin d'établir une cinétique. La boisson Orangina® contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) a servi de contrôle positif. Alors que la boisson Orangina® inoculée avec la souche fongique *S. cerevisiae* seulement a servi de contrôle négatif (Figure 55).

L'HE aux deux concentrations 0,6 et 1,25 µL/mL n'a pas montré d'inhibition considérable de la croissance fongique au cours des huit jours de stockage. Alors que L'HE du *T. vulgaris* à 4 µL/mL a inhibé fortement la croissance de la souche *S. cerevisiae*, mais pas complètement (3 Log UFC/mL à 0,8 Log UFC/mL). En revanche, L'HE à une concentration de 6 µL/mL a montré une réduction de la charge fongique dès le 1<sup>er</sup> jour de stockage (2 Log UFC/mL) comparativement aux autres concentrations de l'HE et aux contrôles positif et négatif. L'HE a même totalement inhibé la croissance de la souche fongique testée au 2<sup>ème</sup> jour de stockage et pendant les 8 jours d'expérience. L'expérience a aussi exposé que les 4 concentrations d'HE testées ont montré un effet antifongique, significativement supérieur ( $p < 0,0001$ ) à celui des contrôles positif et négatif.

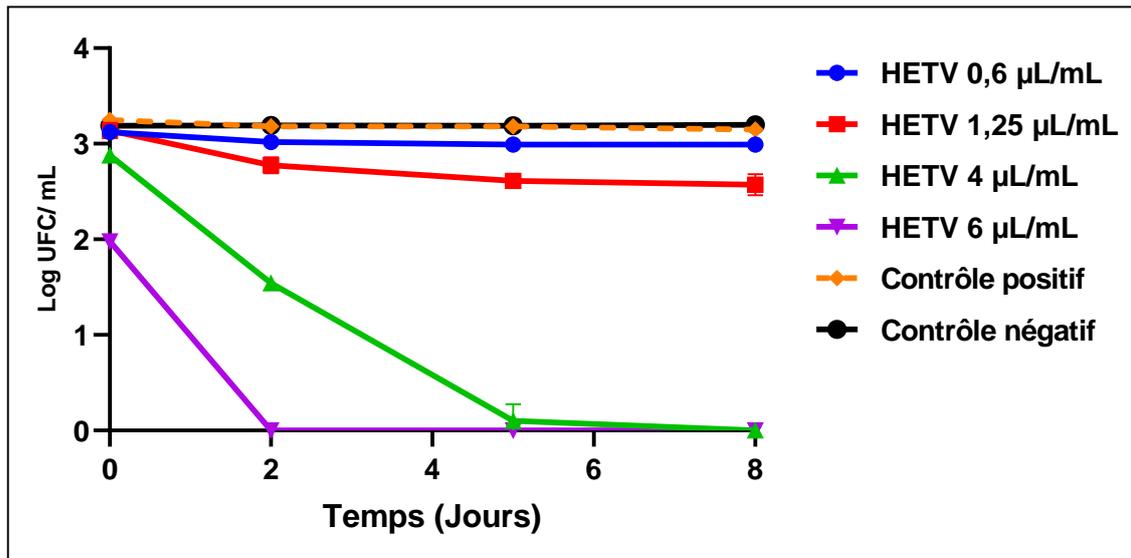


**Figure 55 : Effet des différentes concentrations de l'HE du *T. vulgaris* (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6µL/mL) sur la viabilité cellulaire de la souche *S. cerevisiae* dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation .**Contrôle positif: Boisson contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium); Contrôle négatif: boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement ; HETV: Huile essentielle du *Thymus vulgaris*; UFC: Unité formant colonie.

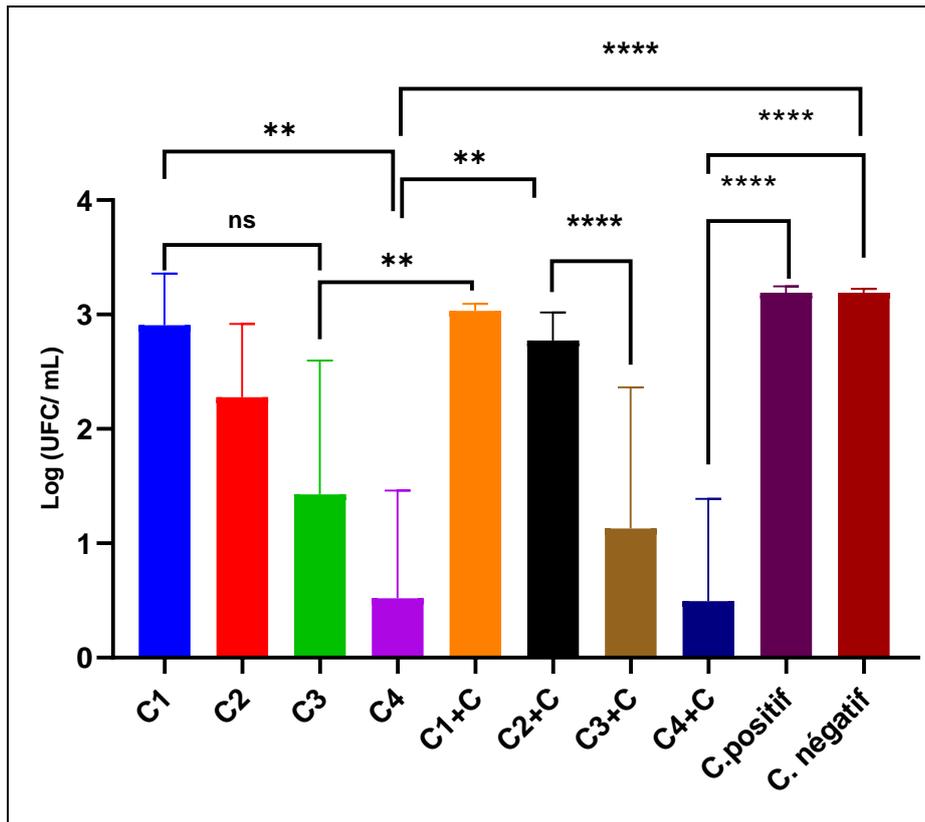
#### IV.2.2. Effet conservateur de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* associée à un chauffage modéré

L'effet conservateur de l'HE du *T. vulgaris* a été testé contre la souche *S. cerevisiae* dans un système alimentaire qui est la boisson commerciale (Orangina®) en variant les concentrations (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6 µL/mL), en fonction des jours de stockage (0, 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour) et associé à un traitement thermique modéré (70 °C/2 min) (Figures 56 et 57). Les Photos des résultats sont présentées dans l'annexe IX.

L'HE du *T. vulgaris* aux deux concentrations 0,6 et 1,25 µL/ mL a exhibé un effet antifongique très réduit et qui ne diffère pas significativement de celui des contrôles positif et négatif ( $p > 0,99$ ). Par contre, l'HE à 6 µL/mL a montré une réduction de la charge fongique dès le 1<sup>er</sup> jour de stockage (2 Log UFC/mL). Les deux concentrations supérieures d'HE à 6 et 4 µL/mL ont présenté une inhibition totale de la croissance du *S. cerevisiae* dès le 2<sup>ème</sup> et du 5<sup>ème</sup> jour de stockage, respectivement. De plus, ces deux concentrations d'HE ont montré un effet antifongique significativement supérieur à celui des contrôles positif et négatif ( $p < 0,0001$ ) vis-à-vis de la souche *S. cerevisiae*. En outre, l'association de l'HE du *T. vulgaris* avec un chauffage thermique modéré (70 °C/ 2 min) n'a pas induit une réduction significative de la viabilité du *S. cerevisiae* comparativement à son absence.



**Figure 56 : Effet des différentes concentrations d'HE du *T. vulgaris* (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6µL/mL) associé à un chauffage modéré (70°C/ 2min) sur la viabilité cellulaire de la souche *S. cerevisiae* dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation ;** Contrôle positif : Boisson contenant conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) ; Contrôle négatif : boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement HETV : huile essentielle du *Thymus vulgaris* ; UFC : Unité formant colonie.



**Figure 57 : Effet des différentes concentrations d’HE du *T. vulgaris* seule et associée à un chauffage thermique modéré (70 °C/min) sur la viabilité de la souche *S. cerevisiae* en comparaison avec le contrôle positif et négatif.** C. positif : Contrôle positif ; C. négatif ; Contrôle positif : Boisson Orangina® contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium). Contrôle négatif : Boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement. C : concentration ; C1 : 0,6µL/ mL, C2 :1,25 µL/mL, C3 : 4 µL/ mL, C4 : 6µL/ mL ; C1+C : Concentration 1+ chauffage modéré ; UFC : Unité formant colonie. Le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour l’analyse statistique sous le logiciel GraphPad Prism 8.00 suivi par le test post-hoc de Dunett’s. Les niveaux de significativité sont exprimés par : \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\* =  $p < 0,0001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,00001$ .

L’HE du *T. vulgaris*, même utilisée à de petites concentrations, a démontré un effet conservateur antifongique significativement supérieur à celui des conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) envers la souche *S. cerevisiae* dans une boisson commerciale (Orangina®).

L’efficacité de l’HE du *T. vulgaris* comme agent de conservation a été documentée pour un certain nombre d’aliments comprenant les fromages, les fruits ou encore les poissons. (Smith Palmer *et al.* 2011 ; Shabnum et Wagay, 2011 ; Angž et Ožuzhan, 2013).

Plus récemment Sharma *et al.* (2017) ont investigué l’effet conservateur de l’HE du *T. vulgaris* sur la qualité des saucisses de poulet pendant 20 jours de stockage à 4 °C. Les auteurs ont indiqué qu’une concentration d’HE de 0,125 % a réussi à maintenir la charge microbienne des levures et des moisissures à un niveau considérablement bas par rapport à celui du groupe témoin (Sharma *et al.*, 2017).

L'effet conservateur de l'HE du *T. vulgaris* dépend certainement de sa composition chimique et par conséquent de son composé majoritaire le carvacrol. Ce dernier est utilisé depuis des dizaines d'années en industrie alimentaire comme agent chimique de saveur et d'aromatisation approuvé par la Food and Drug administration (FDA). Cette approbation s'est faite aussi par le Conseil de l'Europe et le carvacrol a été répertorié dans la catégorie B des agents chimiques pouvant être ajouté aux denrées alimentaires à raison de 2 ppm dans les boissons (De Vincenzi *et al.*, 2004).

Quiroga *et al.* (2014) ont pour leur part évalué la stabilité des paramètres sensoriels et chimiques des graines de tournesol torréfiées supplémentées en carvacrol. Les résultats ont indiqué que les échantillons de graines de tournesol traités au carvacrol ont fourni une protection à l'aliment, inhibant la formation de produits d'oxydation (peroxyde et hexanal) et d'arômes indésirables comme des odeurs de carton ou d'oxydation. Ramos *et al.* (2013) ont même souligné l'efficacité du carvacrol comme agent antifongique lorsqu'il est ajouté à 8 % dans un système d'emballage dans l'augmentation de la durée de conservation des fraises fraîches et du pain.

L'association de l'HE du *T. vulgaris* à un traitement thermique modéré (70° C pendant 2 min) n'a pas induit un effet antifongique supérieur comparativement à son absence ( $p > 0,05$ ). Cela pourrait tenir aux caractéristiques physico-chimiques du carvacrol, composé majoritaire de l'HE. Cette molécule présente une température d'évaporation très élevée qui atteint les 238 °C, ce qui pourrait la rendre moins sensible à l'action des températures inférieures.

Même si, l'effet bénéfique de l'association des HEs à un traitement thermique modéré est validé par d'innombrables travaux antérieurs. En effet, Belletti *et al.* (2010) ont testé le potentiel de conservation antifongique de trois monoterpènes ( $\beta$ -pinène, gèranial et linalool) dans du jus d'orange inoculé avec une souche sauvage de *S. cerevisiae* et associé à un traitement thermique modéré (55 °C/15 min). Les auteurs ont rapporté un effet synergique entre le traitement thermique et les molécules bioactives sur l'amélioration de la conservation de la boisson. Cet effet synergique tiendrait au fait que le traitement thermique permettrait aux composés volatiles hydrophobes d'atteindre plus facilement la membrane cytoplasmique de la levure, où les biomolécules exercent leurs effets fongicide (Prashar *et al.*, 2003).

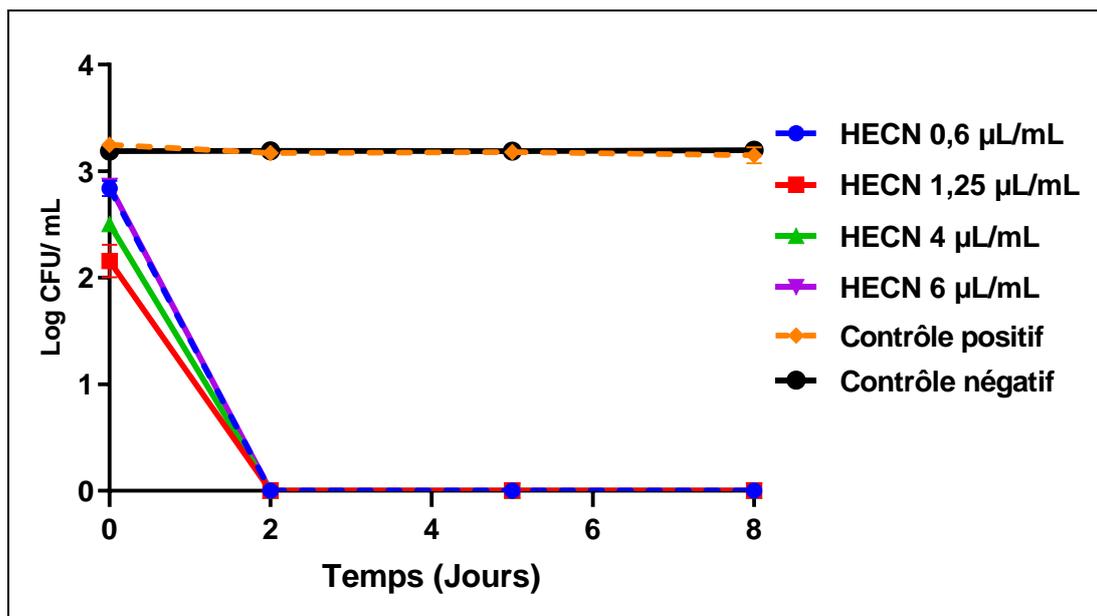
Aït Ouazzou *et al.* (2011) ont aussi démontré l'action synergique entre 3 monoterpènes hydrocarbonés (l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène et le p-cymène) et 8 monoterpènes oxygénés (le thymol, le carvacrol, le bornéol, le linalool, le terpinéol-4-ol, le 1,8-cinéol, l' $\alpha$ -terpinyl acétate, et le camphre), combinés à un chauffage modéré (54 °C/10 min) envers deux souches pathogènes d'origine alimentaire : *E. coli* et *Listeria monocytogenes* dans des jus d'orange et de pommes.

### IV.3. Evaluation de l'effet conservateur de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus* envers une souche fongique (*Saccharomyces cerevisiae*) dans un système alimentaire (Orangina®)

#### IV.3.1. Effet de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

L'évaluation de la potentielle utilisation de l'HE du *C. nardus* comme conservateur alimentaire envers la souche de levure *S. cerevisiae* dans un système alimentaire qui est une boisson gazeuse commerciale à base d'agrumes (Orangina®). La réduction de la viabilité de la souche étudiée s'est faite en testant l'HE à quatre concentrations différentes (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) en fonction des jours de stockage (0, 2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour). La boisson Orangina® contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium) a servi de contrôle positif. Alors que la boisson Orangina® inoculée avec la souche fongique *S. cerevisiae* seulement a servi de contrôle négatif. Les résultats sont regroupés sur la Figure 58. Les Photos des résultats sont présentées dans l'annexe IX.

Les résultats de l'expérience ont révélé que les quatre concentrations testées d'HE du *C.nardus* (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) ont montré le même puissant effet antifongique. Ce dernier se caractérise par une inhibition complète de la croissance de la souche *S. cerevisiae* dès le deuxième jour de stockage et durant les huit jours ( $p > 0,05$ ). De plus, les 4 concentrations d'HE testées ont présenté un effet antifongique significativement supérieur ( $p < 0,0001$ ) à celui des contrôles positif et négatif durant les huit jours de stockage.

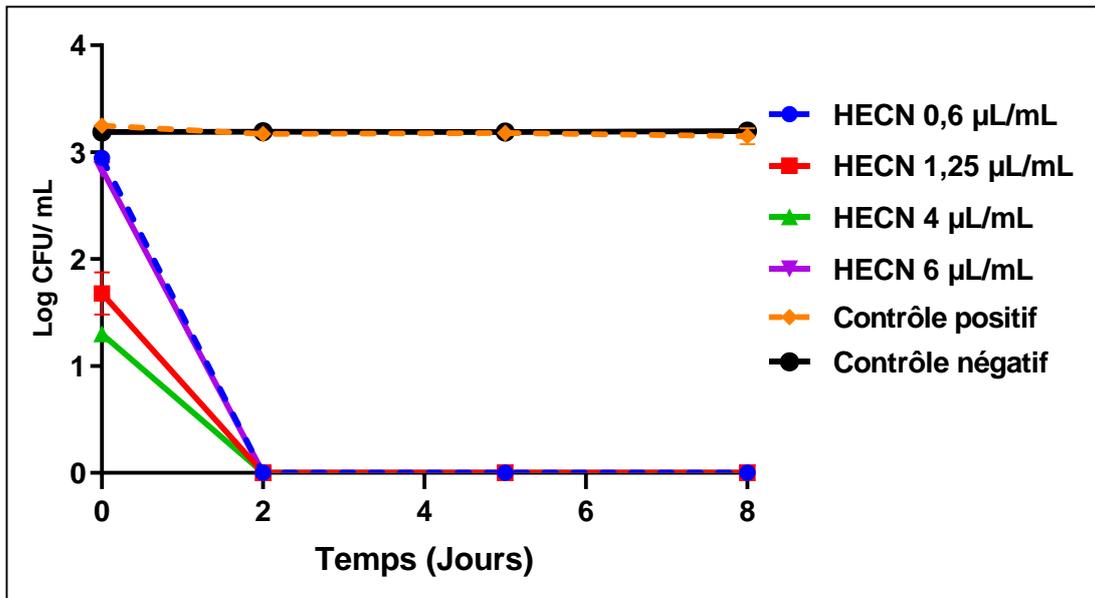


**Figure 58 : Effet des différentes concentrations de l'HE du *C. nardus* (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6µL/mL) sur la viabilité cellulaire de la souche *S. cerevisiae* dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation.** Contrôle positif : Boisson contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de sodium) ; Contrôle négatif : Boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement HECN : Huile essentielle du *Cymbopogon nardus* ; UFC : Unité formant colonie.

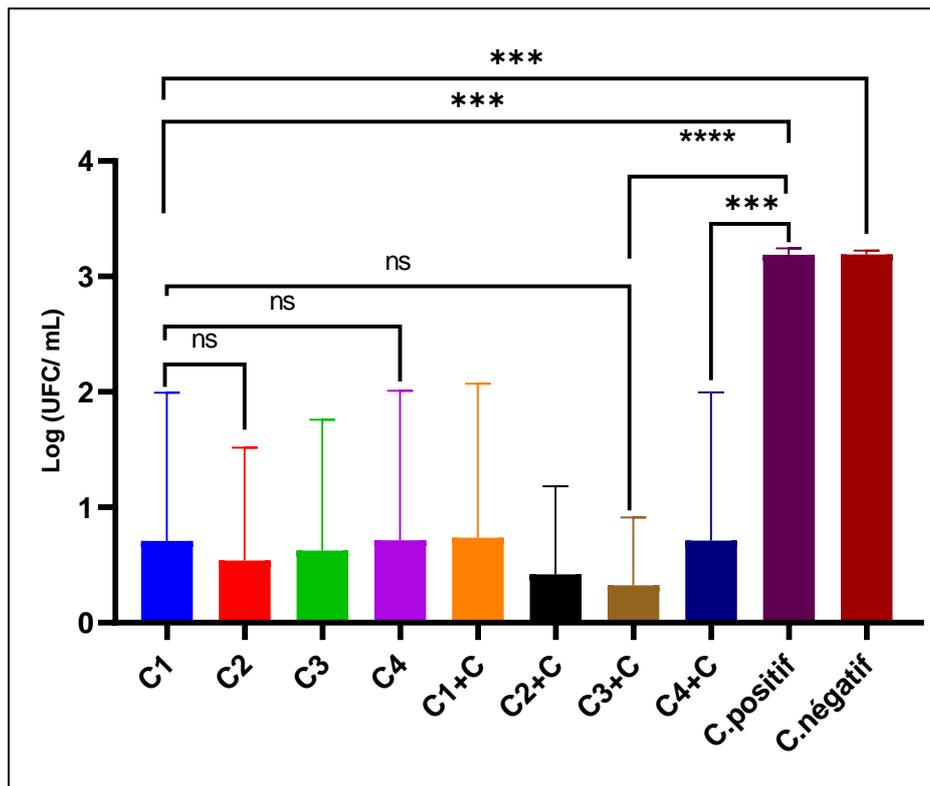
#### IV.3.2. Effet conservateur de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus* associée à un chauffage modéré

L'effet conservateur de l'HE du *C. nardus* a été évalué dans un système alimentaire qui est la boisson commerciale (Orangina) envers l'espèce *S. cerevisiae*. L'HE a été testée à quatre concentrations différentes (0,6 ; 1,25 ; 4 et 6 µL/mL) en fonction des jours de stockage (0,2<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour) et en appliquant un chauffage modéré (70 C°/2 min). Les résultats sont regroupés dans les Figures 59 et 60. Les photos des résultats sont regroupées dans l'Annexe IX.

Les résultats ont exposé que les quatre concentrations d'HE ont totalement inhibé la croissance de la souche *S.cerevisiae* dès le 2<sup>ème</sup> jour de stockage et durant les huit jours d'expérience. En outre, L'association de l'HE avec un traitement thermique modéré a légèrement amélioré la réduction de la viabilité du *S. cerevisiae* pour les deux concentrations de 1,25 et 4 µL/mL en début d'expérience (jour 0) (Figures 59 et 60).



**Figure 59 : Effet des différentes concentrations de l'HE du *C. nardus* (0,6 ; 1,25 ; 4 µL/mL et 6µL/mL) associée à un traitement thermique modéré (70°C/ 2min) sur la viabilité cellulaire de la souche *S. cerevisiae* dans une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) pendant 8 jours de conservation.** Contrôle positif : Boisson contenant des conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de sodium) ; Contrôle négatif : Boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement HECN : huile essentielle du *Cymbopogon nardus*; UFC: Unité formant colonie.



**Figure 60 : Effet des différentes concentrations d’HE du *C. nardus* seule et associée à un chauffage thermique modéré (70°C/min) sur la viabilité de la souche *S. cerevisiae* en comparaison avec le contrôle positif et négatif.** C. positif : Contrôle positif ; C. négatif ; Contrôle positif : Boisson Orangina® contenant deux conservateurs chimiques (benzoate de sodium et sorbate de potassium). Contrôle négatif : Boisson Orangina® inoculée avec la souche *S. cerevisiae* seulement. C : concentration ; C1 : 0,6µL/ mL, C2 :1,25 µL/mL, C3 : 4 µL/ mL, C4 : 6µL/ mL ; C1+C : Concentration 1+ chauffage modéré ; UFC : Unité formant colonie. Le test de Kruskal Wallis a été utilisé pour l’analyse statistique sous le logiciel GraphPad Prism 8.00 suivi par le test post-hoc de Dunett’s. Les niveaux de significativité sont exprimés par : \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\* =  $p < 0,0001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,00001$ .

L’HE du *C. nardus* incorporée à très petite concentration dans une boisson commerciale (Orangina®) a présenté un effet antifongique significativement supérieur à celui des conservateurs chimiques envers la souche *S. cerevisiae*.

Peu de travaux portent sur l’utilisation de l’HE du *C. nardus* dans le domaine alimentaire et encore moins dans le processus de conservation. Parmi lesquels Sulali *et al.* (2003) qui ont investigué l’effet conservateur de l’HE à 0,4 % (v/v) contre les maladies qui apparaissent en post-récolte sur les bananes Embul. Les auteurs ont indiqué que le traitement des fruits avec l’HE du *C. nardus* a stoppé la propagation de la pourriture du collet et l’apparition de l’antracnose et a permis aux bananes d’être conservés jusqu’à trois semaines.

Par contre, il existe plus d’études sur l’emploi d’HEs comme agents de conservation qui appartenant à des espèces voisines à la nôtre tel que celle du *Cymbopogon citratus*. A titre d’illustration, Vazirian *et al.* (2012) ont exploré le pouvoir conservateur de l’HE du *C. citratus*, incorporée à une concentration supérieure à 0,5 µL/mL dans les gâteaux et les pâtisseries. L’HE

a diminué ou bloqué entièrement la croissance des cellules microbiennes d'*E. coli*, de la *C. albicans*, du *Bacillus cereus*, et de la *S. typhimurium*. D'un tout autre côté, Da Cruz Almeida *et al.* (2019) ont exposé avec une méthodologie très semblable à la nôtre l'effet conservateur de l'HE de la *Mentha piperita* dans un jus de fruit exotique. L'HE ajoutée à la boisson à une concentration de 3,75 µL/mL a totalement neutralisé les cellules fongiques de la souche *S. cerevisiae* après trois jours de conservation.

L'utilisation de l'HE du *C. nardus*, en association à un traitement thermique modéré, n'a pas induit un effet conservateur supérieur comparativement à son absence. Ce qui contredit les travaux de Tyagi *et al.* (2014) qui ont testé l'HE du *C. citratus* dont le géraniol (40,54 %) est le composé majoritaire, en association à un traitement thermique (80 °C) modéré envers la souche *S. cerevisiae* sur la conservation du jus de pomme. L'étude a établi l'efficacité de la combinaison de l'HE du *C. citratus* à un traitement thermique sur la réduction des quantités d'HEs nécessaires pour la conservation des boissons.

L'effet antifongique de l'HE du *C. nardus* envers la souche de *S. cerevisiae* testée dépend forcément de sa composition chimique et plus spécifiquement de ses trois composés majoritaires (citronellal et géraniol et citronellal). A titre d'illustration, Raybaudi-Massilia *et al.* (2006) ont souligné que l'utilisation du géraniol à 2 µL/mL a permis l'inactivation des espèces *Salmonella Enteritidis*, *E. coli*, et *L. innocua* dans le jus de pomme. Les auteurs ont aussi indiqué qu'une concentration en géraniol de 6 mL/L a réussi à inactiver les mêmes souches dans le jus de melon et de poires.

### **Partie V. Evaluation *in silico* des propriétés physico-chimiques pharmacocinétiques des composés des deux huiles essentielles étudiées et investigation par docking moléculaire des mécanismes impliqués dans leur action antifongique**

#### **V.1. Evaluation *in silico* des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris***

La prédiction des propriétés ADME de 25 composés de l'HE du *T. vulgaris* s'est faite à l'aide du simulateur ADME « SWISSADME web server ». Les résultats sont résumés dans les Tableaux 26 et 27.

Les résultats de la prédiction des propriétés physicochimiques indiquent que tous les composés testés de l'HE du *T. vulgaris* respectent la règle de Lipinski (c'est-à-dire que leur poids moléculaire est inférieur à 500 daltons, log P <5 le nombre de donneurs de liaisons hydrogène inférieur à 5, le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 10). En outre, tous les composés testés respectent la règle de Veber (TPSA <140Å) et présentent tous une

forte solubilité à l'exception du  $\beta$ -bisabolène. Les molécules qui respectent les règles de Lipinski et Veber devraient être bien absorbés par voie orale.

L'évaluation des propriétés pharmacocinétiques des composés testés indique que le carvacrol présente une forte absorption intestinale, alors qu'elle varie pour les autres composés. En outre, toutes les molécules peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et présentent une bonne perméabilité cutanée (Log Kp qui varie de -3.89 à -5.74 cm/s). En revanche, aucun des composés ne constitue un substrat pour le PGP (transporteur membranaire impliqué dans la détoxification du corps) et le carvacrol n'induit pas l'inhibition des isoenzymes de la famille cytochromes P450 à l'exception du CYP1A2.

Le graphe BOILED-Egg fournit des prédictions de données directement liées à la distribution des molécules simulant leur comportement dans le corps humain en évaluant leur diffusion passive à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) indiquée par la région jaune et de l'absorption intestinale passive (HIA) indiquée par la région blanche en fonction de la lipophilie et de la polarité apparente (Figure 61).

Le graphe indique que tous les composés ont la capacité de traverser la barrière hématoencéphalique. La majorité des composés possèdent une forte absorption intestinale à l'exception du myrcène, l' $\alpha$ -terpinène, l' $\alpha$ -pinène, le sabinène, l' $\alpha$ -thuyène, le limonène, l' $\alpha$ -phellandrène et le camphène. En revanche, le  $\beta$ -bisabolène, l' $\alpha$ -humulène, le  $\beta$ -caryophyllène n'ont pas la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique et présentent une faible absorption intestinale.

**Tableau 26 : Résultats de la prédiction *in silico* des propriétés physico-chimiques par SwissADME des composés de l'HE du *T. vulgaris***

Molécule	MM	Liaison Rotatives	Liaison H accepteurs	Liaison H donneurs	TPSA(Å <sup>2</sup> )	Log P Consensus	Lipinski (violations)	Veber (violations)	Classe ESOL
Carvacrol	150,22	1	1	1	20,23	2,82	0	0	Soluble
p-Cymène	134,22	1	0	0	0	3,5	1	0	Soluble
γ-Terpinène	136,23	1	0	0	0	3,35	0	0	Soluble
β-Caryophyllène	204,35	0	0	0	0	4,24	1	0	Soluble
Linalool	154,25	4	1	1	20,23	2,66	0	0	Soluble
Myrcène	136,23	4	0	0	0	3,43	0	0	Soluble
α-Terpinène	136,23	1	0	0	0	3,3	0	0	Soluble
Bornéol	154,25	0	1	1	20,23	2,38	0	0	Soluble
Terpinène -4-ol	154,25	1	1	1	20,23	2,6	0	0	Soluble
α-Pinène	136,23	0	0	0	0	3,44	1	0	Soluble
Sabinène	136,23	1	0	0	0	3,25	1	0	Soluble
α-Thuyène	136,23	1	0	0	0	3,15	1	0	Soluble
Trans-Sabinène hydrate	154,25	1	1	1	20,23	2,33	0	0	Soluble
1,8 Cinéol	154,25	0	1	0	9,23	2,67	0	0	Soluble
Carvacryl acétate	192,25	3	2	0	26,3	3,02	0	0	Soluble
Thymyl acétate	192,25	3	2	0	26,3	3,1	0	0	Soluble
Oxyde de caryophyllène	220,35	0	1	0	12,53	3,68	0	0	Soluble
Limonène	136,23	1	0	0	0	3,37	0	0	Soluble
β-Bisabolène	204,35	4	0	0	0	4,83	1	0	Modérément soluble
α-Phellandrène	136,23	1	0	0	0	2,97	0	0	Soluble
Camphène	136,23	0	0	0	0	3,43	1	0	Soluble
Thymol	150,22	1	1	1	20,23	2,8	0	0	Soluble
Octan-3-ol	130,23	5	1	1	20,23	2,37	0	0	Soluble
α-Humulène	204,35	0	0	0	0	4,26	1	0	Soluble
α-Terpinéol	154,25	1	1	1	20,23	2,58	0	0	Soluble

MM : Masse moléculaire, Liaison H : Liaison hydrogène, TPSA : Topological polar surface area, Log P consensus : Le logarithme décimal du coefficient de partage eau /1-octanol (partition coefficient in octanol/water), ESOL : Solubilité estimée (Estimated Solubility).

**Tableau 27 : Résultats de la prédiction *in silico* des propriétés pharmacocinétiques par SwissADME des composés de l'HE du *T. vulgaris***

Molécule	Absorption GI	Perméabilité BHE	Substrat de Pgp	CYP1A2 inhibition	CYP2C19 inhibition	CYP2C9 inhibition	CYP2D6 inhibition	CYP3A4 inhibition	Log Kp (cm/s)
Carvacrol	Élevé	Oui	Non	Yes	Non	Non	Non	Non	-4,74
p-Cymène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	-4,21
γ-Terpinène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-3,94
β-Caryophyllène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,44
Linalool	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,13
Myrcène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,17
α-Terpinène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,11
Bornéol	Élevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,31
Terpinène -4-ol	Élevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,93
α-Pinène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-3,95
Sabinène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,94
α-Thuyène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,11
Trans-Sabinène hydrate	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,74
1,8 Cinéol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,3
Carvacryl acétate	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,37
Thymyl acétate	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,97
Oxyde de caryophyllène	Elevé	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-5,12
Limonène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-3,89
β-Bisabolène	Bas	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-2,98
α-Phellandrène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,85
Camphène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-4,13
Thymol	Elevé	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	-4,87
Octan-3-ol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,12
α-Humulène	Bas	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-4,32
α-Terpinéol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,83

GI : gastrointestinal ; BHE : Barrière hémato-encéphalique ; Pgp : P-glycoprotéine ; CYP1A2 : Cytochrome P450 1A2 ; CYP2C19 : Cytochrome P450 2C19 ; CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9 ; CYP2D6 : Cytochrome P450 2D6 ; CYP3A4 : Cytochrome P403A4. Log Kp : coefficient de perméabilité de peau humaine (Les valeurs de Log kp négatives suggèrent une pénétration cutanée limitée, une valeur négative plus élevée indiquant un potentiel de perméation réduit).

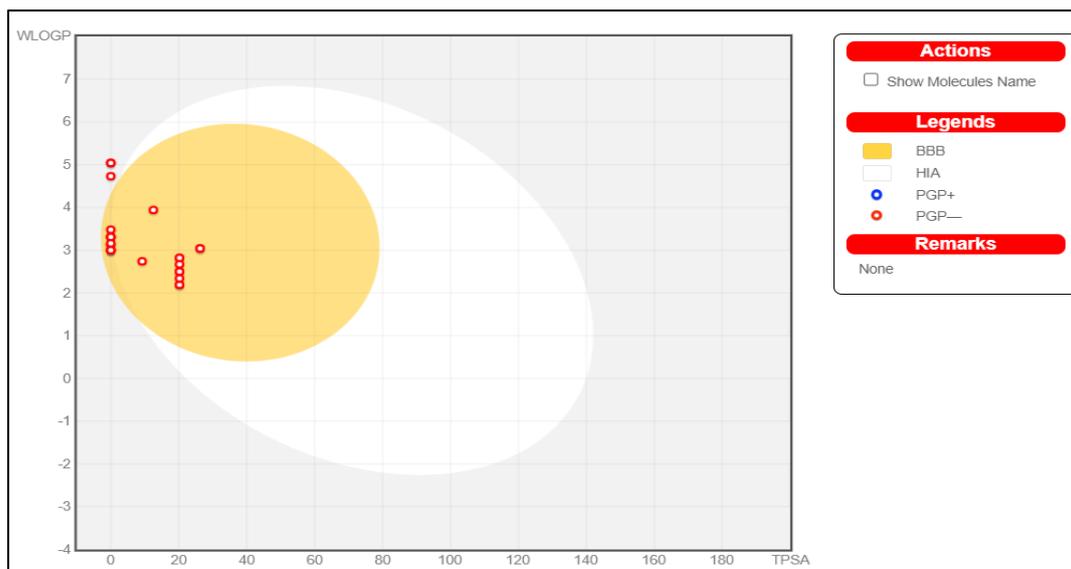


Figure 61 : Le graphe BOILED-egg des composés testés de l'HE du *T. vulgaris*

## V.2. Evaluation *in silico* des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des composés de l'huile essentielle du *Cymbopogon nardus*

La prédiction des propriétés ADME de 22 composés l'HE du *C. nardus* s'est faite à l'aide du simulateur ADME « SWISSADME web server ». Les résultats sont résumés dans les Tableaux 28 et 29.

Les résultats des propriétés physicochimiques indiquent que tous les composés testés respectent les règles de Lipinski et de Veber suggérant une bonne absorption orale. Par ailleurs, toutes les molécules présentent une forte solubilité à l'exception du  $\beta$ -élémane, du germacrène D et du  $\beta$ -bourbonène. L'évaluation des propriétés pharmacocinétiques indique que les trois composés majoritaires de l'HE (le citronellal, le géraniol et le citronello) présentent une absorption gastro-intestinale élevée. Alors que cette absorption varie pour les autres composés. Cependant, les 22 composés présentent une bonne perméabilité cutanée (LogKp qui varie de -3,21 à -5,29 cm/s).

Par ailleurs, les trois molécules majoritaires de l'HE (le citronellal, le géraniol et le citronello) ne constituent pas un substrat pour la PGP et n'induisent pas l'inhibition des 5 isoenzymes de la famille des cytochromes P450.

Le graphe BOILED-Egg indique que les trois composés majoritaires de l'HE du *C. nardus* peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et ont une forte absorption intestinale. A l'opposé, l' $\delta$ -cadinène, l' $\alpha$ -humulène, le germacrène D, le  $\beta$ -élémane, le géraniol, l' $\alpha$ -muuroène et le 1,4-cadinadiène ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique et leur absorption intestinale est faible (Figure 62).

**Tableau 28 : Résultats de la prédiction *in silico* des propriétés physicochimiques par SwissADME des composés de l'HE du *C. nardus***

Molécule	MM	Liaisons rotatives	Liaison H accepteurs	Liaison H donneurs	TPSA(Å <sup>2</sup> )	Log P Consensus	Lipinski (violations)	Veber (violations)	Classe ESOL
Citronellal	154,25	5	1	0	17,07	2,94	0	0	Soluble
Géraniol	154,25	4	1	1	20,23	2,78	0	0	Soluble
Citronellol	156,27	5	1	1	20,23	2,92	0	0	Soluble
β-Elémol	222,37	3	1	1	20,23	3,77	0	0	Soluble
Géranyl acétate	196,29	6	2	0	26,3	3,21	0	0	Soluble
Limonène	136,23	1	0	0	0	3,37	0	0	Soluble
Citronellyl acétate	198,3	7	2	0	26,3	3,46	0	0	Soluble
β-Elémène	204,35	3	0	0	0	4,65	1	0	Modérément soluble
δ-Cadinène	204,35	1	0	0	0	4,12	1	0	Soluble
Germacrène D	204,35	1	0	0	0	4,3	1	0	Modérément soluble
Linalool	154,25	4	1	1	20,23	2,66	0	0	Soluble
Isopulégol	154,25	1	1	1	20,23	2,42	0	0	Soluble
γ-Cadinène	204,35	1	0	0	0	4,18	1	0	Soluble
Géranial	204,35	1	0	0	0	4,18	1	0	Soluble
α-Murolène	204,35	1	0	0	0	4,08	1	0	Soluble
α-Cadinol	222,37	1	1	1	20,23	3,43	0	0	Soluble
Néral	152,23	4	1	0	17,07	2,71	0	0	Soluble
β-Caryophyllène	204,35	0	0	0	0	4,24	1	0	Soluble
α-Humulène	204,35	0	0	0	0	4,26	1	0	Soluble
Myrcène	136,23	4	0	0	0	3,43	0	0	Soluble
β-Bourbonène	204,35	1	0	0	0	4,4	1	0	Modérément soluble
1,4 Cadinadiène	204,35	1	0	0	0	4,16	1	0	Soluble

MM : Masse moléculaire ; Liaison H : Liaison hydrogène ; TPSA : Topological polar surface area ; Log P consensus : Le logarithme décimal du coefficient de partage eau /1-octanol (partition coefficient in octanol/water) ; ESOL : Solubilité estimée (Estimated Solubility).

**Tableau 29 : Résultats de la prédiction *in silico* des propriétés pharmacocinétiques par SwissADME des composés de l'HE du *C. nardus***

Molécule	Absorption GI	Perméabilité BHE	Substrat de Pgp	CYP1A2 inhibition	CYP2C19 inhibition	CYP2C9 inhibition	CYP2D6 inhibition	CYP3A4 inhibition	Log Kp (cm/s)
Citronellal	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,52
Géranol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,71
Citronellol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,48
$\beta$ -Elémol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-4,53
Géranyl acétate	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,63
Limonène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-3,89
Citronellyl acétate	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,33
$\beta$ -Elémène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-3,21
$\delta$ -Cadinène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,85
Germacrène D	Bas	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-4,18
Linalool	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,13
Isopulégol	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,15
$\gamma$ -Cadinène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,49
Géranial	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,49
$\alpha$ -Muuroène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,65
$\alpha$ -Cadinol	Elevé	Oui	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	-5,29
Néral	Elevé	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-5,08
$\beta$ -Caryophyllène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,44
$\alpha$ -Humulène	Bas	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	-4,32
Myrcène	Bas	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	-4,17
$\beta$ -Bourbonène	Bas	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	-4,2
1,4 Cadinadiène	Bas	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-4,38

GI : gastrointestinal ; BHE : Barrière hémato-encéphalique ; Pgp : P-glycoprotéine ; CYP1A2 : Cytochrome P450 1A2 ; CYP2C19 : Cytochrome P450 2C19 ; CYP2C9 : Cytochrome P450 2C9 ; CYP2D6 : Cytochrome P450 2D6 ; CYP3A4 : Cytochrome P40 3A4 ; Log Kp : coefficient de perméabilité de peau humaine (Les valeurs de Log kp négatives suggèrent une pénétration cutanée limitée, une valeur négative plus élevée indiquant un potentiel de perméation réduit).

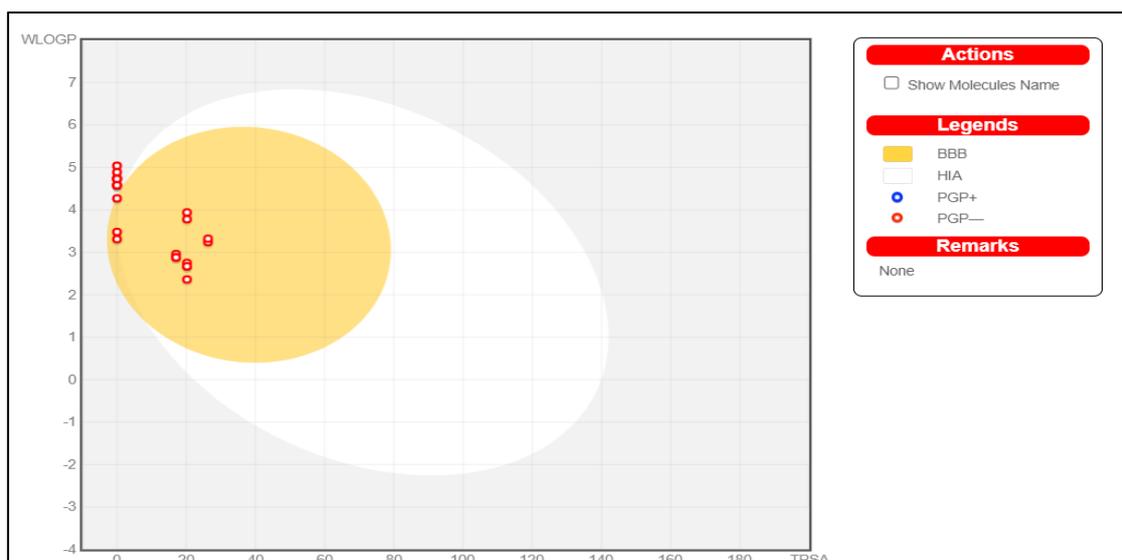


Figure 62 : Le graphe BOILED-egg des composés testés de l’HE du *C. nardus*

### V.3. Evaluation *in silico* par docking moléculaire du mode d’action des principaux composés des huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* envers la souche fongique *Saccharomyces cerevisiae*

L’évaluation par docking moléculaire de l’interaction des deux composés majoritaires (le carvacrol et le citronellal) des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* avec trois enzymes ciblées (ERG2, ERG3 et ERG11) impliquées dans la biosynthèse de l’ergostérol. Ce dernier est un composé présent au niveau de la membrane des cellules fongiques et qui est indispensable à sa survie. Les deux conservateurs chimiques benzoate de sodium et sorbate de potassium ont aussi été choisis comme ligands et donc testés envers les trois enzymes ciblées. Les sites de liaison prédit par le logiciel CASTp 3.0 de deux enzymes ciblées (ERG2 et ERG3) utilisées dans l’étude de docking moléculaire sont présentées dans le Tableau 30. Les scores (kcal/mol) de l’étude de docking moléculaire sont présentés dans Tableau 31.

Tableau 30 : Les sites de liaisons prédit par le logiciel CASTp (version 3.0) des enzymes ciblées (ERG2 et ERG3) utilisées dans l’étude de docking moléculaire

Enzymes	Sites de liaisons (acides aminés)
<b>ERG2</b>	Phe85,Asn86,Asn87,Ala88,Ala91,Met92,Gly93,Met95,Ile97,Ala100,Tyr105,Ile107,Phe109,His118,Thr119,His122,Asp126,Phe128,Gln135,His154,Leu156,Tyr164,Glu174,Ile180,Met183,Leu184Phe186,Gly187,Phe188,Thr191,Thr195,Asp197,Thr200,Leu201,Thr 204,Thr 208,Met 212.
<b>ERG3</b>	Met1,Asp2,Leu3,Val4,Glu6,Val59,Lys60,Cys62,Arg63,Arg64,Phe65,Tyr66,Gly67,Gln68Val69,Pro70,Phe71,Met75,Arg86,Ile99,Val100,Phe103,Gly104,Leu107,Tyr108,Ile146,Met149,Ser150,Thr153,Phe157,Glu160,Leu161,Gly163,Ser165,Leu167,Phe188,Val196,His200,His213,His216,Ser227,His228,Phe230,Gly235,Gln238,Ser239,Tyr242,His243,Lys253,Tyr256,Leu257,Phe260,Thr261,Val263,Asn264,Thr267,Ile270,His288,Asn298,Tyr299,Gly300,Gln301

ERG2 : C-8 stérol isomérase, ERG3 : Delta (7) - stérol 5(6) -désaturase.

**Tableau 31 : Les scores (kcal/mol) de l'étude de docking moléculaire**

Enzymes	Carvacrol	Citronellal	Benzoate de sodium	Sorbate de potassium
ERG2	-10,42	-9,64	-9,21	-8,16
ERG3	-11,73	-10,87	-8,49	-7,84
ERG11	-10,47	-9,67	-8,35	-8,54

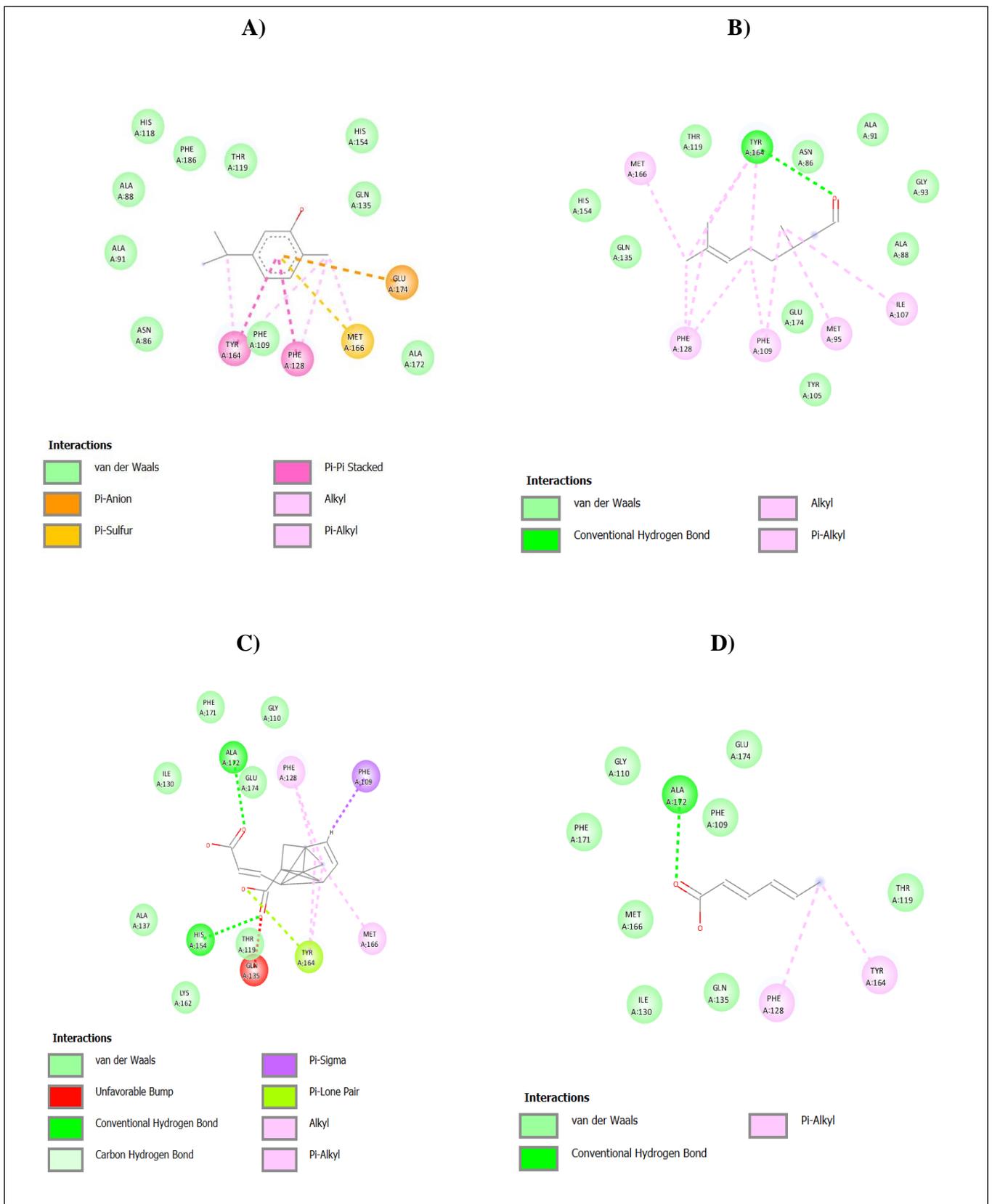
ERG2 : C-8 stérol isomérase ; ERG3 : Delta (7) - stérol 5(6) – désaturase ; ERG11 : stérol 14-déméthylase

***C-8 stérol isomérase (ERG2)***

Les résultats du docking moléculaire avec l'enzyme ERG2 exprimés en kcal/mol sont largement négatifs pour les quatre ligands testés (Tableau 31, Figure 62). Ce qui indique une forte affinité des quatre composés testés avec l'enzyme ERG2. Néanmoins, le carvacrol présente la plus forte interaction pour l'enzyme avec une énergie d'affinité de -10,42 kcal/mol suivi du citronellal avec -9,64 kcal/mol, ensuite le benzoate de sodium avec -9,21 kcal/mol et enfin le sorbate de potassium avec -8,16 kcal/mol.

La visualisation 3D des résultats du docking moléculaire effectuée envers l'ERG2 grâce à BIOVIA Discovery Studio visualizer indique que le carvacrol a établi des interactions de Van der Waals avec les résidus d'acides aminés : Ala88, Asn86, Ala91, Phe109, Thr119, His118, Gln135, His154, Ala172, Phe186. Avec les deux résidus Phe128 et Tyr164, le carvacrol a établi des interactions de type Pi-Pi stacked et des interactions de type alkyle grâce son cycle aromatique.

Le docking moléculaire du citronellal avec l'ERG2 a permis l'établissement d'interactions de type Van der Waals avec les résidus Asn86, Ala88, Ala91, Gly 93, Tyr105, Gln135, His 154 et Glu 174. La molécule a aussi établi des interactions de type alkyle avec les résidus Met95, Ile107, Phe109Met166, Phe128. Enfin, le citronellal a établi une seule liaison hydrogène avec le résidu Tyr164 grâce à l'atome d'oxygène de sa fonction aldéhyde (Figure 63).

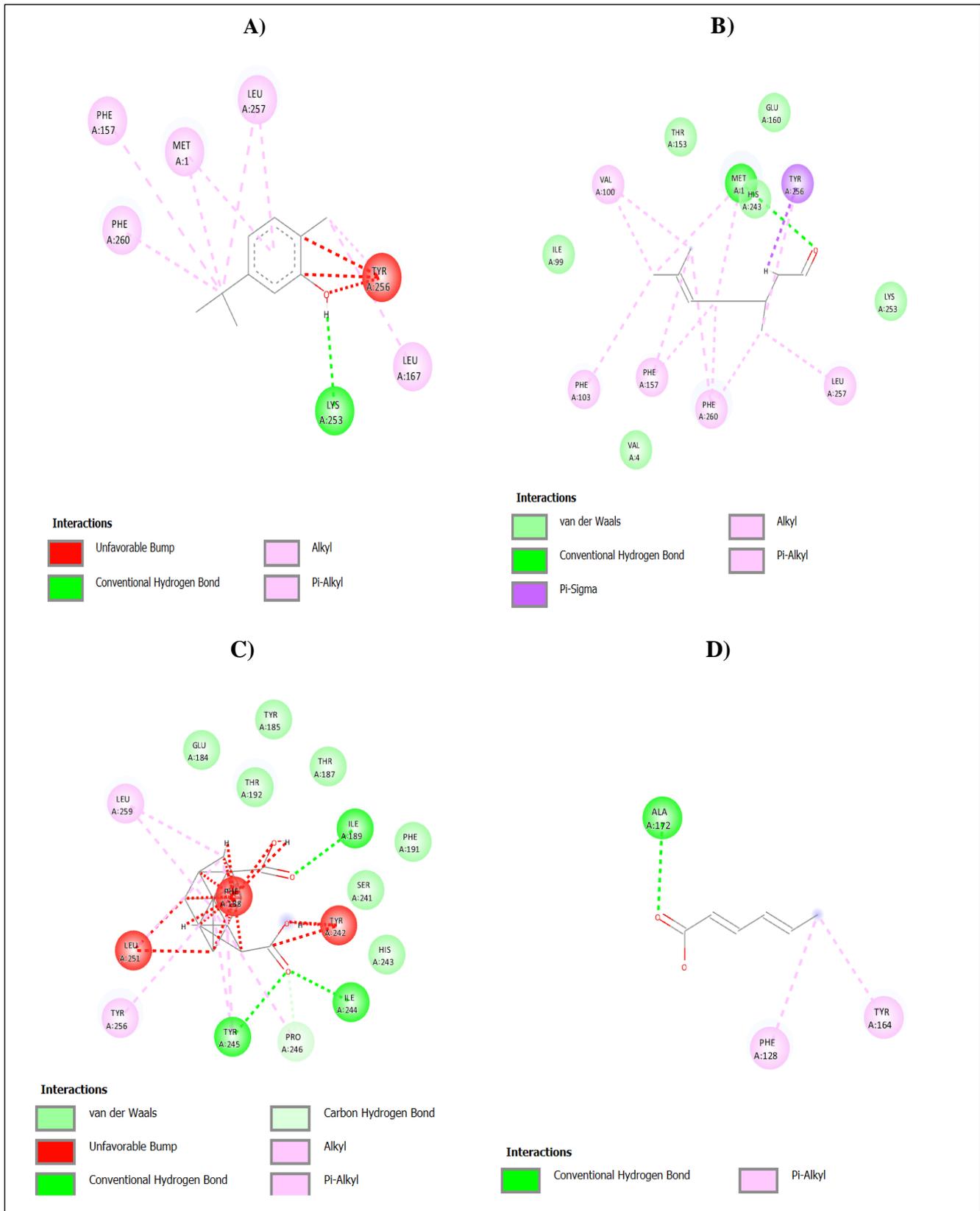


**Figure 63 : Visualisation du docking moléculaire du carvacrol (A), du citronellal (B), du benzoate de sodium (C), et du sorbate de potassium (D) avec l'enzyme C-8 stérol isomérase (ERG2) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer.**

### *Delta (7) - stérol 5(6) (ERG3)*

Le docking moléculaire réalisé avec l'ERG3 a établi une forte affinité des quatre ligands pour l'enzyme cible illustrée par des énergies d'affinités largement négatives (Tableau 31, Figure 64). Toutefois, le carvacrol présente la plus importante interaction pour l'ERG3 avec une énergie d'affinité de -11,73 kcal/mol, suivi du citronellal avec -10,87 kcal/mol, ensuite le benzoate de sodium avec -8,49 kcal/mol et enfin le sorbate de potassium avec -7,84 kcal/mol.

La visualisation 3D des résultats a permis d'exposer que le carvacrol grâce à sa fonction hydroxyle a établi une seule liaison hydrophile de type hydrogène avec le résidu Lys253. La molécule a aussi réalisé des liaisons alkyles avec les résidus Met1, Phe 157, Leu167, Leu257 et Phe260. Le citronellal a pour sa part établie des liaisons de Van der Waals avec les résidus Val4, Ile99, Thr153, Glu160, His243, Lys253. La molécule a aussi effectué une liaison hydrogène avec le résidu Met1 et des liaisons alkyles avec les résidus Val100, Phe103, Phe157, Leu257, Phe260 et une interaction Pi-sigma avec le résidu Tyr256.



**Figure 64 : Visualisation du docking moléculaire du carvacrol (A), du citronellal (B), du benzoate de sodium (C), et du sorbate de potassium (D) avec l'enzyme Delta (7) -sterol 5(6) (ERG3) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer.**

### *Stérol 14-déméthylase (ERG11)*

Pour l'enzyme ERG11, les résultats indiquent une forte affinité des quatre ligands, illustrée par la négativité de l'énergie d'affinité exprimée en kcal/mol (Tableau 31, Figure 64). Néanmoins, le carvacrol exprime l'affinité la plus importante avec une énergie de -10,47 kcal/mol, suivi du citronellal avec -9,67 kcal/mol, ensuite le sorbate de potassium avec -8,54 kcal/mol et enfin le benzoate de sodium avec -8,35 kcal/mol. La visualisation 3D des interactions indiquent que le carvacrol a établi des interactions de Van der Waals avec les résidus Thr130, Phe134, Gln150, Val154, Gly310, Leu307, Val311, His468, Ile471. De plus, la molécule grâce à son cycle aromatique a établi des liaisons Pi-sigma avec le résidu Ile139 et une liaison Pi-Pi T-shaped avec le résidu Tyr140. Enfin, le carvacrol a établi des liaisons alkyles avec les résidus Leu147 et Lys151.

Le citronellal a effectué presque exclusivement des interactions hydrophobes avec l'enzyme ERG11. Ces interactions sont majoritairement de type alkyle avec les résidus Ile205, Tyr229, Leu232, Ile261, Tyr 265, Ile309, Leu312, Met313. Le citronellal a aussi établi des interactions de type Van der Waals avec les résidus Leu213, Leu308, Leu213, Leu221 et Gln316 (Figure 65).

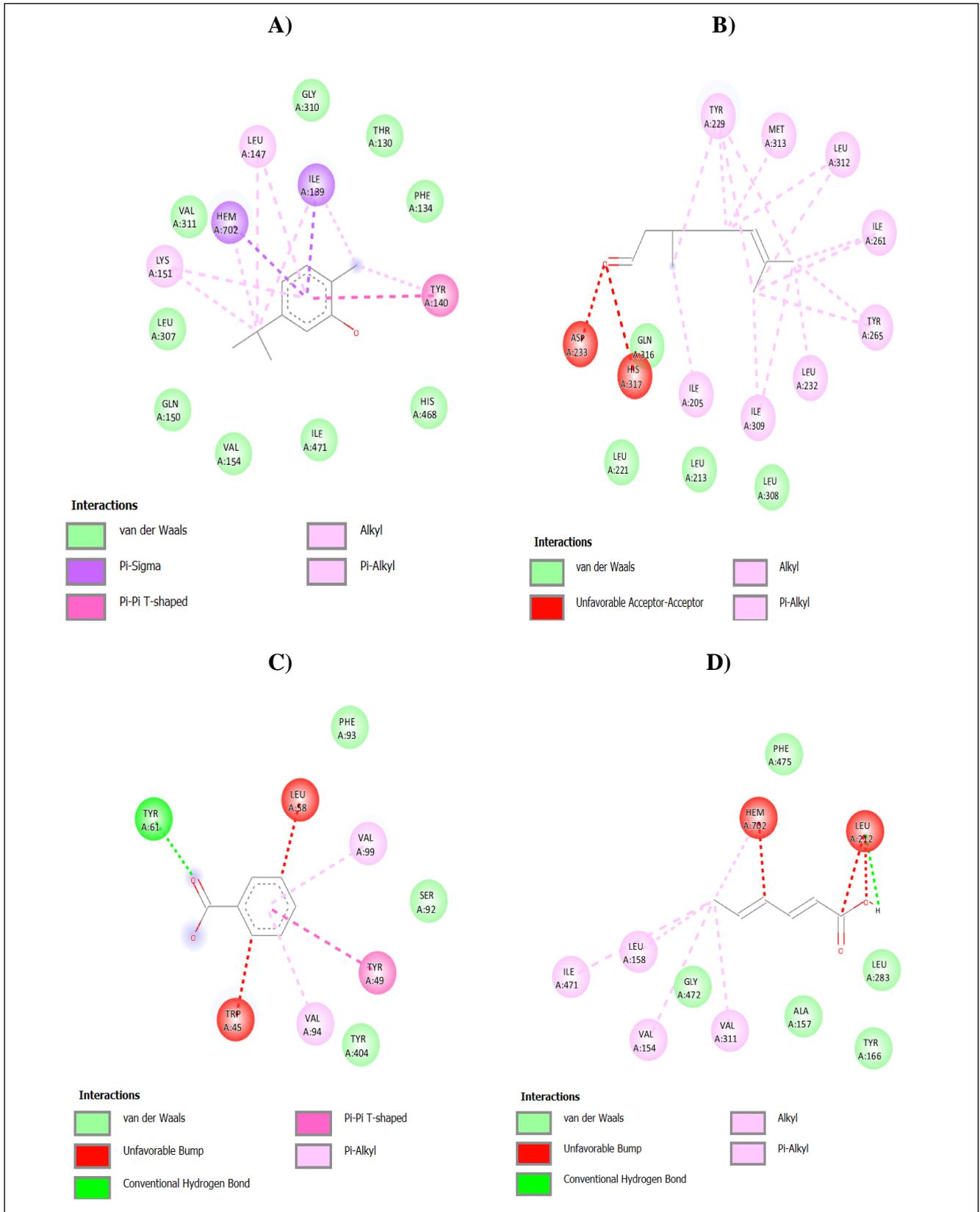


Figure 65 : Visualisation du docking moléculaire du carvacrol (A), du citronellal (B), du benzoate de sodium (C) et du sorbate de potassium (D) avec l'enzyme Stérol 14-déméthylase (ERG11) grâce au BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Tous les composés testés de l'HE du *T. vulgaris* sont actifs lorsqu'ils sont absorbés oralement du fait qu'ils respectent les critères des deux règles de Lipinski et de Veber. Par ailleurs le carvacrol, composé majoritaire de l'HE ne constitue pas un substrat pour le transporteur P-gp.

De plus, le carvacrol n'exerce pas un rôle inhibiteur pour quatre isoenzymes de la famille des cytochromes p450 (CYP) à l'exception du CYP1A2, ce qui peut créer des interactions médicamenteuses potentielles entraînant une action toxique (Azzam *et al.*, 2022). D'autant que les CYPs sont impliqués dans 50 à 90 % des processus de biotransformation des molécules thérapeutiques en vue de réduire l'accumulation de métabolites dans le sang/tissu afin d'éviter des risques de toxicité notamment hépatique (Mahanthesh *et al.*, 2020)

D'autre part, tous les composés testés de l'HE du *C. nardus* dont les trois majoritaires (le citronellal, le géranol et le citronello) sont actifs lorsqu'ils sont absorbés oralement. Sachant que ces molécules respectent les critères des deux règles de Lipinski et de Veber. Parmi ces dernières, le paramètre TPSA est un prédicteur remarquable des propriétés de transport des molécules thérapeutiques (l'absorption intestinale, la bonne biodisponibilité et la perméabilité) (Xu *et al.*, 2020). Dans la mesure où les molécules de faible poids moléculaire ont une meilleure tendance à diffuser et à être transporté à travers les membranes biologiques contrairement à celles de haut poids moléculaire (Srimai *et al.*, 2013).

Le docking moléculaire a indiqué une forte interaction du carvacrol avec les 3 enzymes (ERG 2, ERG3 et ERG 11) impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol. Toutefois, à notre connaissance, aucun travail d'amarrage moléculaire ne porte sur l'interaction du carvacrol avec l'ERG2 et l'ERG3. Alors qu'il en existe pour d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol chez des espèces autres que la *S. cerevisiae*.

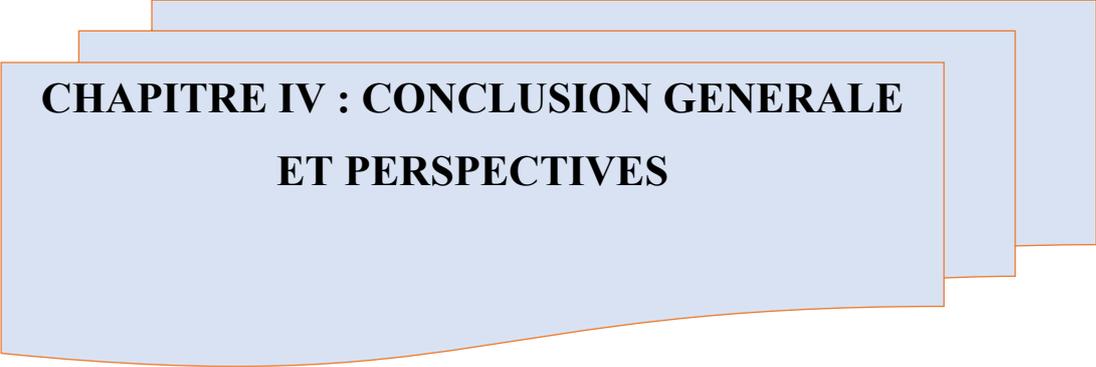
A titre d'exemple, Akermi *et al.* (2023) ont étudié le mode d'action du carvacrol avec l'enzyme lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase (ERG11) isolée de la souche *C. albicans*. Les résultats ont révélé un score énergétique largement négatif (-6,3 kcal/mol), ce qui indique une forte interaction du carvacrol avec l'ERG11. Cette interaction s'est faite principalement en raison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes entre le carvacrol et les enzymes ciblées (Khan *et al.*, 2020).

Le citronellal a aussi fortement interagi avec les trois enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol. Toutefois, aucune investigation antérieure ne porte sur l'interaction du citronellal avec l'ERG2 et l'ERG3. En revanche, il en existe quelques-unes sur d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol chez des souches différentes de la *S. cerevisiae*. A titre d'illustration, de Andrade Júnior *et al.* (2023) ont démontré la forte interaction du

citronellal avec l'enzyme ERG11 issues de l'espèce fongique *Trichophyton rubrum*. La molécule a interagi avec l'enzyme en exprimant un score énergétique négatif avec -4,60 kcal/mol.

Le docking moléculaire a confirmé que le carvacrol et le citronellal peuvent se lier aux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol. Dès lors, ces molécules vont entraîner l'inhibition de ces enzymes et empêcher la biotransformation du lanostérol et des molécules qui en découlent en ergostérol. Cela entraîne une accumulation de ces précurseurs stéroliques méthylés et une diminution de la quantité d'ergostérol dans la membrane cellulaire. Ces phénomènes provoquent l'affaiblissement de la structure et du fonctionnement de la membrane de la cellule fongique. (**Gouveia et al., 2023**).

De ce fait, les résultats du docking moléculaire sont cohérent avec les mécanismes d'action décrits par la littérature pour les molécules bioactives testées, qui sont connues pour avoir leur effet antifongique associé à la membrane (**de Andrade Júnior et al., 2023**).



**CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre de travaux de recherche menés par deux laboratoires, le laboratoire de recherche en technologie alimentaire, (Boumerdes, Alger) et le laboratoire ethnobotanique et substances naturelles (ENS, Kouba). Le premier laboratoire concentre ses efforts vers tous les travaux qui se rapportent au domaine alimentaire, tandis que le deuxième laboratoire focalise ces axes de recherche sur les produits d'origine naturelle et sur leurs activités biologiques. L'objectif de mon travail a été d'évaluer le potentiel emploi des deux huiles essentielles (HEs) du *Thymus vulgaris* et du *Cymbopogon nardus* comme conservateur nutraceutique de boissons.

Au cours de cette étude, nous avons tout d'abord effectué l'analyse chimique des composés volatils des deux HEs par GC/FID et GC/MS. Pour l'HE du *T. vulgaris*, nous avons constaté la très forte présence du carvacrol. Alors que pour l'HE du *C. nardus*, nous avons remarqué la prédominance du citronellal suivi du géraniol et du citronellol. Ces résultats font des deux HEs du *T. vulgaris* et *C. nardus* de très bonnes sources de molécules bioactives douées de propriétés pharmacologiques remarquables.

L'emploi des HEs à de fortes doses ou leur administration prolongée peut engendrer une toxicité importante à tous les niveaux de l'organisme. Compte tenu de la potentielle l'utilisation des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* dans le domaine alimentaire. Il est indispensable d'étudier les effets toxiques des deux HEs. C'est pour cette raison que la deuxième partie de notre travail est consacrée au test de l'effet toxicologique aiguë et cytotoxique des deux HEs étudiées. Les résultats ont indiqué que la DL50 de la toxicité orale aiguë des deux HES évaluée *in vivo* est supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel (p.c). Donc, les deux HEs ne sont pas mortelles aux doses testées selon la ligne directrice 423 de l'OCDE. Toutefois, l'étude histopathologique des deux HEs a montré des lésions au niveau hépatique, rénal et pulmonaire pour la dose maximale de 2000 mg/kg p.c. L'évaluation de la cytotoxicité des deux HEs en employant le test de viabilité cellulaire (MTT) a indiqué une faible cytotoxicité des deux HEs envers les deux lignées cellulaires testées (MDA et MCF-10A).

La troisième partie de notre travail se focalise sur l'évaluation *in vitro* des activités biologiques des HEs du *T. vulgaris* et *C. nardus* comprenant le pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique. Le potentiel antioxydant des deux HEs a été évalué et comparé en utilisant les deux méthodes suivantes : le test DPPH et le test ABTS. Nous avons remarqué que l'HE du *T. vulgaris* a présenté un puissant pouvoir antiradicalaire pour les deux tests ABTS et DPPH. Même si, l'HE étudiée a exhibé un effet antioxydant plus important pour le test ABTS en comparaison avec le test DPPH. En revanche, l'HE du *C. nardus* a présenté un faible pouvoir antioxydant pour les 2 méthodes. Cette différence de potentiel antioxydant est attribuée à la variation de la

composition chimique des HEs. Toutefois, le pouvoir antioxydant des deux HEs reste modeste en le comparant avec celui de l'antioxydant de référence (Vitamine C).

L'effet antibactérien des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* a été mis en évidence par deux tests celui de diffusion sur disque et vapeur vis-à-vis de 10 souches bactériennes. En outre, les CMI des HEs ont aussi été évaluées pour les souches bactériennes testées par la méthode de macrodilution sur gélose. Les phases liquide et vapeur des deux HEs ont présenté une très puissante action antibactérienne vis-à-vis de la majorité des souches testées qu'elles soient à Gram-positif ou négatif. Le pouvoir antifongique de la phase liquide et vapeur des deux HEs a aussi été investigué contre neuf souches fongiques, dont 5 levures et 4 moisissures. Les CMI des deux HEs ont aussi été déterminées pour les 9 souches fongiques testées. Nous avons constaté que la phase liquide et vapeur des deux HEs ont exhibé un effet fongicide très important contre toutes les souches testées.

Les effets nocifs des conservateurs alimentaires chimiques ont obligé les industriels à accorder une attention toute particulière à des sources plus naturelles et moins toxiques telles que les HEs. Ce qui nous a conduits dans la quatrième partie de notre travail à tester les deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* comme conservateur alimentaire dans les boissons. L'effet conservateur des deux HEs a été évalué dans un système alimentaire qui est une boisson commerciale à base d'agrumes (Orangina®) envers la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* d'origine alimentaire. Les HEs ont été utilisées à quatre concentrations différentes, seules et associées à un traitement thermique modéré (70 °C/2min) pendant une durée de stockage de 8 jours. Nous avons constaté que les deux HEs ont présenté un effet conservateur antifongique supérieur à celui des conservateurs chimiques envers la souche *S. cerevisiae* durant les 8 jours d'expérience. En revanche, le traitement thermique n'a pas induit un effet antifongique significativement supérieur en comparaison avec son absence. Ces résultats ouvrent une perspective intéressante pour l'utilisation des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* comme conservateurs nutraceutiques naturels de boissons.

Les deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* ont exercé un puissant effet fongicide envers la souche d'origine alimentaire *S. cerevisiae*. Toutefois, il est nécessaire de réaliser une étude de docking moléculaire afin de déterminer avec exactitude quel composé des deux HEs est actif envers la souche fongique et à quel niveau se fait cet effet.

De ce fait, dans la cinquième partie de notre étude, nous avons étudié *in silico* les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des composés des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* en utilisant la plateforme SWISSADME. Les résultats ont indiqué que les composés majoritaires des deux HEs sont actifs lorsqu'ils sont absorbés oralement. En outre, nous avons

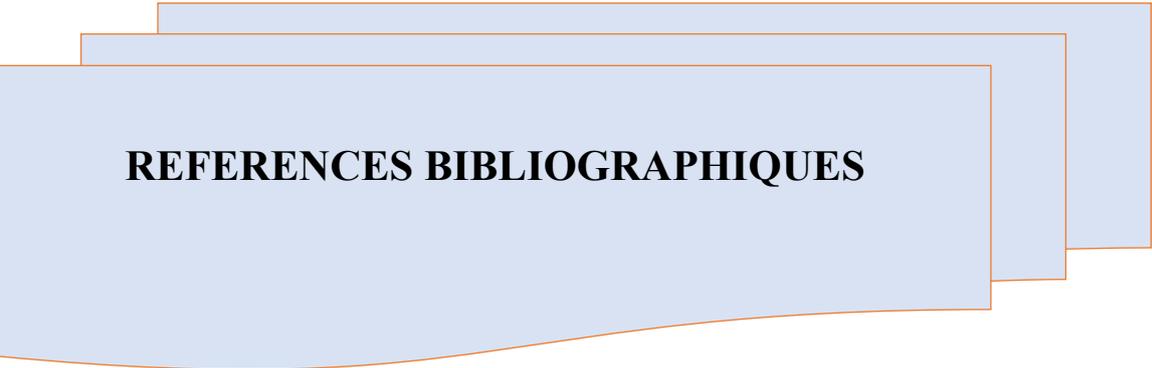
investigué l'interaction et l'affinité des principaux phytoconstituants des deux HEs (citronellal et carvacrol) avec l'ergostérol. Ce dernier est un composé essentiel de la membrane plasmique des souches fongiques. Le docking a été réalisé envers trois enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol chez la souche *S. cerevisiae*. En outre, deux conservateurs chimiques (le benzoate de sodium et le sorbate de potassium) ont aussi été choisis comme ligands et testés. L'expérience a indiqué que le carvacrol et le citronellal ont fortement interagi avec les 3 enzymes testées, ce qui conduit forcément à l'inhibition de leur action enzymatique. Cette inhibition conduit au blocage de la biosynthèse de l'ergostérol et donc à l'accumulation de son précurseur le lanostérol au niveau cellulaire et donc à la mort de la cellule fongique. Ces résultats permettent de conclure que le mode d'action antifongique des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* vis-à-vis de l'espèce *S. cerevisiae* est associé à la membrane plasmique et plus précisément au niveau de la biosynthèse de l'ergostérol.

En perspective, les résultats obtenus lors de cette étude, nous encouragent à :

- ✚ Envisager de tester les deux HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* dans le même système alimentaire, mais envers d'autres espèces de champignons et de bactéries contaminant fréquemment les boissons. Parmi les souches à tester, nous pouvons citer les souches fongiques *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxi*, ou encore l'espèce bactérienne *Salmonella typhimurium*
- ✚ Evaluer les potentielles interactions entre les composés des deux HEs étudiées et ceux présents dans la boisson testée (Orangina®).
- ✚ Envisager la nanoencapsulation comme forme finale de commercialisation des HEs testées, en utilisant des techniques appropriées à un usage alimentaire. Ces techniques comprennent le séchage par atomisation, l'émulsification ou la gélification ionique. De plus, cette nanoencapsulation doit être effectuée avec un matériau biodégradable approprié (par exemple, le chitosane).
- ✚ Effectuer une analyse sensorielle complète des propriétés organoleptiques des boissons après incorporation des HEs.
- ✚ Approfondir les tests de toxicité *in vivo* incluant l'évaluation de la toxicité subchronique, et même chronique des HEs.
- ✚ Elargir l'évaluation de la cytotoxicité des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* à d'autres lignées cellulaires et établir une la cinétique de l'évolution de la cytotoxicité des deux HEs en fonction du temps.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

- ✚ Evaluer *in silico* les propriétés toxicologiques des molécules volatiles des deux HEs grâce à des plateformes comme Admetlab ou Pkcsm.
- ✚ Réaliser un docking moléculaire entre les composés majoritaires des deux HEs avec d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol et envers d'autres cibles cellulaires.
- ✚ Effectuer des analyses protéomiques et transcriptomiques sur les HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* afin de mieux comprendre les voies ciblées et les mécanismes d'action des composés de ces HEs.
- ✚ Explorer les effets bénéfiques potentiels des HEs du *T. vulgaris* et du *C. nardus* sur la flore microbienne intestinale. D'autant que des travaux précédents traitant de cette thématique de recherche, sont très intéressants et prometteurs.



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### -A-

- Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2017). Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian *Thymus vulgaris* Essential Oil. *Natural Product Communications*, 12(4), 1934578X1701200.
- Abdesselam, Z. (2006). Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News*, 6-16.
- Abishad, P., Niveditha, P., Unni, V., Vergis, J., Kurkure, N. V., Chaudhari, S., Rawool, D. B., & Barbuddhe, S. B. (2021). *In silico* molecular docking and *in vitro* antimicrobial efficacy of phytochemicals against multi-drug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* and non-typhoidal *Salmonella* spp. *Gut Pathogens*, 13(1).
- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectrometry. *Carol Stream: Allured Publishing Corporation*.
- ADMETlab 2.0 [Internet]. [cité 29 avr 2022]. Disponible sur: <https://admetmesh.scbdd.com>.
- Afnor (1989). *Recueil de normes françaises, " huiles essentielles"*. AFNOR, 3ème Edition, Paris,609.
- Aguiar, R. W. D. S., Ootani, M. A., Ascencio, S. D., Ferreira, T. P., Santos, M. M. D., & Santos, G. R. D. (2014). Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 492138.
- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(1), 41–50.
- Akhila, A. (2010). Chemistry and biogenesis of essential oil from the genus *Cymbopogon*. *Essential Oil-Bearing Grasses: The Genus Cymbopogon; Akhila, A., Ed*, 25-106.
- Al-Fatlawi, A. A., & Ahmad, A. (2014). Cytotoxicity and pro-apoptotic activity of carvacrol on human breast cancer cell line MCF-7. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1218-1223.
- Al-Fatlawi, A. A., Al-fatlawi, A. A., Zafaryab, M., Irshad, M., Ahmad, I. R. F. A. N., Kazim, Z., ... & Rizvi, M. M. A. (2014). Rhein induced cell death and apoptosis through caspase dependent and associated with modulation of p53, bcl-2/bax ratio in human cell lines. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 215219.
- Aljabeili, H. S., Barakat, H., & Abdel-Rahman, H. A. (2018). Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Thyme Essential Oil (*Thymus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*, 09(05), 433–446.
- Al-Mansori, B., El-Ageeli, W. H., Alsagheer, S. H., & Ben-Khayal, F. a. F. (2020). Antioxidant activity- synergistic effects of thymol and carvacrol. *Al-Mukhtar Journal of Sciences*, 35(3), 185–194.
- Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Lawati, A. A. A., & Khan, S. A. (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil

## Références bibliographiques

- along with *in silico* studies of its major constituent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 1021–1028.
- Amara, I., Timoumi, R., Annabi, E., Othmène, Y. B., & Abid-Essefi, S. (2022). The protective effects of thymol and carvacrol against di (2-ethylhexyl) phthalate-induced cytotoxicity in HEK-293 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(8).
- Andersen, R. A., Snyder, L. H., Bradley, D. C., & Xing, J. (1997). Multimodal representation of space in the posterior parietal cortex and its use in planning movements. *Annual Review of Neuroscience*, 20(1), 303–330.
- Andrade, B. F. M. T., Barbosa, L. N., Alves, F. C. B., Albano, M., Rall, V. L. M., Sforcin, J. M., Fernandes, A. a. H., & Júnior, A. F. (2015b). The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martini* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. *Journal of Essential Oil Research*, 28(3), 227–233.
- Angž, S., & Ožuzhan, P. (2013). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on chemical and microbiological properties of fresh rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during storage at refrigerator temperatures. *African Journal of Microbiology Research*, 7(13), 1136–1143.
- Arfa, A. B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154.
- Argueso, J. L., Carazzolle, M. F., Mieczkowski, P. A., Duarte, F. M., Netto, O. V., Missawa, S. K., Galzerani, F., Costa, G. G., Vidal, R. O., Noronha, M. F., Dominska, M., Andrietta, M. G., Andrietta, S. R., Cunha, A. F., Gomes, L. H., Tavares, F. C., Alcarde, A. R., Dietrich, F. S., McCusker, J. H., . . . Pereira, G. A. (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Carolina Digital Repository (University of North Carolina at Chapel Hill)*.
- Arpino, P. J., & Haas, P. (1995). Recent developments in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry coupling. *Journal of Chromatography A*, 703(1-2), 479-488.
- Arthington, B. A., Bennett, L. G., Skatrud, P. L., Guynn, C. J., Barbuch, R. J., Ulbright, C. E., & Bard, M. (1991). Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene*, 102(1), 39–44.
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8–9), 581–588.
- Atkins, P. W., & De Paula, M. J. (2013). *Chimie physique*. De Boeck Supérieur.
- Aurélien, G. (2007). *Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives*. [Thèse de Doctorat], Université Joseph Fourier - Faculté de pharmacie de Grenoble, 17.

## Références bibliographiques

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Azzam, K. M. A., Negim, E., & Aboul-Enein, H. Y. (2022). ADME studies of TUG-770 (a GPR-40 inhibitor agonist) for the treatment of type 2 diabetes using SwissADME predictor: *In silico* study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 159-169.

### -B-

- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4).
- Baker, F. C., & Schooley, D. A. (1981). Biosynthesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, 3-hydroxy-3-ethylglutaryl-CoA, mevalonate and homomevalonate by insect corpus allatum and mammalian hepatic tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 664(2), 356-372.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2017). Assessment of antioxidant and antibacterial properties on meat homogenates of essential oils obtained from four *Thymus* species achieved from organic growth. *Foods*, 6(8), 59.
- Basson, M. E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R. M., & Rine, J. (1988). Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Molecular and cellular biology*, 8(9), 3797-3808.
- Basu, A., & Haldar, S. (1998). The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular human reproduction*, 4(12), 1099-1109.
- Bateman, B., Warner, J. O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., ... & Stevenson, J. (2004). The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of disease in childhood*, 89(6), 506-511.
- Bayala, B., Coulibaly, A. Y., Djigma, F. W., Nagalo, B. M., Baron, S., Figueredo, G., Lobaccaro, J. A., & Simpore, J. (2020). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of the essential oil of *Cymbopogon nardus*, a plant used in traditional medicine. *BioMolecular Concepts*, 11(1), 86-96.
- Begrow, F., Engelbertz, J., Feistel, B., Lehnfeld, R., Bauer, K., & Verspohl, E. J. (2010). Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta medica*, 76(04), 311-318.
- Belletti, N., Kamdem, S. S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2010). Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based

## Références bibliographiques

- beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 283–289.
- Belvisi, M. G., Dubuis, E., & Birrell, M. A. (2011). Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. *Chest*, 140(4), 1040-1047.
- Beneke, E. S., & Fabian, F. W. (1955). Sorbic acid as a fungistatic agent at different pH levels for molds isolated from strawberries and tomatoes. *Food Technology*, 9(10), 486-488.
- benzene from benzoic acid in foods. Expert Opinion no. 013/206
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Blank, A. F., Costa, A. G., Arrigoni-Blank, M. D. F., Cavalcanti, S. C., Alves, P. B., Innecco, R., ... & Sousa, I. F. D. (2007). Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 557-564.
- Blank, A. F., Costa, A. G., De Fátima Arrigoni-Blank, M., De Holanda Cavalcanti, S. C., Alves, P. B., Innecco, R., Ehlert, P. a. D., & De Sousa, I. F. (2007). Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 17(4), 557–564.
- Böhm, H. (1994). The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 8(3), 243–256.
- Böhm, H. J. (1992). LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., ... & Weber, P. (2013). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations*, 19, 133-142. leads. *Journal of computer-aided molecular design*, 6, 593-606.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *PubMed*, 7 Spec No. 3, 56–60.
- Boukhatem, M. N., Darwish, N. H. E., Sudha, T., Bahlouli, S., Kellou, D., Benelmouffok, A. B., Chader, H., Rajabi, M., Benali, Y., & Mousa, S. A. (2020). *In Vitro* Antifungal and Topical Anti-Inflammatory Properties of Essential Oil from Wild-Growing *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) Used for Medicinal Purposes in Algeria: A New Source of Carvacrol. *Scientia Pharmaceutica*, 88(3), 33.
- Bourgeois C.M. (1984) Additifs conservateurs (antibactériens, antifongiques) in Multon J.L., Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires, Paris, Ed. Apria, 143-159.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 28(1), 25–30.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4), 221-247.

## Références bibliographiques

- Bruneton, J. P. (1993). *Phytochimie, Plantes médicinales*, 2<sup>ème</sup> éd. Paris: *Technique et Documentation Lavoisier, Paris*. 915p.
- Brut, M. (2009). *Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques: les Modes Statiques* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Burt, S. A., Van Der Zee, R., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490.
- C-
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., & Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 19679-19682.
- Calisto, B. M., Perez-Gil, J., Bergua, M., Querol-Audi, J., Fita, I., & Imperial, S. (2007). Biosynthesis of isoprenoids in plants: Structure of the 2C-methyl-d-erithrytol 2, 4-cyclodiphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Comparison with the bacterial enzymes. *Protein Science*, 16(9), 2082-2088.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., & Fenart, L. (2007). Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*, 6(8), 650-661.
- Chen, J. H., & Ho, C. T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(7), 2374-2378.
- Chen, Q., Xu, S., Wu, T., Guo, J., Sha, S., Zheng, X., & Yu, T. (2014). Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2441–2447.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 70(9), R142–R159.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential oils of *satureja*, *origanum*, and *thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261–8267.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Christianson, D. W. (2007). Roots of biosynthetic diversity. *Science*, 316(5821), 60-61.

## Références bibliographiques

- Chroho, M., Roupael, Y., Petropoulos, S. A., & Bouissane, L. (2024). Carvacrol and Thymol Content Affects the Antioxidant and Antibacterial Activity of *Origanum compactum* and *Thymus zygis* Essential Oils. *Antibiotics*, 13(2), 139.
- Clain, E., Baranauskienė, R., Kraujalis, P., Šipailienė, A., Maždzierienė, R., Kazernavičiūtė, R., Kalamouni, C. E., & Venskutonis, P. R. (2018). Biorefining of *Cymbopogon nardus* from Reunion Island into essential oil and antioxidant fractions by conventional and high-pressure extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 126, 158–167.
- Clayton, W.D. (2008). GrassBase-The Online World Grass Flora. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
- Codex Alimentarius. (1989). Additifs alimentaires, version abrégée, division 3.
- Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A., & Blasi, C. (2005). *An annotated checklist of the Italian vascular flora* (pp. 1-420). Palombi.
- Copetti, M. V. (2019). Fungi as industrial producers of food ingredients. *Current opinion in food science*, 25, 52-56.
- Crespo, R., Rodenak-Kladniew, B. E., Castro, M. A., Soberón, M. V., & Lavarías, S. M. (2020). Induction of oxidative stress as a possible mechanism by which geraniol affects the proliferation of human A549 and HepG2 tumor cells. *Chemico-Biological Interactions*, 320, 109029.
- Crues, W. V., & Irish, J. H. (1932). Further Observations on the Relation of pH Value to Toxicity of Preservatives to Microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 23(2), 163-166.
- Cunha, B. G., Duque, C., Caiaffa, K. S., Massunari, L., Catanoze, I. A., Dos Santos, D. M., ... & Guiotti, A. M. (2020). Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Archives of oral biology*, 109, 104577.
- Cunningham Jr, F. X., Lafond, T. P., & Gantt, E. (2000). Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5841-5848.

### -D-

- Da Cruz Almeida, E. T., de Souza, G. T., de Sousa Guedes, J. P., Barbosa, I. M., de Sousa, C. P., Castellano, L. R. C., ... & de Souza, E. L. (2019). *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food microbiology*, 82, 20-29.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1).
- Dash, K. T., Jena, S., Ray, A., Sahoo, A., Kar, S. K., Sahoo, R. K., Subudhi, E., Panda, P. C., & Nayak, S. (2021b). Chemical Composition of Carvacrol Rich Leaf Essential Oil of *Thymus*

## Références bibliographiques

- vulgaris* from India: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Potential. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(5), 1134–1145.
- De Andrade Júnior, F. P., Gouveia, R. G., Medeiros, C. I. S., De Almeida Teixeira, B., Da Silva Farias, B. K., Da Rocha Oliveira, N., De Figuerêdo Silva, D., & De Oliveira Lima, E. (2023). Antifungal activity of citronellal against *Trichophyton rubrum* and its predictive mechanism of action by CYP51 inhibition through molecular docking. *Natural Product Research*, 1–9.
- De Lira Mota, K. S., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., Lima, I. O., & De Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. *Molecules*, 17(12), 14418–14433.
- De Maack, F., & Sablier, M. (1994). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 3(P2614), P2614-1.
- De Toledo, L., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, É., Zocolo, G., Silva, F., Soares, T., Santos, A. D., Bauab, T., & De Almeida, M. (2016). Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1252.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., & Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7–8), 801–804.
- Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts*. CRC press.
- Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005d). *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques* (pp. 87-108). Editions Tec & Doc.
- Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005b). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques, 45-60
- Deschepper, R. (2017). *Viabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie*. [Doctorat en pharmacie].
- Deuel, H. J., Alfin-Slater, R., Weil, C. S., & Smyth, H. J. (1954). Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component.
- Dhe-Paganon, S., Magrath, J., & Abeles, R. H. (1994). Mechanism of mevalonate pyrophosphate decarboxylase: evidence for a carbocationic transition state. *Biochemistry*, 33(45), 13355-13362.
- Directorate Agricultural Information Services. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries Private Bag X144, Pretoria, 0001 South Africa. 2009
- Dugo, G., & Di Giacomo, A. (Eds.). (2002). *Citrus: the genus citrus*. CRC Press.

-E-

## Références bibliographiques

- Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Chabani, Z., Farag, M. A., & Domínguez, R. (2021). Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: methods and applications. *Molecules*, 26(13), 3880.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 1401-1426.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
- El Hattabi, L., Talbaoui, A., Amzazi, S., Bakri, Y., Harhar, H., Costa, J., & Tabyaoui, M. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of three essential oils from south of Morocco (*Thymus satureoides*, *Thymus vulgaris* and *Chamaelum nobilis*). *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(9), 3110-3117.
- Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., & Capiod, T. (2004). The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell calcium*, 36(6), 459-467.

### -F-

- Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevao-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., ... & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(1), 657026.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Federal Institute for Risk Assessment. (2005). Indication of the possible formation of benzene from benzoic acid in foods. Expert Opinion no. 013/206 [http://www.bfr.bund.de/cm/245/indications\\_of\\_the\\_possible\\_formation\\_of\\_benzene\\_from\\_benzoic\\_acid\\_in\\_foods](http://www.bfr.bund.de/cm/245/indications_of_the_possible_formation_of_benzene_from_benzoic_acid_in_foods).
- Ferrara, P., Gohlke, H., Price, D. J., Klebe, G., & Brooks, C. L. (2004). Assessing scoring functions for Protein–Ligand interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(12), 3032–3047.
- Finar, I. L. (1994). Organic chemistry. Ed. *Longman Scientific et Technical*, 2, 354p.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232–1240.
- Franchomme, P., & Penoël, D. (1990). L'aromathérapie exactement. *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. Limoges.

### -G-

## Références bibliographiques

- Gabb, H. A., Jackson, R. M., & Sternberg, M. J. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *Journal of Molecular Biology*, 272(1), 106–120.
- Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., Ďúranová, H., Kowalczewski, P. Ł., Čmiková, N., & Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants*, 10(9), 1959.
- Garber, G. (2001). An overview of fungal infections. *Drugs*, 61(Suppl 1), 1-12.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.
- Garzoli, S., Masci, V. L., Ovidi, E., Turchetti, G., Zago, D., & Tiezzi, A. (2019). Chemical Investigation of a Biologically Active *Schinus molle* L. Leaf Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1–6.
- Gaspers, L. D., & Thomas, A. P. (2005). Calcium signaling in liver. *Cell calcium*, 38(3-4), 329-342.
- Gerschel, A. (1995). *Liaisons intermoléculaires : les forces en jeu dans la matière condensée* (p. 288). EDP SCIENCES.
- Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., & Bozin, B. (2015). Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils, thymol and carvacrol and their possible synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4), 1013–1021.
- Gibson, D. J. (2009). *Grasses and grassland ecology*. Oxford University Press.
- Gill, A., & Holley, R. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170–174.
- Giménez-Martínez, P., Ramirez, C., Mitton, G., Arcerito, F. M., Ramos, F., Cooley, H., Fuselli, S., & Maggi, M. (2022). Lethal concentrations of *Cymbopogon nardus* essential oils and their main component citronellal on *Varroa destructor* and *Apis mellifera*. *Experimental Parasitology*, 238, 108279.
- Gohlke, H., & Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(15), 2644-2676.
- Gouveia, R. G., Oliveira, N. R., Andrade-Júnior, F., Ferreira, R. C., Amorim, G. M. W., Silva, D. K. F., Duarte, S. S., Medeiros, C. I. S., Oliveira-Filho, A. A., & Lima, E. O. (2023). Antifungal effect of (R) and (S)-citronellal enantiomers and their predictive mechanism of action on *Candida albicans* from voriconazole-resistant onychomycoses. *Brazilian Journal of Biology*, 83.
- Grespan, R., Aguiar, R. P., Giubilei, F. N., Fuso, R. R., Damião, M. J., Silva, E. L., Mikcha, J. G., Hernandes, L., Amado, C. B., & Cuman, R. K. N. (2014). Hepatoprotective effect of

## Références bibliographiques

- pretreatment with *Thymus vulgaris* Essential oil in experimental model of Acetaminophen-Induced injury. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–8.
- Griffith, A. D., Cyr, D. M., Egan, S. G., & Tremblay, G. C. (1989). Inhibition of pyruvate carboxylase by sequestration of coenzyme A with sodium benzoate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 269(1), 201-207.
- Grover, R. K., & Moore, J. D. (1962). Toximetric Studies of fungicides against the brown rot organisms, *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa*.
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471.
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, 19(3), 141-158.

### -H-

- Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K., Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2005). Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of experimental botany*, 56(410), 219-243.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990.
- Hamzah, M. H., Man, H. C., Abidin, Z. Z., & Jamaludin, H. (2014). Comparison of Citronella Oil Extraction Methods from *Cymbopogon nardus* Grass by Ohmic-heated Hydro-distillation, Hydro-Distillation, and Steam Distillation. *BioResources*, 9(1).
- Harrington, G. N., & Pratchett, D. (1974). Stocking rate trials in Ankole, Uganda: II. Botanical analysis and oesophageal fistula sampling of pastures grazed at different stocking rates. *The Journal of Agricultural Science*, 82(3), 507–516.
- Harrington, G. N., & Pratchett, D. (1974). Stocking rate trials in Ankole, Uganda: I. Weight gain of Ankole steers at intermediate and heavy stocking rates under different managements. *The Journal of Agricultural Science*, 82(3), 497-506.
- Hartland, R. P., Vermeulen, C. A., Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H., & Klis, F. M. (1994). The linkage of (1–3) - $\beta$ -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(12), 1591–1599.
- Hartman, P. E. (1983). Putative mutagens and carcinogens in foods. II: Sorbate and sorbate-nitrite interactions. *Environmental Mutagenesis*, 5(2), 217-222.
- Hashim, S., & Gamil, M. (1988). Plants and herbs between the Iraqi folk medicine and scientific research. *Baghdad, Dar revolution of Press and Publication*.

## Références bibliographiques

- Helander, I. M., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-Negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595.
- Hennebelle, T. (2006). *Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants : Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées)*.
- Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., ... & Rohdich, F. (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2486-2490.
- Hittinger, C. T., Steele, J. L., & Ryder, D. S. (2018). Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 199–206.
- Ho, Y., Suphrom, N., Daowtak, K., Potup, P., Thongsri, Y., & Usuwanthim, K. (2020). Anticancer Effect of *Citrus hystrix* DC. Leaf Extract and Its Bioactive Constituents Citronellol and, Citronellal on the Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. *Pharmaceuticals*, 13(12), 476.
- <https://bioinfo-fr.net/la-modelisation-moleculaire>.
- [https://powo.science.kew.org/World Flora Online Data](https://powo.science.kew.org/World%20Flora%20Online%20Data). 2023
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., & Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian journal of microbiology*, 57, 270-277.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- I-**
- IARC, Agents classified by the IARC monographs. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (9 Dec 2019).
- Igual, J. C., Gonzalez-Bosch, C., Dopazo, J., & Pérez-Ortín, J. E. (1992). Phylogenetic analysis of the thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *Journal of molecular evolution*, 35, 147-155.
- Iijima, Y., Koeduka, T., Suzuki, H., & Kubota, K. (2014c). Biosynthesis of geranial, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): Molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase. *Plant Biotechnology*, 31(5), 525–534.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565–573.

## Références bibliographiques

- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic press (2e édition), Londres.
- Iten, F., Saller, R., Abel, G., & Reichling, J. (2009). Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* – chemotype carvacrol. *Planta Medica*, 75(09).

### -J-

- Jiang, K., Zhang, T., Yin, N., Ma, X., Zhao, G., Wu, H., Qiu, C., & Deng, G. (2017). Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis. *Oncotarget*, 8(41), 71038–71053.
- Jordá, T., & Puig, S. (2020). Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), 795.

### -K-

- Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Katz, T. M., Miller, J. H., & Hebert, A. A. (2008). Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), 865-871.
- Kaur, H., Bhardwaj, U., & Kaur, R. (2021). *Cymbopogon nardus* essential oil: A comprehensive review on its chemistry and bioactivity. *Journal of Essential Oil Research*, 33(3), 205-220.
- Keefover-Ring, K., Thompson, J. D., & Linhart, Y. B. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(3), 117–122.
- Khalaf, A. N., & Abed, I. J. (2021). Evaluating the in vitro cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil on MCF-7 and HeLa cancer cell lines. *Iraqi Journal of Science*, 2862-2871.
- Khan, I., Bahuguna, A., Shukla, S., Aziz, F., Chauhan, A. K., Ansari, M. B., Bajpai, V. K., Huh, Y. S., & Kang, S. C. (2020). Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104046.
- Khan, I., Bhardwaj, M., Shukla, S., Min, S., Choi, D. K., Bajpai, V. K., Huh, Y. S., & Kang, S. C. (2019). Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110582.
- Khodavandi, A., Alizadeh, F., & Sanaee, T. (2018). Antifungal Activity of Carvacrol on Ergosterol Synthesis in Multidrug Resistant *Candida albicans*. *Hormozgan Medical Journal*, 22(2), 113–121.
- Kim, D. Y., Stauffacher, C. V., & Rodwell, V. W. (2000). Dual coenzyme specificity of *Archaeoglobus fulgidus* HMG-CoA reductase. *Protein Science*, 9(6), 1226-1234.

## Références bibliographiques

- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., & Bryant, S. H. (2015). PUG-SOAP and PUG-REST: web services for programmatic access to chemical information in PubChem. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W605–W611.
- Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J. P., & Nicod, L. (2009). *In vitro* cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 4(1), 29-34.
- Kokkini, S., Karousou, R., & Hanlidou, E. (2003). HERBS| Herbs of the Labiatae. University, Thessaloniki, Greece Copyright 2003, Elsevier Science Ltd. All Rights Reserved.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A., & Cheatham, T. E. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research*, 33(12), 889–897.
- König, W. A., Hochmuth, D. H., & Joulain, D. (2001). Terpenoids and related constituents of essential oils, library of massfinder 2.1. *Institute of Organic Chemistry, Hamburg*.
- Koparal, A. T., & Zeytinoglu, M. (2003). Effects of Carvacrol on a human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43(1–3), 149–154.
- Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., Accrombessi, G., Frédéricich, M., Moudachirou, M., & Quetin-Leclercq, J. (2014). Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 652–659.
- Krause, S. T., Liao, P., Crocoll, C., Boachon, B., Förster, C., Leidecker, F., Wiese, N., Zhao, D., Wood, J. C., Buell, C. R., Gershenzon, J., Dudareva, N., & Degenhardt, J. (2021). The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(52).
- Kuzu, B., Cüce, G., Ayan, İ. Ç., Gültekin, B., Canbaz, H. T., Dursun, H. G., ... & Kalkan, S. S. (2021). Evaluation of apoptosis pathway of geraniol on Ishikawa cells. *Nutrition and Cancer*, 73(11-12), 2532-2537.

### -L-

- Lagarto, A., Tillán, J., Bueno, V., Chávez, I., Guerra, I., Vega, Y., ... & Gabilondo, T. (2005). Acute oral and subchronic toxicity in rats of a lyophilized aqueous extract of *Ocimum tenuiflorum* L. *Revista de toxicología*, 22(3), 175-179.
- Leach, A. R., & Kuntz, I. D. (1992). Conformational analysis of flexible ligands in macromolecular receptor sites. *Journal of Computational Chemistry*, 13(6), 730–748.

## Références bibliographiques

- Lee, S. P., Buber, M. T., Yang, Q., Cerne, R., Cortés, R. Y., Sprous, D. G., & Bryant, R. W. (2008). Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *British Journal of Pharmacology*, 153(8), 1739–1749.
- Lee, K. J., Oh, Y. C., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 165457.
- Lemos, M. F., Lemos, M. F., Pacheco, H. P., Guimarães, A. C., Fronza, M., Endringer, D. C., & Scherer, R. (2017). Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 95, 543–548.
- Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6(3), 402-406.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2014). *Essential oils as reagents in green chemistry* (Vol. 1, pp. 71-78). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). THE 1-deoxy-D-Xululose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 47–65.
- Lima, I. O., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., De Oliveira Lima, E., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & De Fátima Formiga Melo Diniz, M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1–3), 3–25.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Liu, J. F., Xia, J. J., Nie, K. L., Wang, F., & Deng, L. (2019). Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-8.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., & Cameán, A. M. (2014). Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food and chemical toxicology*, 64, 281-290.
- Lluch, M. A., Masferrer, A., Arró, M., Boronat, A., & Ferrer, A. (2000). Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 42, 365-376.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732–1738.

## Références bibliographiques

- Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (1993). Yeasts in food spoilage. *R. Macrae, RK Robinson & MJ Sadler, Encyclopaedia of food science technology and nutrition*, 7, 4344-4349.
- Lu, Y., Khoo, T. J., & Wiart, C. (2014). Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. *Pharmacology & Pharmacy*, 5(04), 395-400.
- Luskey, K. L., & Stevens, B. (1985). Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 260(18), 10271-10277.

### -M-

- Maßberg, D., Simon, A., Häussinger, D., Keitel, V., Gisselmann, G., Conrad, H., & Hatt, H. (2015). Monoterpene (–)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*, 566, 100-109.
- Maier, E., Kurz, K., Jenny, M., Schennach, H., Ueberall, F., & Fuchs, D. (2010). Food preservatives sodium benzoate and propionic acid and colorant curcumin suppress Th1-type immune response in vitro. *Food and chemical toxicology*, 48(7), 1950-1956.
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., & Aksoy, H. (2012). Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes *in vitro*. *Cytotechnology*, 64, 553-562.
- Mann, C., Cox, S., & Markham, J. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 294–297.
- Masci, V. L., Stefanoni, D., D'Alessandro, A., Zambelli, M., Modesti, L., Pollini, D., ... & Tiezzi, A. (2023). Induction of Drug-Resistance and Production of a Culture Medium Able to Induce Drug-Resistance in Vinblastine Untreated Murine Myeloma Cells. *Molecules*, 28(5), 2051.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.
- McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 1034-1053.
- McLafferty, F. W. (1992). Neutralization-reionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 118, 221-235.
- McLafferty, F. W., & Turecek, F. (1993). *Interpretation of mass spectra*. University science books.

## Références bibliographiques

- McLaren, S. H., Gao, D., Chen, L., Lin, R., Eshleman, J. R., Dawson, V., ... & Wei, C. (2006). Oxidative stress and DNA damage–DNA repair system in vascular smooth muscle cells in artery and vein grafts. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research*, 1(1), 59-72.
- Mehdi, S. J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., & Rizvi, M. M. A. (2011). Cytotoxic effect of Carvacrol on human cervical cancer cells. *Biology and Medicine*, 3(2), 307-312.
- Miladi, H., Slama, R. B., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens.
- Miller, R. E., McConville, M. J., & Woodrow, I. E. (2006). Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 67(1), 43-51.
- Mishra, A. K., & Dubey, N. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and environmental microbiology*, 60(4), 1101-1105.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme* (pp. 15-57). CRC press.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mahanthesh, M., Ranjith, D. R., Raghavendra, Y., Jyothi, R., Narappa, .G, & Ravi M.V. (2020). Swiss ADME prediction of phytochemicals present in *Butea monosperma* (Lam.) Taub. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3), 1799–1809.
- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., Bérغامo Alves, F. C., Albano, M., Mores Rall, V. L., Sforcin, J. M., ... & Fernandes Júnior, A. (2016). The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. *Journal of Essential oil research*, 28(3), 227-233.

### -N-

- Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., & Michel, G. (1996). Comparison of Antimicrobial Properties of Monoterpenes and their Carbonylated Products. *Planta Medica*, 62(03), 275–277.
- National Institute of Standards and Technology. (2014). PC version of the mass spectral library.
- Newall, C. A., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (1996). *Herbal medicines. A guide for health-care professionals*, 256–257.
- Nicolas, V. (1991). Huiles essentielles : Production mondiale, échanges internationaux et évaluation des prix. 10ième journée internationale des huiles essentielles. *Actes, Ravista italiana Eppos*, 534-539.

## Références bibliographiques

-Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F. C., Carle, R., & Schnitzler, P. (2006). Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against *Herpes simplex* virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Planta medica*, 72(15), 1378-1382.

-O-

-Ouedraogo, I., Sawadogo, A., Nebie, R. C., & Dakouo, D. (2016). Evaluation de la toxicité des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* (L) et *Ocimum gratissimum* (L) contre *Sitophilus zeamais* Motsch et *Rhyzopertha dominica* F, les principaux insectes nuisibles au maïs en stockage. . . *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(2), 695.

-OuYang, Q., Liu, Y., Oketch, O. R., Zhang, M., Shao, X., & Tao, N. (2021). Citronellal Exerts Its Antifungal Activity by Targeting Ergosterol Biosynthesis in *Penicillium digitatum*. *Journal of Fungi*, 7(6), 432.

-Park, S., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D., & Kook, J. (2012). Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 18(3), 369–372.

-Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.

-Pauli, A., & Schilcher, H. (2010). 12 *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. *ESSENTIAL*, 353.

-Paolini, J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*.

-Pavan, B., Dalpiaz, A., Marani, L., Beggiato, S., Ferraro, L., Canistro, D., Paolini, M., Vivarelli, F., Valerii, M. C., Comparone, A., De Fazio, L., & Spisni, E. (2018). Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on the liver antioxidant and Xenobiotic-Metabolizing enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 9.

-Phillips, M. A., & Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science*, 4(5), 184-190.

-Pignatti, S. (1982). New species of *Limonium* from Italy and Tunisia. *Webbia*, 36(1), 47-56.

-Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-De-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., & Martinez-De-Oliveira, J. (2003). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73–78.

-pkCSM [Internet]. [cité <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/> 29 avr 2022]. Disponible sur: <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>

-Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT*, 36(7), 679–684.

## Références bibliographiques

- Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., De Carvalho, M. G., Júnior, F. E. a. C., & Cavalcante, T. T. A. (2018). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 633–639.
- Prado, G. M., Prado, J. C. S., Aguiar, F. L. L. D., Barbosa, F. C. B., Vale, J. P. D., Martins, M. R., ... & Fontenelle, R. O. (2024). Antifungal, molecular docking and cytotoxic effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle against *Candida albicans*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 96(3), e20230309.
- Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3(164), 2167-0412.
- Punya, H. N., Mehta, N., Chatli, M. K., Wagh, R. V., & Panwar, H. (2019). In-vitro evaluation of antimicrobial and antioxidant Efficacy of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Journal of Animal Research*, (3), 443-449.
- Quintans-Júnior, L., Da Rocha, R. F., Caregnato, F. F., Moreira, J. C. F., Da Silva, F. A., De Souza Araújo, A. A., Santos, J. P. a. D., Melo, M. S., De Sousa, D. P., Bonjardim, L. R., & Gelain, D. P. (2011). Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. *Journal of Medicinal Food*, 14(6), 630–639.
- Quiroga, P. R., Asensio, C. M., & Nepote, V. (2014). Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 471–479.
- Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., ... & Arigoni, D. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS letters*, 465(2-3), 157-160.
- Ramos, M., & Beltran, A. (2013). Carvacrol and thymol for fresh food packaging. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 05(04).
- Ranjitkar, R., Bhandari, D. P., & Bhandari, L. (2019). Acute Toxicity Test of Ten Commercial Essential Oils of Nepalese Origin. *Journal of Plant Resources*, 17(1), 82-85.
- Ranjitkar, S., Zhang, D., Sun, F., Salman, S., He, W., Venkitanarayanan, K., Tulman, E. R., & Tian, X. (2021). Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. *Scientific Reports*, 11(1).
- Rarey, M., Kramer, B., & Lengauer, T. (1999). Docking of hydrophobic ligands with interaction-based matching algorithms. *Bioinformatics*, 15(3), 243–250.
- Rastuti, U., Diastuti, H., Chasani, M., Purwati, N., & Hidayatullah, R. (2020). Chemical composition and antioxidant activities of citronella essential oil *Cymbopogon nardus* (L.) rendle fractions. *AIP Conference Proceedings*.
- Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., & Palou, E. (2019). Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*),

## Références bibliographiques

- and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Industrial Crops and Products*, 131, 90–95.
- Rojas-Armas, J., Arroyo-Acevedo, J., Ortiz-Sánchez, M., Palomino-Pacheco, M., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., Justil-Guerrero, H., Hilario-Vargas, J., & Herrera-Caldern, O. (2019). Acute and Repeated 28-Day Oral Dose Toxicity Studies of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil in Rats. *Toxicological Research*, 35(3), 225–232.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681–687.
- Roux, D. (2008). *Conseil en aromathérapie*. Wolters Kluwer France.
- S-**
- Sacchettini, J. C., & Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277(5333), 1788–1789.
- Salguero, C. P. (2010). *A Thai herbal: traditional recipes for health and harmony*. Read How YouWant. com.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Satyal, P., Murray, B., McFeeters, R., & Setzer, W. (2016). Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods*, 5(4), 70. Llorens-Molina, J. A., & Vacas, S. (2016). Effect of drought stress on essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. (Chemotype 1, 8-cineole) from wild populations of Eastern Iberian Peninsula. *Journal of Essential Oil Research*, 29(2), 145–155.
- Schnitzler, P., Koch, C., & Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical *herpes simplex* virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), 1859–1862.
- Selmi, S. A. L. A. H., & Sadok, S. A. L. O. U. A. (2008). The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus thynnus* (Linnaeus)) during chilled storage. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(1), 36–45.
- Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., & Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer research*, 31(1), 81–87.
- Shabnum, S., & Wagay, M. G. (2011). Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development*, 11, 83–94.
- Sharma, H., Mendiratta, S. K., Agarwal, R. K., Kumar, S., & Soni, A. (2017). Evaluation of anti-oxidant and anti-microbial activity of various essential oils in fresh chicken sausages. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 279–292.

## Références bibliographiques

- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., & Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 37-43.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Cieciewicz, J., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Medicinal Chemistry*, 7(6), 674–689.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
- Simon, É. (2020). *Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongiques*. Thèse de doctorat en biologie médicale, université de Rouen Normandie UfR santé département pharmacie, 28.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2019). Antimicrobial potential of pomegranate peel: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 959-965.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, S., Kohli, R. K., & Arora, K. (2006). Phytotoxicity of the Volatile Monoterpene Citronellal against Some Weeds. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(5–6), 334–340.
- Singh, N., Luthra, R., & Sangwan, R. S. (1990). Oxidative pathways and essential oil biosynthesis in the developing *Cymbopogon flexuosus* leaf.
- Smadja, Jaqueline. (2009). Les huiles essentielles. In *Colloque GP3A-Tananarive*, 2-3.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4), 463–470.
- Smith-Palmer, N., Stewart, N., & Fyfe, N. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118–122.
- Smyth, H. J., & Carpenter, C. P. (1948). Further experience with the range finding test in the industrial toxicology laboratory.
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor, S. V., ... & Sahn, H. (1997). Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 12857-12862.
- Srimai, V., Ramesh, M., Parameshwar, K. S., & Parthasarathy, T. (2013). Computer-aided design of selective Cytochrome P450 inhibitors and docking studies of alkyl resorcinol derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 22(11), 5314–5323.
- Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). Thyme. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 499-525). Woodhead Publishing.
- Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., & Rohdich, F. (2003). Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-

## Références bibliographiques

- phosphate synthase (IspC): implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18401-18407.
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. In *Yeasts in food and beverages* (pp. 335-379). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stratford, M., Hofman, P. D., & Cole, M. B. (2000). Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. *The microbiological safety and quality of food, 1*, 836-869.
- Sujatha, K., & Sirisha, K. B. (2019). Anti-cancer and Anti-oxidant activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon nardus*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 4493-4498.
- Sukhramani, P. S., Sukhramani, P. S., Tirthani, S. R., Desai, S. A., & Suthar, M. P. (2011). Biological cytotoxicity evaluation of spiro [azetidine-2, 3'-indole]-2', 4 (1'H)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre*, 3(5), 236-243.
- Sulali, A., Krishanthi, A., & Shanthi, W. W. (2003). The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on postharvest diseases and storage life of Embul banana. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(6), 780-785.
- SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules | Scientific Reports [Internet]. [cité 4 mai 2022].
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., & Legault, J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 99-102.
- Szczepanik, M., Zawitowska, B., & Szumny, A. (2012). Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal*, 30(1), 129-142.
- T-**
- Tajchakavit, S., Ramaswamy, H., & Fustier, P. (1998). Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International*, 31(10), 713-722.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., & Seto, H. (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9879-9884.
- Talavera, N., Navarro, M., Sifontes, A., Díaz, Y., Villalobos, H., Niño-Vega, G., ... & Pandalai, S. G. (2013). Green synthesis of nanosized vanadium pentoxide using *Saccharomyces cerevisiae* as biotemplate. *Recent research developments in materials science*, 10, 89.

## Références bibliographiques

Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 915

- Thiriot, E. (2009). *Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A*. [Thèse de doctorat d'université], Chimie informatique et théorique. Nancy: Université de Nancy. France, 291.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Biotechnology of isoprenoids*, 63-106.
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., & Pichersky, E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 42(5), 757-771.
- Thompson, J. D., Chalchat, J., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 859–880.
- Thompson, M. A. (2004). ArgusLab 4.0. 1. *Planaria Software LLC, Seattle, WA, 98155*.
- Tisserand, R., & Young, R. (2013). *Essential oil safety: a guide for health care professionals* (2nd edition). Elsevier Health Sciences Churchill Livingstone, Elsevier, New York, 23-38.
- Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Yeasts. *The Encyclopedia of Food and Health*, 5, 593-599.
- Trindade, L. A., De Araújo Oliveira, J., De Castro, R. D., & De Oliveira Lima, E. (2015). Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical Oral Investigations*, 19(9), 2223–2231.
- Tsay, Y. H., & Robinson, G. W. (1991). Cloning and characterization of ERG8 an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 11(2), 620-631.
- Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2014). Chemical composition, *in vitro* anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT*, 57(2), 731–737.

### -Q-

- Quézel, P. and S. Santa. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*.
- Quintans-Júnior, L., Rocha, R. F. D., Caregnato, F. F., Moreira, J. C. F., Silva, F. A. D., Araújo, A. A. D. S., ... & Gelain, D. P. (2011). Antinociceptive action and redox properties of citronellal, an essential oil present in lemongrass. *Journal of medicinal food*, 14(6), 630-639.

### -U-

- Ultee, A., Slump, R., Steging, G., & Smid, E. (2000). Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice. *Journal of Food Protection*, 63(5), 620–624.

### -V-

## Références bibliographiques

- Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Van Der Klei, I., Veenhuis, M., Brul, S., Klis, F. M., De Groot, P. W., Müller, W. H., ... & Boekhout, T. (2011). Cytology, cell walls and septa: a summary of yeast cell biology from a phylogenetic perspective. In *The yeasts* (pp. 111-128). Elsevier.
- Vazirian, M., Kashani, S. T., Ardekani, M. R. S., Khanavi, M., Jamalifar, H., Fazeli, M. R., & Toosi, A. N. (2012). Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) essential oil against food-borne pathogens added to cream-filled cakes and pastries. *Journal of Essential Oil Research*, 24(6), 579–582.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623.
- Vieth, M., Hirst, J. D., Kolinski, A., & Brooks, C. L. (1998). Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1612–1622.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.

### -W-

- Wahl, H. G., Hoffmann, A., Häring, H. U., & Liebich, H. M. (1999). Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption–cooled injection system and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 847(1-2), 1-7.
- Walsh, S., Maillard, J., Russell, A., Catrenich, C., Charbonneau, D., & Bartolo, R. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 240–247.
- Wany, A., Kumar, A., Nallapeta, S., Jha, S., Nigam, V. K., & Pandey, D. M. (2014). Extraction and characterization of essential oil components based on geraniol and citronellol from Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Plant growth regulation*, 73, 133-145.
- Ward, D. M., Chen, O. S., Li, L., Kaplan, J., Bhuiyan, S. A., Natarajan, S. K., Bard, M., & Cox, J. E. (2018). Altered sterol metabolism in budding yeast affects mitochondrial iron–sulfur (Fe-S) cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10782–10795.
- Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992). *The grass genera of the world* (pp. 1038-pp).
- Wei, W., McCusker, J. H., Hyman, R. W., Jones, T., Ning, Y., Cao, Z., Gu, Z., Bruno, D., Miranda, M., Nguyen, M., Wilhelmy, J., Komp, C., Tamse, R., Wang, X., Jia, P., Luedi, P., Oefner, P. J., David, L., Dietrich, F. S., . . . Steinmetz, L. M. (2007). Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), 12825–12830.

## Références bibliographiques

- Weisshaar, B., & Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current opinion in plant biology*, 1(3), 251-257.
- Weng, D. C. J., Latip, J., Hasbullah, S. A., & Sastrohamidjojo, H. (2015). Optimal extraction and evaluation on the oil content of citronella oil extracted from *Cymbopogon nardus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(1), 71-76.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175.
- Wong, K. K., Signal, F. A., Champion, S. H., & Motion, R. L. (2005). Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4633-4636.

### -X-

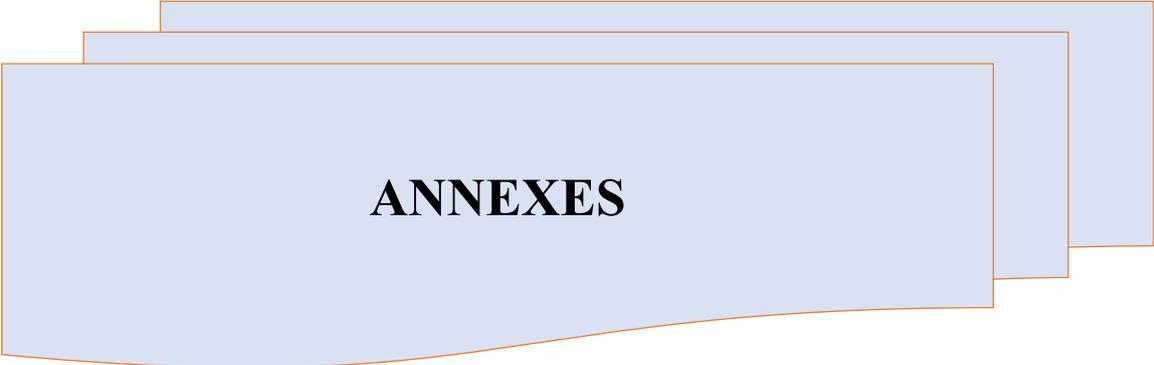
- Xu, T., Wu, L., Xia, M., Simeonov, A., & Huang, R. (2020). Systematic identification of molecular targets and pathways related to human organ level toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 34(2), 412–421.

### -Y-

- Yadav, N. P., Rai, V. K., Mishra, N., Sinha, P., Bawankule, D. U., Pal, A., Tripathi, A. K., & Chantotiya, C. S. (2014). A novel approach for development and characterization of effective mosquito repellent cream formulation containing citronella oil. *BioMed Research International*, 2014, 1–11.
- Younis, N. S., Elsewedy, H. S., Shehata, T. M., & Mohamed, M. E. (2021). Geraniol averts methotrexate-induced acute kidney injury via Keap1/Nrf2/HO-1 and MAPK/NF- $\kappa$ B pathways. *Current issues in molecular biology*, 43(3), 1741-1755.
- Yun, D. G., & Lee, D. G. (2017). Silymarin exerts antifungal effects via membrane-targeted mode of action by increasing permeability and inducing oxidative stress. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(3), 467–474.

### -Z-

- Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination 1. *Journal of food safety*, 9(2), 97-118.
- Zhou, E., Fu, Y., Wei, Z., Yu, Y., Zhang, X., & Yang, Z. (2014). Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia*, 96, 131-137.
- Zinser, E., Paltauf, F., & Daum, G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2853–2858.



**ANNEXES**

### LISTE DES ANNEXES

**Annexe I :** Schéma d'essai de la toxicité orale aiguë avec une dose initiale de 50 mg/kg p.c

**Annexe II :** Composition de la boisson commerciale Orangina®

**Annexe III :** Chromatogramme de l'HE du *T. vulgaris*

**Annexe IV :** Chromatogramme de l'HE du *C. nardus*

**Annexe V :** Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *T. vulgaris*

**Annexe VI :** Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *C. nardus*

**Annexe VII :** Antibiogramme des souches bactériennes testées

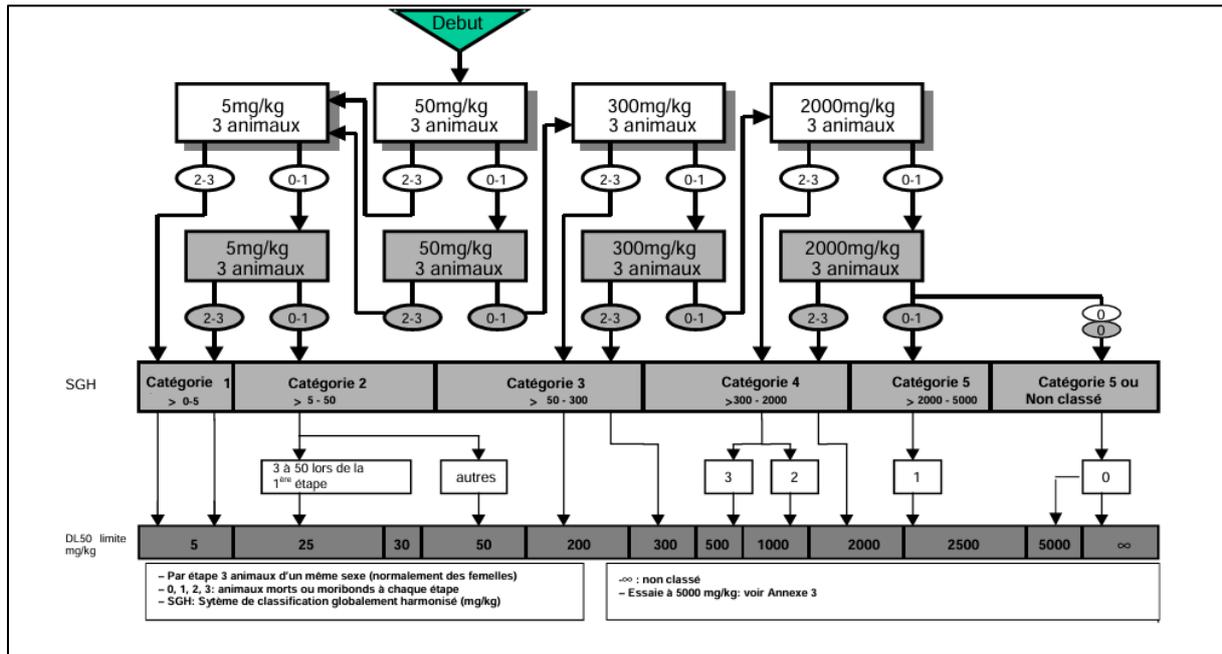
**Annexe VIII :** Résultats du séquençage de Sanger de la souche

**Annexe IX :** Photos des résultats test de conservation des deux HES du *T. vulgaris* et du *C. nardus* dans la boisson Orangina® envers la souche *S. cerevisiae*

**Annexe X:** Article COMMERCIAL THYME ESSENTIAL OIL AS NATURAL BEVERAGE PRESERVATIVE AND MOLECULAR DOCKING STUDY ON ITS MODE OF ACTION AGAINST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* publié dans Czech Journal of Food Sciences

**Annexe XI:** Poster *Thymus vulgaris* L essential oil as natural beverage preservative evaluation of acute toxicity, antioxidant and antimicrobial properties *in vitro* and in a real food matrix présenté lors du The 4th International Seminar in Engineering, Health and Analysis Juin 2023, Alger, Algerie

Annexe I : Schéma d'essai avec une dose initiale de 50 mg/kg p.c.

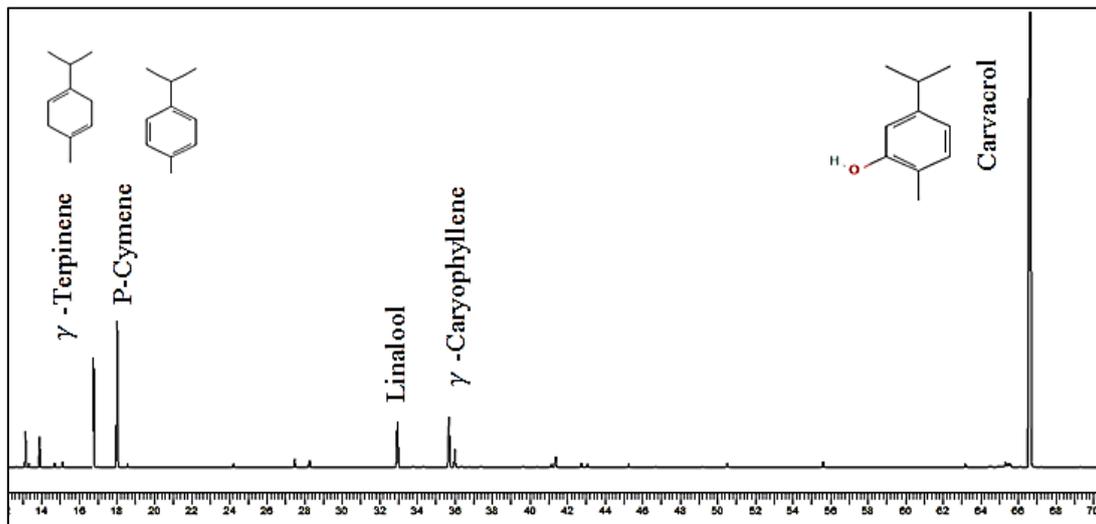
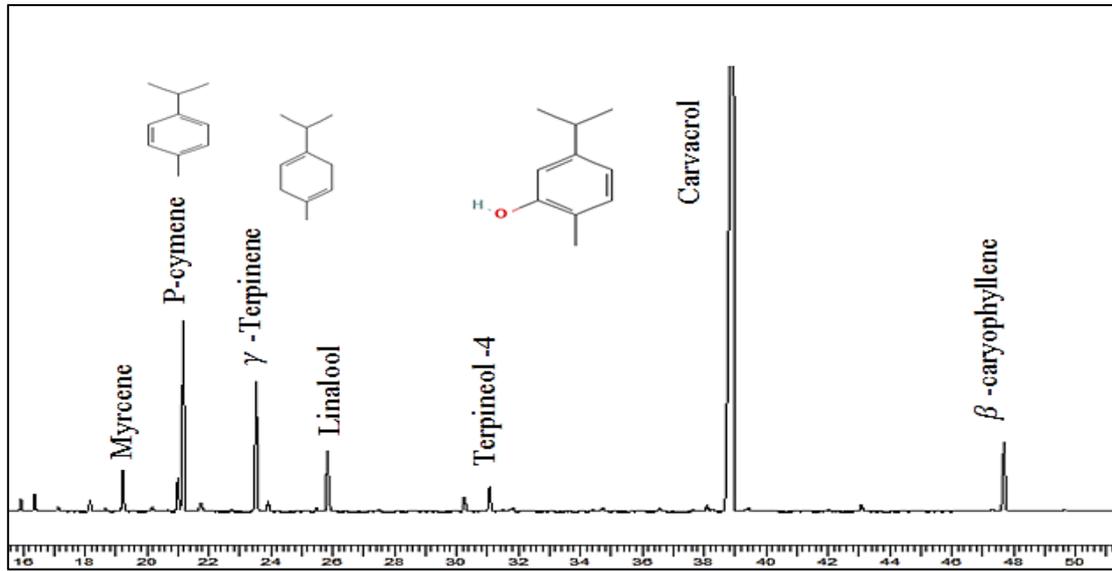


Annexe II : Composition de la boisson commerciale Orangina®

**Composition chimique de la boisson Orangina® :** Eau gazéifiée, jus d'orange et autres agrumes à base de concentrés 11% (orange 9%, mandarine, pamplemousse), sucre, pulpe 2% (orange, mandarine), acidifiant : acide citrique, extrait de zeste d'orange, conservateur : (benzoate de sodium et sorbate de potassium), arôme naturel d'orange.

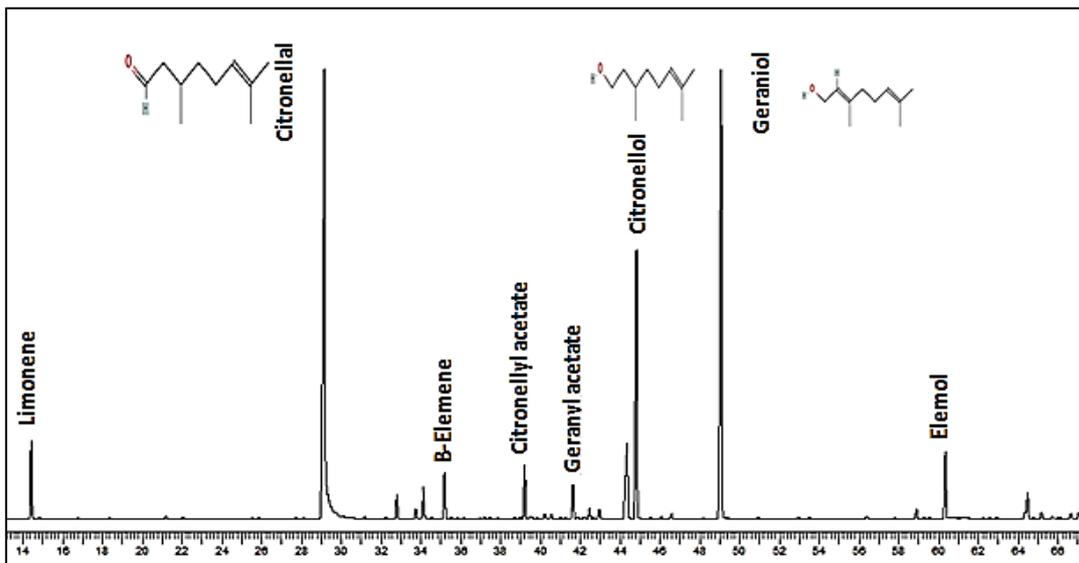
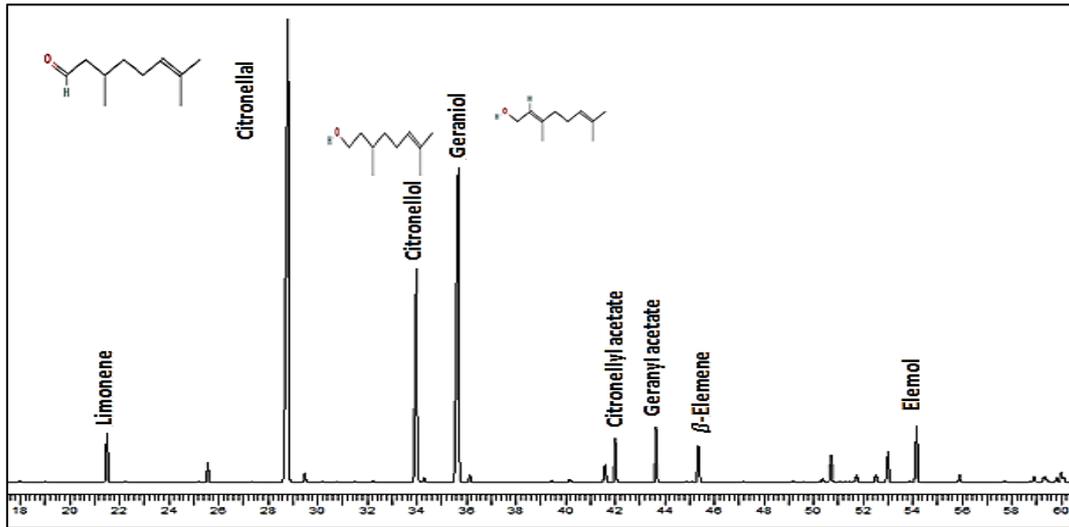
Annexe III : Chromatogramme de l'HE du *T. vulgaris*

Chromatographe sur colonne apolaire (haut) and polaire (bas).



Annexe IV : Chromatogramme de l'HE du *C. nardus*

Chromatogramme sur colonne apolaire (haut) and polaire (bas).



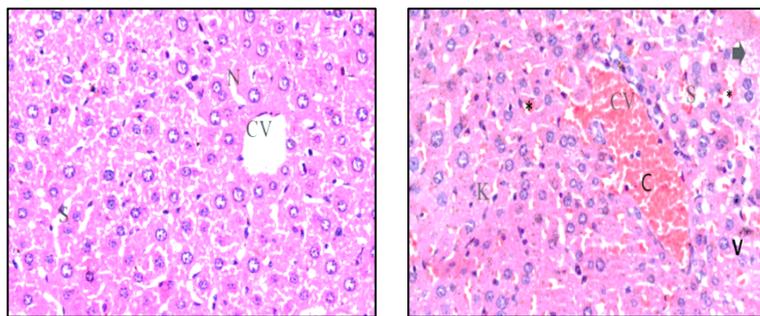
## Annexe V : Antibiogramme des souches bactériennes testées

Souches \ Antibiotique	Chl	Amx	Cip	Rif	Fos	Ery	Tet	Azm
<i>E. faecalis</i> ATCC	22	R	31	12	16	23	13	19
<i>L. innocua</i> ATCC	24	31	40	20	22	34	22	21
<i>MRSA</i> ATCC	26	R	25	4	10	28	10	29
<i>S. aureus</i> ATCC	31	R	27	6	25	29	18	19
<i>S. aureus</i> 1	8	R	44	7	R	13	11	25
<i>E. coli</i> ATCC	31	R	41	21	21	34	25	27
<i>K. pneumonia</i> ATCC	27	12	28	4	R <sub>s</sub>	30	9	23
<i>S. typhimurium</i> ATCC	11	R <sub>s</sub>	25	4	10	15	10	24
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	19	R	32	10	13	31	16	24
<i>P. aeruginosa</i> 1	11	R	36	R	R	14	10	19

Chloramphénicol (30mg), Amoxicilline (25mg), Ciprofloxacine (5mg), Rifamycine (5mg), Fosfomycine (20mg), Erythromycine (15mg), Tétracycline (30mg), Azithromycine (15mg). Résultats exprimés en diamètre de zone d'inhibition (mm). R : Résistant.

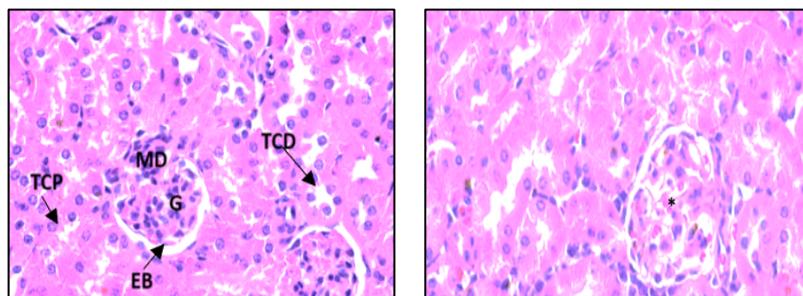
## Annexe VI : Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *T. vulgaris*

### Foie



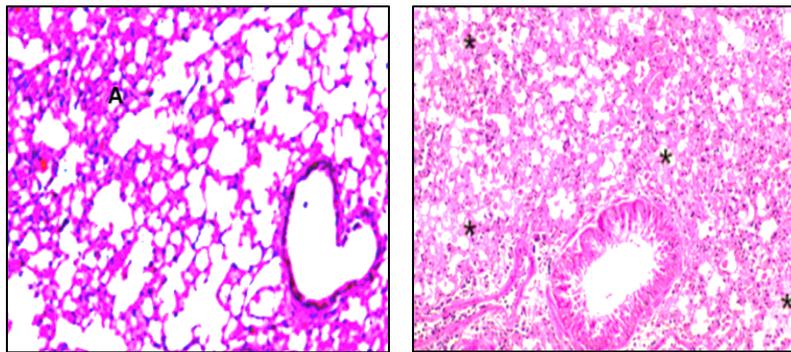
La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE. \* : Congestion et ectasie des sinusoides hépatiques, C : Congestion V : Vacuolisation, CV : Veine centro-lobulaire, S : Sinusoïde hépatique, Flèche large : Dégénérescence, K : cellule de Kupffer.

### Reins



La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE. TCP : Tubule contourné proximal, TCD : Tubule contourné distal, MD : *Macula densa*, G : glomérule, EB : Espace de Bowman, \* : Congestion

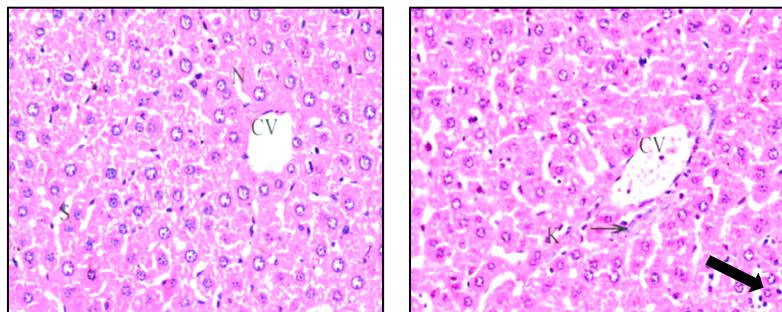
**Poumons**



La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE  
A : alvéole, \*: œdème intra-alvéolaire.

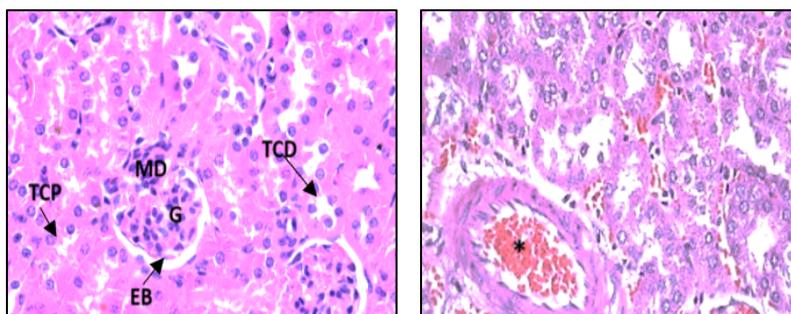
**Annexe VII : Photos des résultats d'histopathologie de l'HE du *C. nardus***

**Foie**



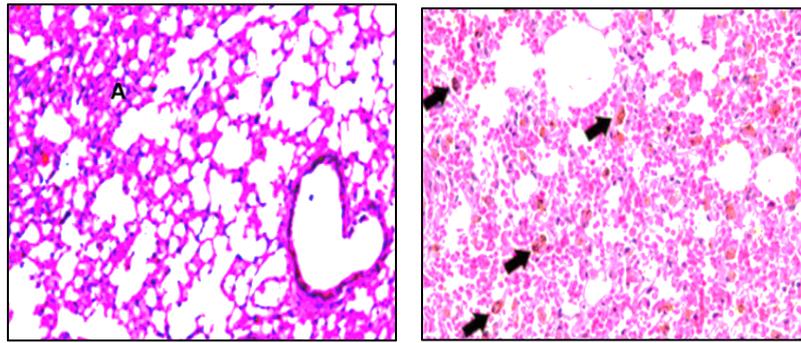
La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE. \* : Congestion et ectasie des sinusoides hépatiques, C : Congestion V : Vacuolisation, CV : Veine centrolobulaire, S : Sinusoïde hépatique, K : cellule de Kupffer, Flèche large : Dégénérescence.

**Reins**



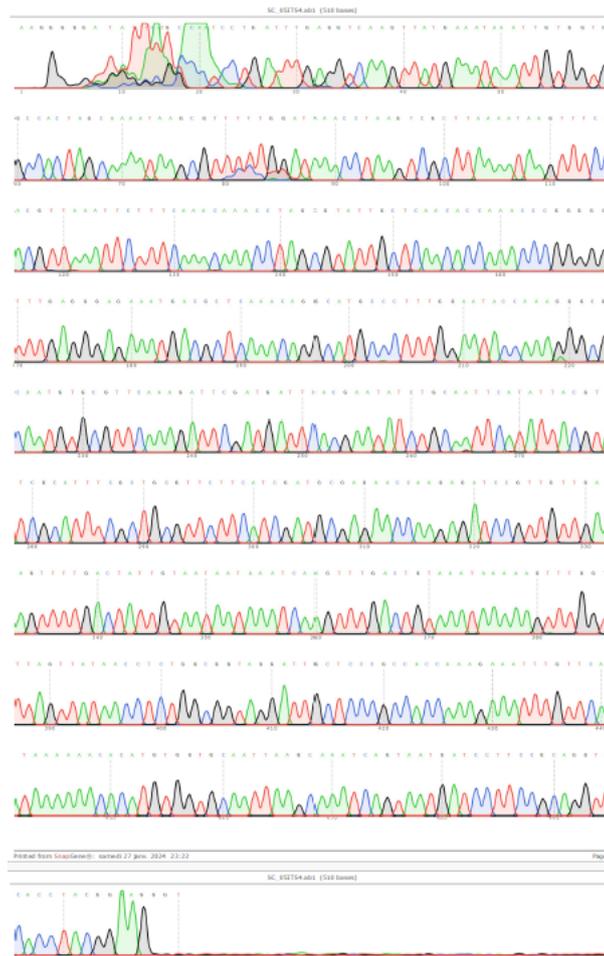
La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE. TCP : Tubule contourné proximal, TCD : Tubule contourné distal, MD : *Macula densa*, G : glomérule, EB : Espace de Bowman, \*: Congestion.

## Poumons



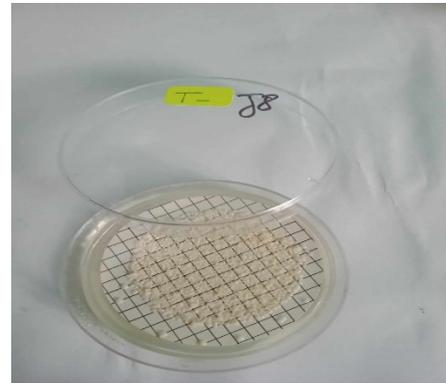
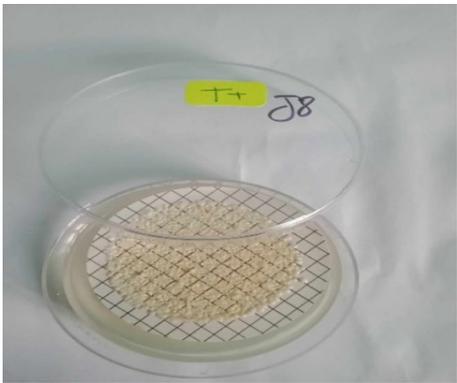
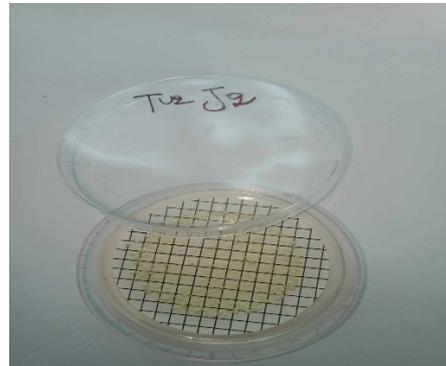
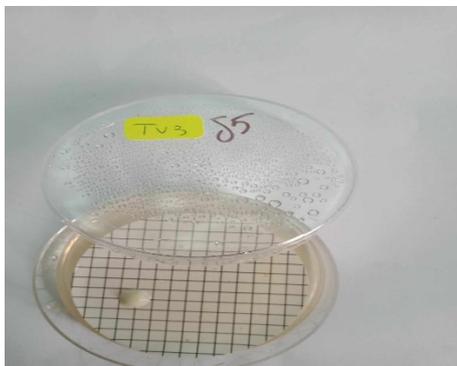
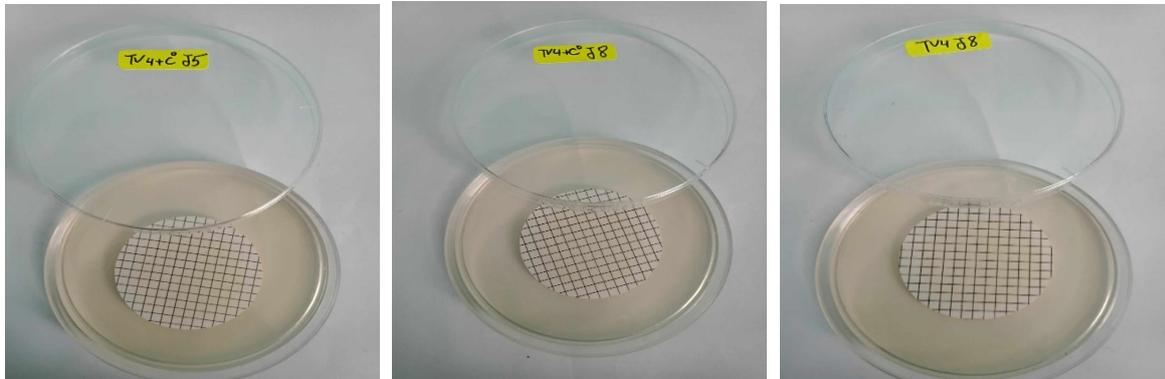
La photo à gauche représente le contrôle négatif. La photo à droite représente l'essai à l'HE  
A : alvéole, Flèche large : présence d'hémosidérine.

## Annexe VIII : Résultats du séquençage de Sanger de la souche

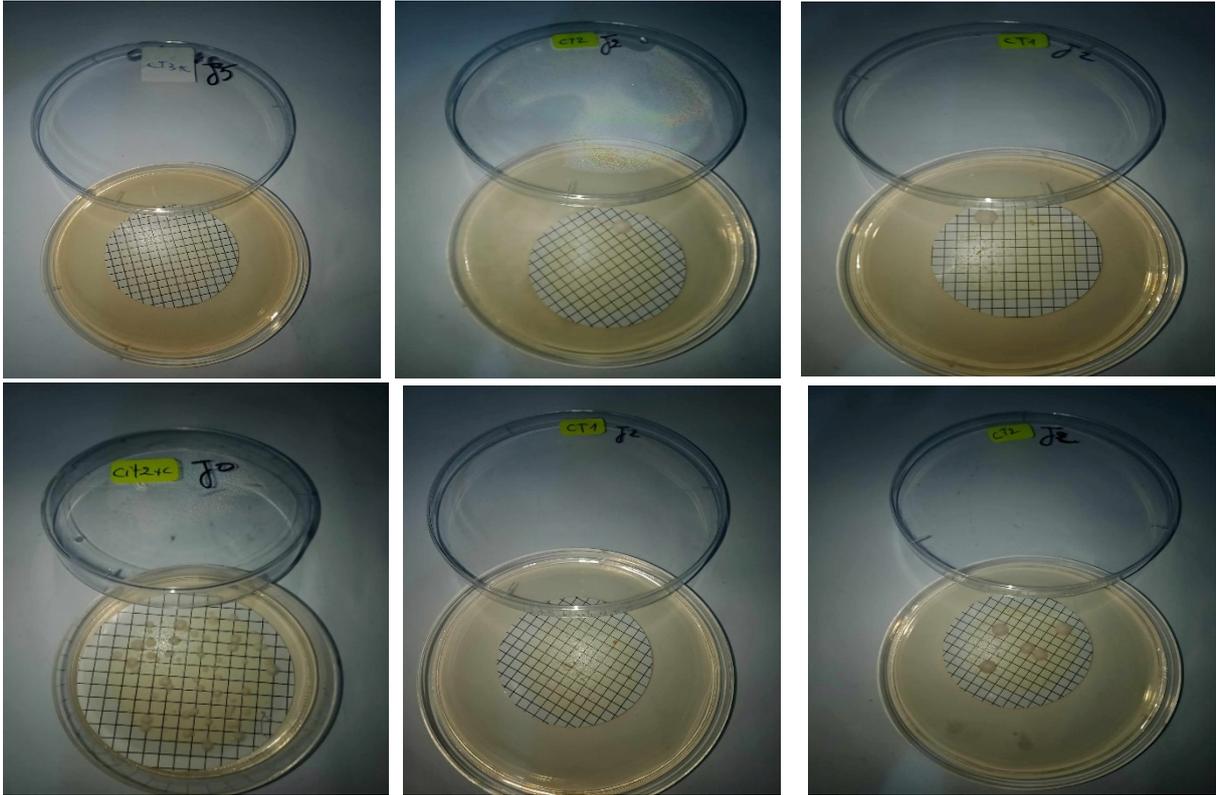


## ANNEXES

**Annexe IX : Photos des résultats test de conservation des deux HEs du *T. vulgaris* et du *C.nardus* dans la boisson Orangina® envers la souche *S. cerevisiae***



# ANNEXES



**Annexe X: Article COMMERCIAL THYME ESSENTIAL OIL AS NATURAL BEVERAGE PRESERVATIVE AND MOLECULAR DOCKING STUDY ON ITS MODE OF ACTION AGAINST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* publié dans Czech Journal of Food Sciences.**

Czech Journal of Food Sciences, 42, 2024 (4): 263–272

Original Paper

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

## **Commercial thyme essential oil as natural beverage preservative and molecular docking study on its mode of action against *Saccharomyces cerevisiae***

ZINEB LOTMANI<sup>1,2\*</sup>, MOHAMED NADJIB BOUKHATEM<sup>2,3</sup>, KHALED BOUDJEMA<sup>1</sup>,  
HAMIDA REZZOUG<sup>1</sup>, AMINA BOUCHRA BENELMOUFFOK<sup>4</sup>, PIERRE TOMI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Alimentary Technology Research, University of M'Hamed Bougara, Boumerdes, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Ethnobotanical and Natural Substances, Kouba Higher Normal School, Algiers, Algeria

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Nature Sciences and Life, University of Blida 1, Blida, Algeria

<sup>4</sup>Department of Mycology, Institute Pasteur of Algeria, Algiers, Algeria

<sup>5</sup>Laboratory of Chemistry and Biomass, University of Corse – National Centre for Scientific Research (CNRS), Ajaccio, France

\*Corresponding author: [z.lotmani@univ-boumerdes.dz](mailto:z.lotmani@univ-boumerdes.dz)

**Citation:** Lotmani Z., Boukhatem M.N., Boudjema K., Rezzoug H., Benelmouffok A.B., Tomi P. (2024): Commercial thyme essential oil as natural beverage preservative and molecular docking study on its mode of action against *Saccharomyces cerevisiae*. Czech J. Food Sci., 42: 263–272.

**Abstract:** The present investigation explored the possible use of *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) as a beverage antifungal preservative instead of chemical ones. The chemical profile of TVEO exposed carvacrol (60.47%) as the predominant compound. The antifungal properties of TVEO were assessed on various food spoilage yeast and mould species using two tests. TVEO showed a powerful antimicrobial effect against all the fungal strains at the three volumes of essential oil (EO) used (i.e. 10, 20, and 30  $\mu\text{L}$ ). The minimum inhibition concentration (MIC) of TVEO was also evaluated and ranged from 0.0625% to 0.015% (v/v). Furthermore, the potency of TVEO as a beverage antimicrobial preservative was tested at four distinct concentrations (0.6, 1.25, 4, and 6  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) against *Saccharomyces cerevisiae* alone and combined with medium heating (70 °C for 2 min) in a real food matrix (Orangina® drink) for eight storage days. TVEO exhibited a significantly higher preservative effect than chemical preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate). Lastly, a molecular docking examined the mechanism of action of carvacrol against two crucial enzymes in *S. cerevisiae* viability [ERG2 (sterol C8-isomerase) and ERG3 (sterol C5-desaturase)] compared to a chemical preservative (potassium sorbate). The two ligands highly interacted with the two target enzymes. However, carvacrol achieved a better score than potassium sorbate against ERG2 and ERG3, with binding energy of  $-10.19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $-11.73 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively. Our results open up the perspective of using TVEO as a natural food preservative.

**Keywords:** *Thymus vulgaris*; natural food preservative; carvacrol; Orangina® drink

Food deterioration and intoxication caused by microbial pathogens are major issues, particularly in the industrial world, leading to substantial economic losses. The *Saccharomyces cerevisiae* strains are among the microbial pathogens linked to foodborne illnesses

(Forsythe et al. 2004), and it's also a usual beverage contaminant (Recca et al. 1952). This yeast strain releases fermented products with undesirable tastes attributable to the release of  $\text{CO}_2$ , ethanol, and residues from other fermentation products (Tajchakavit et al. 1998).

© The authors. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

The use of chemical agents is the most common method to avoid the deterioration of foodstuffs (Olmedo et al. 2013). Nevertheless, there is an increasingly negative reputation of chemical additives among consumers due to their harmful effects and the emergence of microbial resistance to these substances (Loureiro and Ferreira 1993). Hence, plant-derived antimicrobial agents are emerging as an alternative to chemical ones (Harvey 2008). *Thymus vulgaris* (thyme), or 'garden thyme', is a *Labiatae* subshrub broadly distributed and indigenous to southern Europe. Traditionally, *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) was applied as an antibacterial and flavouring agent in food and confectionery products (Mandal and DebMandal 2016). Also, TVEO is generally recognised as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA 2009) and didn't show any sign of toxicity even at 5 000 mg·kg<sup>-1</sup> (Abdelli et al. 2017).

Essential oils (EOs) are frequently employed in the agro-food and cosmetic industries to prevent microbial contaminations (Fratianni et al. 2010). However, despite their high potential, their commercial utilisation remains limited (Board et al. 1991) due to the substantial EO volume required to produce an equal influence on food preservation (Smid and Gorris 1999). These EOs quantities can have a negative sensory attribute consequence by altering the food's texture and aroma by exceeding the tolerable consumer threshold (Nazer et al. 2005; Liang et al. 2011). Therefore, the association of EOs with classic preservation methods like heat process is interesting in reducing volumes used while maintaining the same protective effect (Tyagi et al. 2014).

In the present research, the chemical composition of TVEO was determined using gas chromatography with downstream flame ionisation detector (GC-FID) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Next, the *in vitro* antifungal potential of TVEO was evaluated against a large panel of food spoilage fungal strains. Afterwards, the authors evaluated the preservative effect of TVEO against a food spoilage yeast strain (*S. cerevisiae*) in a well-known commercial citrus drink (Orangina®) and compared it with the antifungal effect of chemical preservative. The preservative effect of TVEO was also tested in association with mild heating. Finally, as a primary cause of beverage contamination, the authors focused on yeasts and fungi. Ergosterol creates a crucial part of their membranes (Jordá and Puig 2020). The last enzymes in the chain of ergosterol biosynthesis and also crucial enzymes ERG2 (sterol C8-isomerase) and ERG3 (sterol C5-desaturase) were used in the molecular docking

study. In the latter, carvacrol was used as a ligand since it is the predominant compound of TVEO. Especially since carvacrol carries out its fungicidal action by disrupting the biosynthesis of ergosterol and the integrity of the cell membrane (Ahmad et al. 2011).

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

*Thymus vulgaris* L. essential oil was acquired from the 'Ziphee-Bio' company of EOs (Lakhdaria, Bouira, Algeria).

### Composition of Orangina® drink

Carbonated water, citrus fruits concentrate 11%, sugar, pulp 2%, citric acid, orange peel extract, preservatives (potassium sorbate and sodium benzoate), and natural orange flavour.

### Fungal species

Five isolated yeast (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*) and four mould species (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, and *Fusarium* sp.) were used. All strains were identified by Laboratory of Mycology of PASTEUR Institute (DelyBrahim, Algiers, Algeria) and all cultures were preserved in SDA (Sabouraud Dextrose Agar) at 4 °C until use.

### Chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO)

**Gas chromatography with downstream flame ionisation detector (GC-FID).** The GC-FID analysis of TVEO were conducted using a Clarus 500 Perkin Elmer (Perkin Elmer, France) system outfitted a flame ionisation detector (FID) and two Capillary columns (50 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was increased from 60 °C to 220 °C at 2 °C per min before being isotherm for 20 min. The carrier gas was pure helium, flowing at a rate of 8 mL·min<sup>-1</sup>. The injection was carried out with a split and a volume of 1/60 µL and 0.5 µL, respectively.

**Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).** The GC-MS of TVEO were performed using Clarus SQ8S Perkin Elmer TurboMass detector (quadrupole), with a direct linkage to Perkin-Elmer Autosystem XL (Perkin Elmer, France), outfitted with a BP-1 (polydimethylsiloxane) fused-silica capillary column [60 m × 0.22 mm i.d. (inner diameter), film thickness 0.25 µm]. The carrier gas was helium with

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

a flowing debit of 1 mL·min<sup>-1</sup>. The oven temperature was raised from 60 °C to 230 °C at a rate of 2 °C per min, then isotherm for 45 min.

**Agar disc diffusion test.** TVEO's antifungal properties were assessed using Kirby disc diffusion test. In brief, a fresh microbial suspension was prepared in sterile saline solution (0.9% NaCl) and spread on culture plates. Filter paper discs (Sigma Aldrich, USA) were then placed in the centre of the inoculated plates, and three different amounts (10, 20, and 30 µL) of TVEO were deposited on the discs. Hexamidine<sup>®</sup> (0.1%) (Isopharma, Algeria) and Nystatin solution (1%) served as positive controls for yeast and mould strains, respectively. Finally, all plates were incubated at 25 °C and 37 °C for 72 h and five days for yeasts and mould strains, respectively. The zones of inhibition (ZOI) were measured and expressed in millimetres.

**Volatilisation diffusion test.** The antifungal potential of TVEO's vapour phase was evaluated using volatilisation diffusion test. The technique involves taking around 50 µL of the microbial suspension and spreading it on SDA Petri dishes. Filter paper discs were laid on the inside surface of the upper lid of the Petri dishes, and three different amounts of TVEO (10, 20, and 30 µL) were then deposited. Finally, the plates were immediately turned over and incubated at 37 °C for 72 h, and five days for yeasts and mould strains, respectively.

**Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).** TVEO's MIC was determined using the macrodilution technique. An EO volume of 250 µL was diluted in 50 mL of SDA culture media to obtain a solution at 0.5% (v/v), followed by its successive dilution to half. A volume of 25 mL was taken from each dilution, transferred to medium plates, and inoculated with fresh microbial suspensions. The poisoned food technique (Grover and Moore 1962) was used for mould strains. The technique consists of cutting a mycelia disc (6 mm diameter) from a fresh mycelia culture, and then depositing it in the centre of Petri dishes. Finally, all the plates were incubated for 72 h and five days for yeast and mould strains, respectively. The MIC is the smallest EO concentration where no perceptible microbiological growth appears.

**The preservative effect of *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus drink (Orangina<sup>®</sup>)**

**The preparation of citrus drink (Orangina<sup>®</sup>) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*.** The preservative effect of TVEO against food spoilage was tested

based on the method of Tyagi et al. (2014) with some modifications. For this experiment, we chose the well-known citrus drink (Orangina<sup>®</sup>), which was purchased from Orangina<sup>®</sup> Company (Algeria). The drink samples were mixed with a fresh solution of foodborne yeast (*S. cerevisiae*) strain at 10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> (CFU – colony forming unit), then transferred to sterile glass vials of 100 mL and stored at 4 °C.

**Action of *Thymus vulgaris* essential oil.** The inoculated drinks were mixed with TVEO and Tween 80 (0.5%) at four concentrations (0.6, 1.25, 4, and 6 µL·mL<sup>-1</sup>). Yeast viability was monitored for eight days of storage at 4 °C, with sampling at 0<sup>th</sup>, 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, and 8<sup>th</sup> day. Pasteurised beverages without TVEO were the negative control, whereas those containing chemical preservatives were the positive control.

**Action of *Thymus vulgaris* essential oil associated with mild heating.** The inoculated vials were mixed with TVEO and Tween 80 (0.5%) solution at four concentrations (0.6, 1.25, 4, and 6 µL·mL<sup>-1</sup>). Then, the drinks were heated (70 °C for 2 min) and maintained at 4 °C for 8 days, with sampling at 0<sup>th</sup>, 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, and 8<sup>th</sup> day. Each test was repeated three times. All samples have undergone a 10<sup>-2</sup> dilution in saline solution (0.9% NaCl), filtered, spread on SDA plates, and incubated for 48 h or 72 h at 25 °C. The microbial load was expressed by the variation in log CFU·mL<sup>-1</sup> of the inoculated foodborne yeast (*S. cerevisiae*) strain in the function of storage time expressed in days.

**Molecular docking.** In molecular docking study, carvacrol was selected and used as a ligand, since it is the major compound of TVEO. While, potassium sorbate was employed as a comparison ligand, as it is widely used in the food industry as a preservative, including in beverages. Molecular docking investigated the interaction between the selected ligands against two enzymes: C-8 sterol isomerase and Delta (7)-sterol 5(6)-desaturase communally named ERG2 and ERG3, respectively. The chosen enzymes are involved in ergosterol biosynthesis in the *S. cerevisiae* strain. Their 3D structures were retrieved from the alphaFOLD prediction structure database under the codes C7GRE9 and P32353 for ERG2 and ERG3, respectively. The possible binding sites of the target enzymes were predicted using Castp software (version 3.0; <http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?2011>). Whereas, the ligands employed for the docking study were downloaded from PubChem as an SDF file and converted to a PDB file using Open Babel software (version 2.0; Sibi et al. 2013). The molecules preparation and docking study was realised using Argus Lab software (version 4.0.1; Thompson 2004).

The different binding modes between the bound complexes were observed through Biovia Discovery Studio Visualizer software (version 2021).

#### Statistical study

Triplicates of each trial were run. The findings were presented as the mean value and standard deviation (mean  $\pm$  SD). Antifungal results and the preservative effect of the EO test in a real food matrix were analysed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison tests. The difference was fixed at ( $P \leq 0.05$ ) level of significance. All the analyses were carried out using GraphPad Prism statistical software (version 8.00).

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Chemical characterisation of *Thymus vulgaris* essential oil

Twenty-eight compounds were identified, representing 97.92% of TVEO's total composition. The latter is mainly composed of oxygenated monoterpenes (74.54%), with carvacrol (68.20%) as the predominant compound, followed by the p-cymene (8.12%) and the -terpinene (5.73%) (Table 1).

Carvacrol-rich TVEO has already been documented in countries like Algeria (56.8%), Switzerland (up to 49.37%), Brazil (45.5%), and Jordan (up to 86.1%) (Hudaib et al. 2007; Iten et al. 2009; Boukhatem et al. 2020). In contrast, a TVEO from the Iberian region (Spain) exposed a different profile from ours, identifying 1.8-cineole (up to 68.5%) as the main compound (Llorens-Reddy et al. 2016).

#### The antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil

TVEO showed a dose-dependent effect (10, 20, and 30  $\mu$ L) illustrated by the total inhibition of all fungal strains ZOI at the higher volume used. TVEO was significantly more effective against yeast species than the positive control (Hexamidine 0.1%) ( $P < 0.0001$ ). Also, TVEO exhibited the predominant effect (ZOI = 85 mm) against *S. cerevisiae* and *C. albicans* and all mould strains at the three volumes used with a superior effect than the positive control (Nystatin 1%) (Table 2).

Our findings didn't correlate with those of Galovicová et al. (2021), who exposed moderate effect of TVEO against *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. glabrata* with ZOI does not exceed 13 mm. In contrast, our results are regular with those of Guwca et al. (2018), which exposed the potent anti-yeast ac-

tion of TVEO against 259 clinical species of *C. albicans* and *C. glabrata*. By the way, it is not surprising that TVEO exhibit a great antifungal potential due mainly to its phenolic compounds including carvacrol and thymol (Inouye et al. 2001).

Table 1. Chemical composition of *Thymus vulgaris* essential oil

No.	Compound	<i>RI</i> <sup>P</sup>	<i>RI</i> <sup>P</sup>	%
1	$\alpha$ -thujene	925.38	1 021.79	0.45
2	$\alpha$ -pinene	933.22	1 019.19	0.63
3	camphene	946.41	1 070.24	0.16
4	sabinene	964.41	1 021.79	0.46
5	octan-3-ol	973.29	1 115.68	0.12
6	myrcene	983.31	1 165.43	1.79
7	$\alpha$ -phellandrene	999.93	1 169.86	0.21
8	d-3-carene	1 007.75	1 153.00	tr
9	$\alpha$ -terpinene	1 011.70	1 185.52	1.45
10	p-cymene	1 014.46	1 276.00	8.12
11	limonene*	1 023.33	1 205.08	0.23
12	1.8-cineole*	1 023.33	1 214.31	0.31
13	e-b-ocimene	1 038.66	1 254.08	tr
14	$\gamma$ -terpinene	1 051.05	1 249.57	5.73
15	trans-sabinene hydrate	1 056.88	1 465.16	0.44
16	linalool	1 086.59	1 549.21	2.77
17	borneol	1 152.37	1 701.96	0.75
18	terpineol-4	1 164.63	1 603.22	1.22
19	$\alpha$ -terpineol	1 174.24	1 609.75	0.10
20	thymyl acetate	1 270.00	1 876.29	0.30
21	thymol	1 272.62	2 204.20	0.14
22	carvacrol	1 281.89	2 216.00	68.20
23	carvacryl acetate	1 346.66	1 876.29	0.31
24	$\beta$ -caryophyllene	1 419.44	1 597.83	3.45
25	$\alpha$ -humulene	1 452.07	1 669.58	0.11
26	$\beta$ -bisabolene	1 502.51	1 728.04	0.23
27	$\gamma$ -cadinene	1 516.13	2 277.78	tr
28	caryophyllene oxide	1 571.97	1 979.13	0.24
Total identified				97.92
Monoterpene hydrocarbons				19.35
Oxygenated monoterpenes				74.54
Sesquiterpene hydrocarbons				3.79
Oxygenated sesquiterpenes				0.24

The apolar column provides compound elution; percentages were determined on apolar column, with the exception of those with \* (polar column); *RI*<sup>P</sup> – retention indice on apolar column; *RI*<sup>P</sup> – retention indice on polar columns; tr – traces

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

Table 2. Antifungal effect of *Thymus vulgaris* essential oil

Fungal species	ZOI (mm) <sup>a</sup> – volume of TVEO (µL per disc)								
	Agar disc diffusion test			Volatilisation diffusion test			Positive control <sup>b</sup>		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
<b>Yeast species</b>									
<i>Candida albicans</i>	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	16.0 ± 2.6	17.7 ± 0.6	17.7 ± 0.6
<i>Candida parapsilosis</i>	40.3 ± 1.5	63.3 ± 2.9	85 ± 0	46.7 ± 5.89	53.7 ± 2.93	64.0 ± 3.6	27.0 ± 0.0	33.3 ± 0.6	37.0 ± 1.0
<i>Candida tropicalis</i>	62.7 ± 0.6	85.0 ± 0.0	85 ± 0	52.7 ± 3.24	64.7 ± 4.50	71.3 ± 3.2	33.0 ± 1.0	34.0 ± 0.0	37.4 ± 1.2
<i>Candida glabrata</i>	68.0 ± 3.5	85.0 ± 0.0	85 ± 0	53.3 ± 4.00	60.0 ± 5.00	70.0 ± 5.0	34.7 ± 2.0	38.3 ± 1.2	45.7 ± 0.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	33.3 ± 0.6	35.3 ± 1.0	40.7 ± 0.5
<b>Mould species</b>									
<i>Aspergillus fumigatus</i>	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	17.0 ± 1.7	19.0 ± 0.6	22.0 ± 4.5
<i>Aspergillus niger</i>	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	40.0 ± 0.6	43.0 ± 2.7	45.0 ± 6.4
<i>Aspergillus flavus</i>	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	31.0 ± 0.0	34.0 ± 0.0	35.0 ± 4.7
<i>Fusarium</i> sp.	85.0 ± 0.0	85.0 ± 0.0	85 ± 0	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.00	85.0 ± 0.0	12.3 ± 0.6	18.3 ± 0.6	21.3 ± 2.5

<sup>a</sup> The ZOI comprises the disc diameter (9 mm); <sup>b</sup> antiseptic solution (Hexamidine 0.1%) and Nystatin solution (1%) were the positive controls for yeast and mould species respectively; ZOI – zone of inhibition; TVEO – *Thymus vulgaris* essential oil

Indeed, carvacrol is one of TVEO's most effective compounds against fungal species due to its hydrophobic characteristics. These properties allow it to attach to the lipophilic region of the cell membrane and solubilise it, which is likely to result in fungal death (Yan et al. 2021). Likewise, the hydroxyl functional group in carvacrol may provoke the production of free radicals in oxidative phosphorylation process, which can lead to microbial cell death (Kawhena et al. 2021).

#### Volatilisation diffusion test

TVEO exhibited a ZOI against fungal strains correlated to the increasing volume used (10, 20, and 30 µL). Further, the EO showed pronounced efficacy against all yeast species, with a predominant effect against *S. cerevisiae* and *C. albicans* that were totally inhibited (ZOI = 85 mm) at all the amounts of EO used. The ZOI of TVEO against *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. glabrata* ranged from 46 mm to 74 mm from the lowest to the highest volume used. Finally, TVEO totally inhibited the four mould strains, regardless of the volume used (Table 2).

As a whole, our TVEO showed a better antifungal effect with the agar disc than the volatilisation diffusion test ( $P = 0.01$ ). Yet, TVEO demonstrated the same degree of inhibition against *C. albicans*, *S. cerevisiae*, and mould strains for both methods.

Even if the used protocol influence quantification of the EO antimicrobial, our results considerably conflict prior studies showing that the TVEO vapour phase display superior antifungal properties than the liquid phase (Inouye et al. 2001; Tullio et al. 2007; Fisher et al. 2008). As a hypothesis, the poor aldehyde compound presence in our EO can explain these differences. Since EOs containing high aldehyde content exhibit the higher inhibitory effect in vapour state, followed by those containing alcohol, ketone, and ether (Inouye et al. 2001).

#### The minimum inhibitory concentrations (MIC) of *Thymus vulgaris* essential oil

The essential oil (EO) presented a MIC value of 0.015% (v/v) against the five yeast strains. Besides, The MIC of TVEO against mould strains varied from 0.0625% to 0.015% (v/v), with *A. fumigatus* exhibiting the lowest and *Fusarium* sp. displaying the highest one (Table 3).

Despite the difference of methodology between our study and others, our findings surpass those found by other authors. In this context, Gucwa et al. (2018), found a TVEO's MIC value of 0.625% (v/v) against *C. albicans* and *C. glabrata* strains. Further, Tullio et al. (2007) reported an EO's MIC value of 0.25% (v/v) against two mould strains, namely *A. flavus* and *A. fumigatus*.

Table 3. The minimum inhibitory concentrations of *Thymus vulgaris* essential oil against selected yeast and mould strains

Fungal species	MIC % (v/v)
<b>Yeast species</b>	
<i>Candida albicans</i>	0.0150
<i>Candida parapsilosis</i>	0.0150
<i>Candida tropicalis</i>	0.0150
<i>Candida glabrata</i>	0.0150
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.0150
<b>Mould species</b>	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.0150
<i>Aspergillus niger</i>	0.0300
<i>Aspergillus flavus</i>	0.0300
<i>Fusarium sp.</i>	0.0625

MIC – minimum inhibitory concentration

#### The preservative effect of *Thymus vulgaris* essential oil against *S. cerevisiae* in citrus drink (Orangina®)

**Action of *Thymus vulgaris* essential oil.** TVEO exhibited a total antifungal growth inhibition on the highest concentration used ( $6 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on the second day and during the whole storage period. While the EO concentration of  $4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  showed total growth inhibition beginning from the eighth day of storage. Nevertheless, the lowest EO concentration ( $0.6 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) didn't show a considerable inhibition of growth during the eight days of storage when compared to the positive and the negative controls ( $P > 0.99$ ) (Figure 1A).

Similarly, Shabnum and Wagay (2011) evaluated the antifungal potential of TVEO on the preservation of strawberries infected with *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* species that induced the apparition of grey mould and deterioration of the fruit. After two weeks of preservation, they reported a reduction in decay correlated with an increase in TVEO concentration. Additionally, a maximal reduction of the infection (more than 70%) was reported at the highest EO concentration. These findings are certainly attributed to TVEO phenolic monoterpenes, which affect fungal cells by altering the cellular organelles, including the mitochondria, and the plasma membrane (Helal et al. 2006).

In fact, to ensure the microbial safety of the beverages, using only EO might influence the product's overall sensory characteristics. Hence, we must investigate the impact of the association of TVEO with mild heat treatment to try to reduce the EO amounts used in food preservation.

**Action of *Thymus vulgaris* essential oil associated with mild heating.** TVEO exhibited a total inhibition at the two highest ( $6 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $4 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) EO concentrations beginning from the second and fifth day of storage, respectively. Further, these two concentrations showed significantly higher inhibitory effects against *S. cerevisiae* than positive and negative controls ( $P < 0.0001$ ). In contrast, the two lowest EO concentrations ( $0.6 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $1.25 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) showed no higher inhibition than the positive and negative control ( $P > 0.99$ ). Our findings also revealed that the thermal treatment didn't show significantly better results than his absence ( $P > 0.05$ ) (Figure 1B).

In the same line, Belletti et al. (2010) tested the antifungal preservative potential of three EO monoterpenes ( $\beta$ -pinene, geranial, and linalool) in orange juice inoculated with a wild *S. cerevisiae* strain and associated with moderate heat processing ( $55^\circ\text{C}$  for 15 min). The authors reported that the heat treatment significantly enhanced the preservative effect of the beverage, certainly by making it easier for hydrophobic chemicals to reach the cytoplasmic membrane of the yeast, which is where biomolecules exert their deadly effects (Prashar et al. 2003). The EOs associated with heat treatment created a highly advantageous synergy in which higher temperatures during storage increase the level of volatiles in the vapour phase, improving anti-yeast activity and food preservation (Tyagi et al. 2014).

**Molecular docking.** The docking scores expressed as kcal/mol were largely negative for the two ligands against ERG2 and ERG3 isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. These results demonstrate the high interaction of the selected ligands with the two enzymes. However, carvacrol achieved a higher docking score against ERG2 ( $10.27 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) than potassium sorbate ( $8.16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Comparable results were observed against ERG3, where carvacrol showed a score of  $-11.73 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , while potassium sorbate displayed a score of  $-7.84 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . The docking scores proved that carvacrol inhibits ergosterol biosynthesis, which undoubtedly lead to *S. cerevisiae* cell death. The interactions and binding sites of ligands are displayed in Figures 2 and 3.

Due to the hydrophobicity of EO compounds, carvacrol established only hydrophobic interactions against ERG2. These interactions belong mainly to that of Van der Waals established with the following amino acid residues: ALA88 (alanine), ASN86 (asparagine), ALA91, PHE109 (phenylalanine), THR119 (threonine), HIS118 (histidine), GLN135 (glutamine), HIS154, ALA172, PHE186. Whereas against ERG3,

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

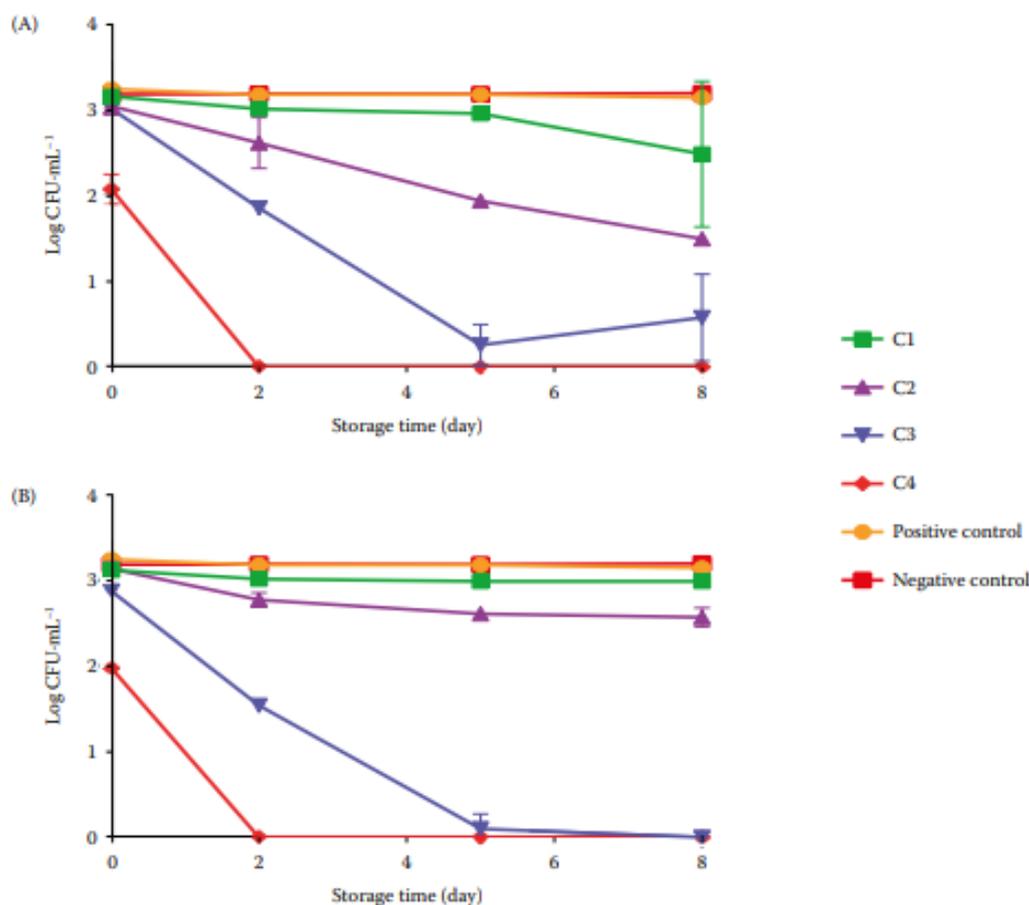


Figure 1. *Saccharomyces cerevisiae* strain count of citrus drink (Orangina®) in the function of storage days after adding of different concentrations of *Thymus vulgaris* L. essential oil (A) alone and (B) combined with moderate heat treatment

The drink samples treated with chemical preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate) represent the positive control; C – concentration; C1 – 0.6  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; C2 – 1.25  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; C3 – 4  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; C4 – 6  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; CFU – colony forming unit; values of three replicate experiments are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD)

the hydroxyl (OH) function of carvacrol allowed the formation of one conventional H-bond established with LYS253 (lysine). Besides, carvacrol performed better than potassium sorbate due probably to the aromatic ring in its structure that allowed additional interactions (Pi-Pi stacked, Pi-alkyl) with the amino acids of the enzymes. To our knowledge, no docking studies have been carried out on carvacrol with ERG2 and ERG3, but they have been done against other ergosterol biosynthesis enzymes. For instance, Akermi et al. (2023) employed molecular docking to investigate the mode of action of carvacrol on lanos-

terol 14 $\alpha$ -demethylase (ERG11) enzyme isolated from *C. albicans*. The outcomes exposed a largely negative energy score ( $-6.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), which indicates a high interaction of carvacrol with ERG11. Another study explored the mode of action of carvacrol against three enzymes TEM-72 (PDB ID: 3P98), CTXM-9 (PDB ID: 1YLJ), and SHV-2 (PDB ID: 1N9B) from the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase family isolated from *Escherichia coli*. The docking exposed a binding energy reaching  $-5.27 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  due mainly to H-bonds and hydrophobic interactions between carvacrol and the target enzymes (Khan et al. 2020).

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

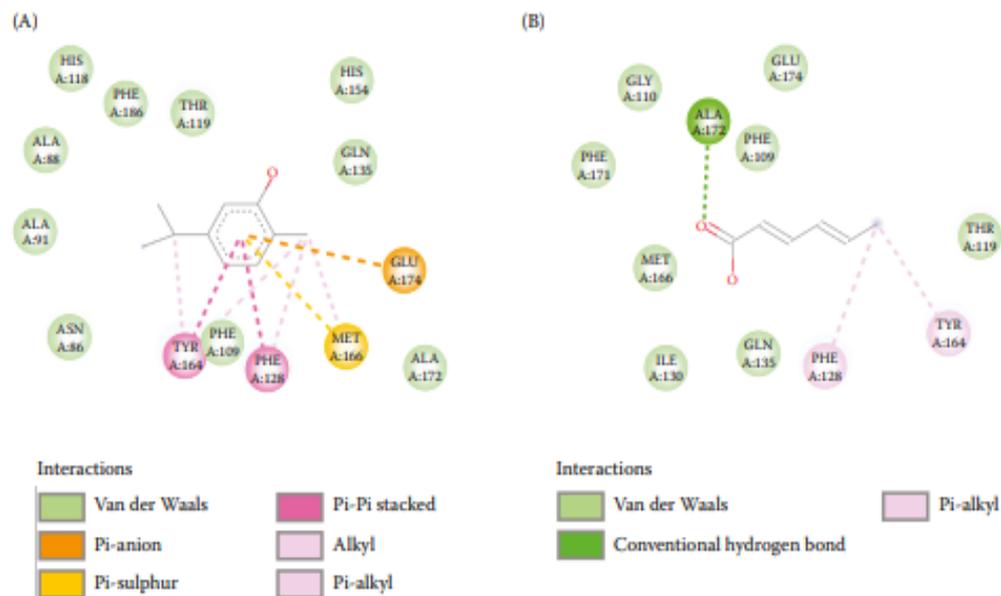


Figure 2. 2D diagram visualisation of molecular docking using the Discovery Studio Visualizer for ERG2 with (A) carvacrol and (B) potassium sorbate

ALA – alanine; ASN – asparagine; GLN – glutamine; GLU – glutamic acid; GLY – glycine; HIS – histidine; ILE – isoleucine; MET – methionine; PHE – phenylalanine; THR – threonine; TYR – tyrosine

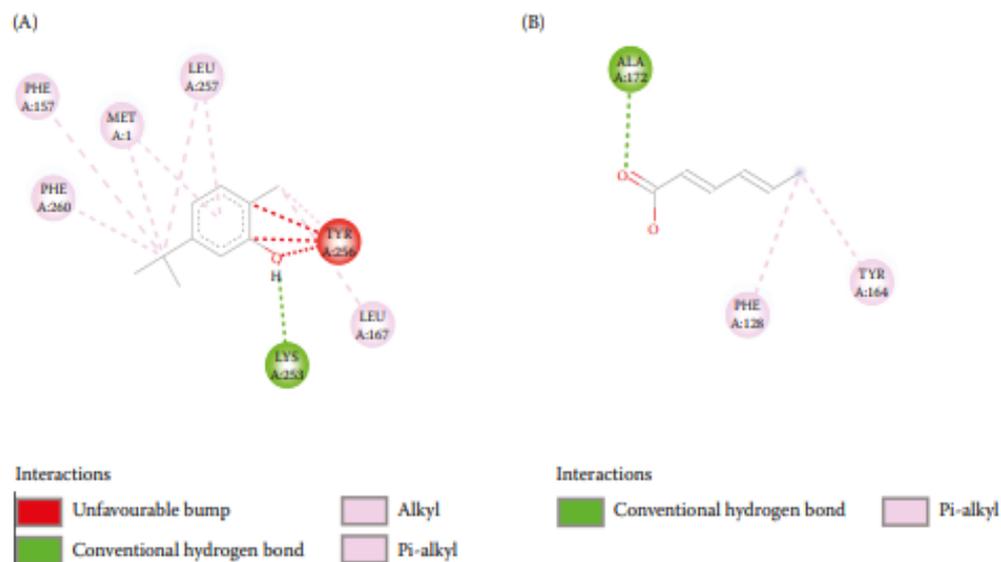


Figure 3. 2D diagram visualisation of molecular docking using the Discovery Studio Visualizer for ERG3 with (A) carvacrol and (B) potassium sorbate

ALA – alanine; LEU – isoleucine; LYS – lysine; MET – methionine; PHE – phenylalanine; TYR – tyrosine

<https://doi.org/10.17221/102/2024-CJFS>

## CONCLUSION

In summary, TVEO showed a powerful antifungal action against a panel of food spoilage fungal strains determined using two different *in vitro* techniques. At small concentration, TVEO showed a significantly better antifungal effect against *S. cerevisiae* in the citrus drink (Orangina®) than chemical preservatives. The docking study revealed the high interaction of TVEO main compound (carvacrol) against two ergosterol biosynthesis enzymes, crucial molecules in *S. cerevisiae* survival. As a result, these results provide an exceptional perspective on the use of TVEO as a natural food preservative instead of synthetic preservatives. Nevertheless, we must confirm the current findings, assess the sensory effects of adding TVEO to food commodities, and consider encapsulation as the final form of commercialisation.

## REFERENCES

- Abdelli W., Bahri E., Romane A., Höferl M., Wanner J., Schmidt E., Jirovetz L. (2017): Chemical composition and anti-inflammatory activity of Algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural Product Communication*, 12: 611–614.
- Ahmad A., Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A., Manzoor N. (2011): Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30: 41–50.
- Akermi S., Smaoui S., Chaari M., Elhadef K., Gentile R., Hait M., Roymahapatra G., Mellouli L. (2024): Combined *in vitro/in silico* approaches, molecular dynamics simulations and safety assessment of the multifunctional properties of thymol and carvacrol: A comparative insight. *Chemistry & Biodiversity*, 21: e202301575.
- Belletti N., Kamdem S.S., Tabanelli G., Lanciotti R., Gardini F. (2010): Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 283–289.
- Board R.G., Gould G.W. (1991): Future prospects. In: Russell N.J., Gould G.W. (eds): *Food Preservatives*. Glasgow, Blackie & Son: 267–284.
- Boukhatem M.N., Darwish N.H., Sudha T., Bahlouli S., Kellou D., Benelmouffok A.B., Mousa S.A. (2020): *In vitro* antifungal and topical anti-inflammatory properties of essential oil from wild-growing *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) used for medicinal purposes in Algeria: A new source of carvacrol. *Scientia Pharmaceutica*, 88: 33–51.
- Fisher K., Phillips C. (2008): Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19: 156–164.
- Forsythe S.J. (2004): *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre, Artmed: 11–424. (in Portuguese)
- Fратиanni F., de Martino L., Melone A., de Feo V., Coppola R., Nazzaro F. (2010): Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75: 528–535.
- Galovičová L., Borotová P., Valková V., Vuković N.L., Vukic M., Štefániková J., Kačániová M. (2021): *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants*, 10: 1959–1975.
- Grover R.K., Moore J.D. (1962): Toxicometric studies of fungicides against brown rot organisms *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa*. *Phytopathology*, 52: 876–880.
- Gucwa K., Milewski S., Dymerski T., Szweida P. (2018): Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. *Molecules*, 23: 1116–1133.
- Harvey A. (2008): Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13: 894–901.
- Helal G.A., Sarhan M.M., Abu Shagla A.N.K., Abou El-Khair E.K. (2006): Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 456–469.
- Hudaib M., Aburjai T. (2007): Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavor and Fragrance Journal*, 22: 322–327.
- Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. (2001): Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 565–573.
- Iten F., Saller R., Abel G., Reichling J. (2009): Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* – Chemotype carvacrol. *Planta Medica*, 75: 1231–1236.
- Jordá T., Puig S. (2020): Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11: 795.
- Kawhena T.G., Opara U.L., Fawole O.A. (2021): A comparative study of antimicrobial and antioxidant activities of plant essential oils and extracts as candidate ingredients for edible coatings to control decay in 'Wonderful' pomegranate. *Molecules*, 26: 3367–3390.
- Khan I., Bahuguna A., Shukla S., Aziz F., Chauhan A.K., Ansari M.B., Bajpai V.K., Huh Y.S., Kang S.C. (2020): Antimicrobial potential of the food-grade additive carvacrol against uropathogenic *E. coli* based on membrane depolarization, reactive oxygen species generation, and molecular docking analysis. *Microbiology Pathology*, 142: 104046.

- Llorens-Reddy J. A., Vacas S. (2016): Effect of drought stress on essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. (Chemotype 1, 8-cineole) from wild populations of Eastern Iberian Peninsula. *Journal of Essential Oil Research*, 29: 145–155.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (1993): Spoilage. Yeasts in food spoilage. In: Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds): *Encyclopedia of Food Science Technology and Nutrition*. Volume 7. London, Academic Press: 4344–4349.
- Mandal S., DebMandal M. (2016): Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In: Preedy V.R. (ed.): *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Amsterdam, Academic Press: 825–834.
- Nazer A., Kobilinsky A., Tholozan J.L., Dubois-Brissonnet F. (2005): Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: A synergistic effect? *Food Microbiology*, 22: 391–398.
- Olmedo R.H., Nepote V., Grosso N.R. (2013): Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT – Food Science and Technology*, 53: 409–417.
- Prashar A., Hili P., Veness R.G., Evans C.S. (2003): Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 3: 569–575.
- Recca J., Mrak E.M. (1952): Yeasts occurring in citrus products. *Food Technology*, 6: 450–454.
- Shabnum S., Wagay M.G. (2011): Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research and Development*, 11: 83–94.
- Smid E.J., Gorris L.G.M (1999): *Handbook of Food Preservation*. Boca Raton, CRC Press: 285–308.
- Tajchakavit S., Ramaswamy H.S., Fustier P. (1998): Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International*, 31: 713–722.
- Thompson M.A. (2004): Molecular docking using Argus Lab; an efficient shape-based search algorithm and the AScore scoring function. In: *Proceeding of the ACS Meeting*, Philadelphia, USA, Aug 21–25, 2004: 42.
- Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M., Cuffini A., Alonzo V., Carlone N. (2007): Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1544–1550.
- Tyagi A.K., Gottardi D., Malik A., Guerzoni M.E. (2014): Chemical composition, *in vitro* anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT – Food Science and Technology*, 57: 731–737.
- Yan J., Wu H., Shi F., Wang H., Chen K., Feng J., Jia W. (2021): Antifungal activity screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 130: 1993–2007.

Received: May 24, 2024

Accepted: July 26, 2024

Published online: August 22, 2024

