

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس سطيف
UNIVERSITE FARHAT ABBAS –SETIF-

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie
Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN MICROBIOLOGIE

Option : Microbiologie appliquée

Par

KAABOUR FAIZA

THEME

**Activités antioxydantes et antibactériennes des
extraits aqueux du thé, de l'origan et du
gingembre – Etude *in vitro* –**

Soutenu le : 08 / 07 / 2009

Devant le jury

Président :	Pr. Daoud HARZALLAH	Prof	Université de Sétif
Encadreur :	Dr. Abderrahmane SENATOR	M.C	Université de Sétif
Examineur :	Dr. Hamama BOURICHE	M.C	Université de Sétif
Examineur :	Dr. Mouhamed ZERROUG	M.C	Université de Sétif
Invité :	Dr. Abdelhakim AOUF	M.C	USTHB Alger

REMERCIEMENTS

Ma profonde gratitude va à mon promoteur, le Dr Abderrahmane SENATOR pour son aide et sa patience et pour son œil critique qui m'a été très précieux pour structurer et améliorer la qualité de ce travail.

Mes sincères remerciements vont au Pr. D. HRZALLAH pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce mémoire, ainsi qu'aux Dr. H. BOURICHE, Dr. M. ZERROUG ET Dr. A.. AOUF pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

En fin, je remercie infiniment mes collègues et amis de la promotion 2005 et 2006 pour leur contribution de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'activité antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux préparés par infusion et par décoction de trois espèces (*Camellia sinensis*, *Origanum glandulosum* et *Zingiber officinalis*) ont été étudié in vitro dans le présent travail. Le potentiel antioxydant des extraits est évalué par trois méthodes différentes qui impliquent quelque mécanisme du processus oxydatif.

Les extraits aqueux des feuilles du thé et de l'origan ont fortement piégé le radical DPPH avec des IC₅₀ de 3µg/ml et de 5µg/ml respectivement. Cependant les extraits des rhizomes du gingembre montrent des effets très faibles. La décoction du gingembre a produit un effet plus important que celui produit par l'infusion (IC₅₀: 32µg/ml et 75µg/ml respectivement). Par contre, dans le cas du thé et de l'origan les deux extraits obtenus par infusion ou par décoction ont produit des effets scavengers similaires. L'oxydation de l'acide linoléique est fortement inhibée par les deux extraits du thé et de l'origan, qui produisent un effet pratiquement identique à celui de l'antioxydant standard (BHT). Les extraits du gingembre étaient moins efficace et induisent une inhibition plus faible. L'effet chélateur de différents extraits à été aussi évalué dans cette étude où, seulement les deux extraits du thé et de l'origan semblent être de bons chélateurs.

L'activité anti-bactérienne est évaluée par la méthode des disques. Les extraits du thé et de l'origan (infusion et décoction) ont fortement inhibé la croissance de *E. agglomerans* avec des zones d'inhibition de 22 à 30mm. Des diamètres d'inhibition de 10mm, 12mm et 25mm produits par la décoction du thé envers: *P. aeruginosa* (ATTC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) et *S. typhi* respectivement. Tandis que les extraits du gingembre n'ont montré aucun effet inhibiteur envers les souches testées.

Mots clés : thé, origan, gingembre, antibactériens, antioxydants, DPPH, β carotène, chélation des métaux.

المخلص

تمت دراسة النشاطية المضادة للأكسدة و للأحياء الدقيقة مخبريا (في الزجاج) للمستخلصات المائية المحضرة بنقع أو غلي ثلاث انواع نباتية (*Zingiber officinalis*, *Camellia sinensis* و *Origanum glandulosum*) و درست القدرة المضادة للأكسدة باستعمال ثلاث طرق مختلفة تتضمن بعض آليات الأكسدة.

تبين أن للمستخلصات المائية لكل من أوراق الشاي و الزعتر قدرة ازاحية عالية لجذر DPPH (IC50: 3مكرغرام/مل و 5مكرغرام/مل على التوالي). بينما أبدت مستخلصات جذر الزنجبيل قوة ازاحية ضعيفة. أعطى مغلى الزنجبيل تأثيرا مهما مقارنة مع المنقوع (IC50: 32مكرغرام/مل و 75مكرغرام/مل على التوالي. على العكس من ذلك، أبدت مستخلصات الشاي و الزعتر المحضرة بالنقع أو الغلي تأثيرا متشابها. ثببت مستخلصات الشاي و الزعتر بنسبة عالية أكسدة حمض اللينولييك حيث اظهرا نشاطية مماثلة لتلك المتحصل عليها مع مضاد الأكسدة المرجعي (BHT). في حين كانت مستخلصات الزنجبيل اقل فعالية. أما دراسة نشاطية المستخلصات المائية لاستخلاص المعادن أثبتت أن مستخلصات الشاي و الزعتر هي الأكثر فعالية.

درست النشاطية ضد ميكروبي ة باستعمال طريقة الأقراص، إذ ثبب بقوة نمو *E. agglomerans* مع مستخلصات الشاي و الزعتر(منقوع و مغلى) فتراوحت أقطار التثبيط بين 22 مم و 30مم. في حين قدرت أقطار التثبيط ب: 10, 12 و 25 مم مع مغلى الشاي ضد:

S. Typhi (ATCC 25923), *S. aureus* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* على التوالي. بينما لم تبد مستخلصات الزنجبيل أي تثبيط.

الكلمات المفاتيح : الشاي، الزعتر، الزنجبيل، مضادات الأكسدة، مضادات الأحياء الدقيقة، DPPH، β كاروتين، استخلاص المعادن.

Summary

Antioxidant and antibacterial activity of aqueous extracts prepared by infusion and decoction of three species (*Camellia sinensis*, *Origanum glandulosum* and *Zingiber officinalis*) was investigated in this study. The antioxidant potential was evaluated by three different methods that implicate some mechanism of oxidative process.

Aqueous extracts of tea and oregano leaves scavenged strongly the DPPH radical with an IC₅₀ of 3µg/ml and 5µg/ml respectively. However, ginger rhizome extracts showed a very low effects. Ginger decoction exerted higher effect than the infusion one (IC₅₀: 32µg/ml and 75µg/ml respectively). In contrast, infusion and decoction of tea and oregano showed similar scavenging activities. In addition, linoleic oxidation was strongly inhibited by tea and oregano extracts that induce activity similar to that exhibited by synthetic antioxidant (BHT). Ginger extracts showed low efficacy and exerted a slight inhibition. Chelating activities of different extracts were also evaluated in this study, where only tea and oregano extracts appear to be good chelators.

Antibacterial activity was evaluated by disc diffusion assay. Tea and oregano extracts exerted a high inhibition on the growth of *E. agglomerans* with an inhibition diameters ranging from 22 to 30mm. Inhibition zones about 10mm, 12mm and 25mm exhibited by decoction of tea against: *P. aeruginosa* (ATTC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) and *S. typhi* respectively. While, ginger extracts didn't show any inhibitory effect against tested strains.

Key words: tea, oregano, ginger, antibacterial, antioxidants, DPPH, β carotene, metal chelating.

LISTES DES ABREVIATIONS

ABTS	: 2,2'azinobis-3-éthyl-benzothiazolin-6-sulphonat
ATCC	: American Type Culture Collection
BHT	: Butylated hydroxytoluene
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMP	: Chloramphénicol
COX	: Cyclooxygenase
DOT	: Doxycycline
DPPH	: 1-1Di phényl -2-pycrylhydrazyl
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic
GPX	: Glutathion Peroxydase
HDL	: Hight Density Lipoprotein
HNE	: 4- hydroxy nonenal
HOCl	: Acide hypochloreux
IC50	: 50% inhibitory concentration
LDL	: Low Density Lipoprotein
LO•	: Radical alkoxy
LOO•	: Radical peroxy
MDA	: Malondialdéhyde
MPO	: Myeloperoxydase
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO•	: Radical monoxyde
NOS	: Nitric oxide synthase
O¹₂	: Oxygene singulet
•O₂	: Anion superoxyde
•OH	: Radical hydroxyl
ONOOH	: Nitroperoxyde
PB	: Polymixyne B
PMN	: Polymorphonucléaires neutrophiles
ROS	: Reactive oxygen species
SOD	: Superoxyde dismutase
UI	: Unité internationale
VLDL	: Very light density lipoprotein

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

- Figure 1.** Structure des tocophérols
- Figure 2.** Structures chimiques de quelques flavonoïdes
- Figure 3.** Scavenging des ROS par les flavonoïdes
- Figure 4.** Structure de certains composés d'origine végétale doués d'activité antimicrobienne
- Figure 5.** Photographie du thé (*Camellia sinensis*)
- Figure 6.** Photographie de l'origan (*Origanum glandulosum*)
- Figure 7.** Photographie du gingembre (*Zingiber officinalis*)
- Figure 8.** Etapes de l'étude de l'effet inhibiteur des extraits sur les bactéries
- Figure 9.** Activité anti-radicalaire des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé
- Figure 10.** Activité anti-radicalaire des extraits aqueux de l'origan
- Figure 11.** Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux du gingembre
- Figure 12.** Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé
- Figure 13.** Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) de l'origan
- Figure 14.** Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) du gingembre
- Figure 15.** Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé
- Figure 16.** Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) de l'origan
- Figure 17.** Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) du gingembre
- Figure 18.** Zones d'inhibition de la croissance d'*E. coli* induites par l'extrait d'infusion et de décoction de l'origan
- Figure 19.** Zones d'inhibition de la croissance d'*E. agglomerans* de l'extrait d'infusion et de décoction d'origan
- Figure 20.** Zones d'inhibition de la croissance de *E. agglomerans*, de *P. aeruginosa*, de *S. aureus*, de *S. typhi* induites par l'extrait du thé obtenu par décoction et d'*E. agglomerans* produits par l'extrait du thé obtenu par infusion.
- Figure 21.** Zones d'inhibition induites par les antibiotiques (CMP, DOT ou PB) envers *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. thyphi* et *E. agglomerans*.
- Figure 22.** Structure chimique des principaux polyphénols du thé

TABLEAUX

Tableau 1. Mécanismes d'action de substances antibactériennes

Tableau 2. Sources alimentaires de certains nutriments et son mécanisme d'action

Tableau 3. Rendements (%) des extractions du thé, origan et gingembre

Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par les extraits aqueux du thé, de l'origan, du gingembre préparés par infusion ou décoction et les antibiotiques (PB, DOT et CMP)

SOMMAIRE

Introduction

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Agents antioxydants et antimicrobiens	1
1.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	1
1.1.2. Sources de production des ROS.....	2
1.1.3 Système de défense antioxydante.....	3
1.1.4. Balance oxydants- antioxydants.....	4
1.2. Agents antimicrobiens.....	6
1.2.1. Mécanismes d'action des substances antibactériennes.....	6
1.3. Antioxydants et antimicrobiens naturels.....	8
1.3.1. Antioxydants naturels.....	8
1. Vitamine E (α tocophérol).....	9
2. Vitamine C (acide ascorbique).....	10
3. Caroténoïdes.....	10
4. Flavonoïdes.....	10
1.3.2. Antimicrobiens naturels.....	12
Flavonoides.....	13
Phénols simples et acides phénoliques.....	13
Quinones.....	14
Tannins.....	14
Polypeptides.....	14
Huiles essentielles.....	15
II. Plantes utilisées	16
2.1. Le thé (<i>Camellia sinensis</i>).....	16
2.1.1. Composition chimiques.....	16
2.1.2. Activité biologique.....	17
2.2. L'origan (<i>Origanum glandulosum</i>).....	19
2.2.1. Composition chimique.....	19
2.2.2. Activité biologique.....	19
2.3. Le gingembre (<i>Zingiber officinalis</i>).....	20

2.3.1. Composition chimique.....	21
2.3.2. Activité biologique.....	22

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique.....

1.1. Plantes.....	24
1.2. Bactéries.....	24

II. Produits chimiques.....

2.1. Solutions de travail.....	24
2.2. Milieux de cultures.....	25
2.3. Antibiotiques.....	25

III. Méthodes d'extraction.....

- Infusion.....	25
- Décoction.....	25

IV. Activité antioxydante.....

4.1. Effet scavenger des extraits étudiés envers le radical DPPH.....	26
4.2. Test du système β carotène/acide linoléique.....	26
4.3. Chélation des métaux.....	27

V. Activité antimicrobienne.....

5.1. Etude de l'effet antibactérien des extraits étudiés (test de diffusion sur l'agar).....	27
5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	29

Analyse statistique.....

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats.....

1. Extraction.....	31
2. Activité antioxydante.....	31
2.1. Effet scavenger en vers le radical DPPH.....	31
2.2. Test du β -carotène.....	34
2.3. Test de chélation des métaux.....	37
3. L'effet antibactérien des extraits.....	39

Discussion.....

1. Extraction.....	45
2. Activité antioxydante.....	45

2.1. Activité antioxydante du thé.....	46
2.2. L'activité antioxydante de l'origan.....	48
2.3. Activité antioxydante du gingembre.....	49
3. Activité antibactérienne.....	52
3.1. Gingembre.....	52
3.2. Origan.....	52
3.3. Thé.....	53
Conclusion générale.....	55
Références bibliographiques.....	56

Introduction

Les plantes médicinales constituent sans doute une source inépuisable de substances à activité biologique et pharmacologique variées.

L'utilisation souvent abusive des antibiotiques a induit, en plus des effets secondaires tels que les réactions allergiques, un phénomène de résistance des bactéries infectieuses aux antibiotiques disponibles. Ce problème que rencontre la médecine actuelle, a relancé la recherche vers l'élaboration d'autres stratégies thérapeutiques visant à exploiter les propriétés antimicrobiennes des substances naturelles pouvant substituer aux antibiotiques disponibles ou même pouvant agir en synergie avec ces derniers.

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants qui est souvent dû à un déficit en substances antioxydantes résultant d'une carence alimentaire. Cet équilibre peut être rétabli par une alimentation variée, notamment par la consommation de quantités suffisantes de fruits, de légumes et de différentes boissons riches en antioxydants qui peuvent agir dans la prévention de différentes pathologies associées aux ROS, à condition d'être apporté très tôt avant l'apparition d'effets irréversibles.

Le thé vert, l'origan et le gingembre constituent trois plantes largement consommées sous forme de boissons chaudes, comme elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines affections. Nous avons choisi les extraits aqueux de ces trois plantes pour mettre en évidence leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes ; pour en déduire leur capacité de réduire l'ampleur du stress oxydant et l'inhibition de la croissance bactérienne chez les consommateurs des boissons de ces plantes en particulier le thé, l'origan et le nouvelle boisson du gingembre qui commence à être largement consommée.

Le but de ce travail est l'évaluation du pouvoir antioxydant et antibactérien des extraits aqueux obtenus par décoction et par infusion de thé, de l'origan et du gingembre.

Revue

Bibliographique

I. Agents antioxydants et antimicrobiens

1.1. Espèces réactives de l'oxygène

Lors des processus métaboliques, l'oxygène peut devenir délétère par la formation de dérivés extrêmement réactifs appelées: espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species). Parmi ces espèces on trouve les radicaux libres qui sont des espèces chimiques ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbitale externe (Halliwell et Gutteridge, 1989). Ils sont très instables, de durée de vie très courte (10^{-4} à 10^{-6} secondes) et douées d'une grande réactivité chimique (Aurousseau, 2002). Ils sont capables d'induire des dommages considérables à différentes molécules de l'organisme telles que les lipides membranaires, les protéines cellulaires et l'ADN (Pelletier et *al.*, 2004). Les plus importants sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl ($\cdot OH$), l'oxygène singlet (1O_2) et le monoxyde d'azote ($NO\cdot$) et les espèces réactives non radicalaires telle que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$). Ces espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène sont potentiellement toxiques. Le peroxyde d'hydrogène par exemple, malgré qu'il est peu réactif en milieu aqueux il est très lipophile, ce qui lui permet de traverser les membranes et se trouver à une grande distance de son site de production (Dellatre et *al.*, 2004). En présence de certains métaux de transition, tel que le fer, le H_2O_2 peut interagir avec l' $O_2^{\cdot-}$ pour produire une espèce hautement réactive et de durée de vie très courte; le radical hydroxyle ($OH\cdot$) par la réaction de Fenton et Haber-Weiss (Valko et *al.*, 2006). Ce radical hydroxyle est considéré comme le plus réactif de tous les ROS formés par le système vivant (Datta et *al.*, 2004). Son pouvoir oxydant est tellement puissant qu'il peut réagir pratiquement avec toutes les macromolécules (Halliwell et Gutteridge, 1989).

Le H_2O_2 peut également être converti en acide hypochloreux ($HOCl$) en présence d'ions Cl^- , sous l'action de la myeloperoxydase (MOP). L' $HOCl$ est une substance détergente ayant des propriétés oxydantes très importantes (Bandyopadhyay et *al.*, 2004). D'ailleurs, il est considéré comme l'espèce la plus toxique et la plus réactive formée par les phagocytes (Witko-Sarsat, 2002). En effet, il peut oxyder des molécules biologiques comme l'inhibiteur de l'élastase (α_1 -antiprotéase) (Aruoma, 1999), l'albumine sérique et la fibronectine (Borel et *al.*, 1999).

1.1.2. Sources de production des ROS

Les ROS peuvent être d'origine exogène ou endogène. Les radiations ionisantes, la lumière ultraviolette, le tabac, certains pesticides et polluants ainsi que certains médicaments représentent les principaux précurseurs exogènes. Plusieurs systèmes enzymatiques et non enzymatiques, situés dans divers compartiments cellulaires représentent des sources d'origine endogène (Dellatre et *al.*, 2004 ; Berger, 2006).

*Sources exogènes

Les radiations X et γ peuvent, par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres et ceci en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Quant aux rayonnements UV, ils sont capables de produire l'anion superoxyde ou l'oxygène singulet (Beani, 1995 ; Favier, 2003).

Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, constituent une source importante de ROS.

Une large variété de xénobiotiques et médicaments peut contribuer à la production des ROS qui ne sont que des produits de leur métabolisme *in vivo* (Martinez-Cayuela, 1995). Une grande partie des aliments consommés contient différents types d'oxydants tels que les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition qui peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène.

*Sources endogènes

Bien que les systèmes exogènes représentent une source non négligeable des ROS, les systèmes endogènes intracellulaires sont plus importants, du fait que les ROS sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule de l'organisme. L'auto-oxydation, les mitochondries et les microsomes, les protéines héméniques (hémoglobine et myoglobine), les cellules phagocytaires activées, les métaux de transition et enfin plusieurs systèmes enzymatiques sont les sources endogènes majeures des ROS (Dellatre et *al.*, 2004).

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue une source majeure des ROS dans les systèmes biologiques (Favier, 2003). Dans les conditions physiologiques normales, 1 à 2% de l'oxygène réduit dans la mitochondrie est converti en $O_2^{\cdot-}$ par la NADH déshydrogénase et l'ubisemiquinone de la chaîne respiratoire (Chiarugi et Fiaschi, 2006). L'anion superoxyde ainsi formé est dismuté en H_2O_2 par la superoxyde dismutase intramitochondriale. Cette réaction entraîne une accumulation du H_2O_2 qui peut réagir avec les ions ferreux de la mitochondrie (réaction de Fenton) et produire le radical hydroxyl (Sedensky et Morgan, 2006).

Toute fois, la source majeure du $O_2^{\bullet-}$ est sans doute la "flambée respiratoire des cellules phagocytaires activées (neutrophiles, éosinophiles et macrophages) en réponse aux stimuli inflammatoires. Cette flambée respiratoire est caractérisée par une augmentation intense de la consommation de l'oxygène, régi par le complexe enzymatique NADPH oxydase (Babior et *al.*, 2002). Celui-ci est rapidement dismuté en H_2O_2 par la SOD (Superoxyde dismutase) (Dellatre et *al.*, 2004). Le H_2O_2 ainsi formé est rapidement dégradé en HOCl par la MPO (myeloperoxydase) (Klebanoff, 2005).

L'activité de quelques enzymes cytoplasmiques conduit également à la formation des ROS, la xanthine oxydase et l'aldéhyde déshydrogénase forment l'exemple le plus important (Dellatre et *al.*, 2004). Dans les érythrocytes, une source importante de la production des ROS est l'auto oxydation de l'hémoglobine conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).

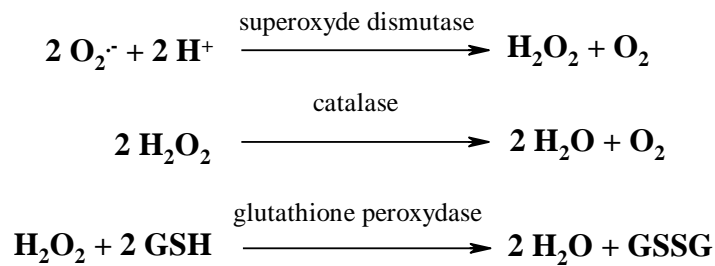
Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), une autre espèce radicalaire, est synthétisé à partir de l'arginine par les différentes NO^{\bullet} synthases (NOS) à des fins de médiation au niveau des cellules nerveuses, endothéliales et des macrophages (Hwang et Kim, 2007).

1.1.3 Système de défense antioxydante

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations. Pour faire face à ces attaques, les organismes disposent de systèmes d'action antioxydante qui visent à éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, d'une part et à induire la synthèse des antioxydants, d'activer les systèmes de réparation et d'éliminer des molécules endommagées d'autre part (Pelletier et *al.*, 2004). Ce système de protection est constitué de trois groupes majeurs à savoir le système enzymatique, le système des chélateurs et le système des piègeurs.

*** Système enzymatique**

Le système enzymatique antioxydant est représenté principalement par trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Leur action est de neutraliser les ROS par leur transformation en molécules stables et non radicalaires. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire selon les réactions suivantes (Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Bandyopadhyay et *al.*, 2004).



***Système des chélateurs**

Le système des chélateurs représente une ligne de défense qui prévient le déclenchement des réactions radicalaires. Ce système fait impliquer des enzymes ferroxidases et certaines protéines qui ont la capacité de fixer les métaux, en particulier le fer (Marfak, 2003). Une fois ces métaux fixés, les réactions radicalaires dépendantes de ces métaux seront inhibées (Senator, 2004). La ferroxidase transforme les ions ferreux (Fe^{2+}) en ions ferriques (Fe^{3+}). Cette activité favorise la fixation du fer par la transferrine et la lactoferrine qui ont une bonne affinité pour ces ions. Le maintien des métaux de transition dans un état inactif est assuré aussi par certaines protéines comme l'albumine et la ceruloplasmine qui fixent le cuivre. L'acide urique joue aussi un rôle de chélateur en formant un complexe avec le fer et le cuivre (Bandyopadhyay et *al.*, 2004).

***Système des piègeurs**

Certains antioxydants agissent en piégeant les radicaux, en captant l'électron célibataire, ils les transforment en molécules ou ions stables (Favier, 2003). Ce type d'antioxydants est appelé piègeurs ou scavengers (éboueurs en anglais). De très nombreux composés alimentaires peuvent avoir ce comportement tels que les polyphénols et les alcaloïdes (koeschlin-Ramonatxo, 2006 ; ES-Safi et *al.*, 2007). De plus, il existe des composés endogènes synthétisés par les cellules qui jouent le même rôle dont le plus important est le glutathion réduit (Favier, 2003).

1.1.4. Balance oxydants- antioxydants

La formation des ROS n'est pas toujours synonyme de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît (Pelletier et *al.*, 2004). D'ailleurs, Le terme de stress oxydant signifie un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur des premiers (Fiorucci, 2006 ; França et *al.*, 2007). La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en l'un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition. Le débordement peut aussi résulter d'anomalies génétiques responsables de la déficience

des antioxydants enzymatiques ou des protéines synthétisant ou régénérant les antioxydants (Favier, 2003). Un bon fonctionnement de l'organisme dépendra de l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants qui peuvent être bénéfiques ou dangereux en fonction des quantités disponibles dans l'organisme (Senator, 2004). Ce déséquilibre est responsable de l'altération des différentes macromolécules de l'organisme comme la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, des acides nucléiques et des glucides.

Les acides gras polyinsaturés sont plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs (Servais, 2004). La peroxydation lipidique peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy nonenal (4-HNE) qui peuvent endommager les protéines et l'ADN (Servais, 2004 ; Manduzio et al., 2005 ; Valko et al., 2006). L'attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation des LDL (lipoprotéines de densité légères) oxydées qui, une fois captées par les macrophages formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Favier, 2003). Alors que l'attaque des phospholipides membranaires entraîne la diminution de la fluidité, l'altération de la perméabilité, la perturbation des fonctions des enzymes et des transporteurs membranaires, ce qui conduit à la mort cellulaires (Pincemail et al., 2002).

Les ROS peuvent aussi attaquer sélectivement les protéines comportant des groupements SH et les acides aminés cyclique (Valko et al., 2006). Les protéines altérées vont entre autre s'agréger en formant des ponts bityrosines intramoléculaires ou intermoléculaires (Hwang et Kim, 2007). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases, notamment des protéasomes (Dalle-donne et al., 2006). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, elles vont alors former des amas anormaux à l'intérieur ou autour des cellules. Les amas associés aux lipides forment alors des dépôts de lipofushines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

L'attaque radicalaire des glucides et beaucoup moins étudiée que celle des autres molécules (Favier, 2003). L'oxydation des glucoses en présence des ions métalliques, conduit à la libération des aldéhydes, du H_2O_2 et de $l^{\bullet}OH$ qui entraîneront la coupure des protéines ou leur glycation (Favier, 2003).

L'ADN est également très sensible à l'attaque des ROS en particulier le radical hydroxyl et l'oxygène singulet (Clarkson et Tompson, 2000 ; Favier, 2003). L'ADN mitochondrial, est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de

réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de la chaîne respiratoire. Ainsi, le taux des bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mitochondrial par rapport à l'ADN nucléaire (Senator, 2004). Les lésions provoquées dans l'ADN peuvent être classées en diverses catégories: bases oxydées, altération du pentose, des adduits intra-caténaux et des pontages ADN-protéine.

1.2. Agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens ou antibiotiques sont des substances qui ont pour effet de tuer les microorganismes pathogènes ou d'inhiber leur croissance (Prescott et *al.*, 2003). Certains antibiotiques sont d'origine naturelle, ils sont totalement synthétisés par des microorganismes tels que la vancomycine et la streptomycine produites par *Streptomyces* sp et la bacitracine par *Bacillus* sp, la pénicilline et la céphalosporine produite par *Penicillium* sp et *Cephalosporium* sp respectivement. D'autres antibiotiques sont semi-synthétiques (l'ampicilline) et résultent de la modification des antibiotiques naturels par l'addition d'un groupement chimique et plusieurs autres agents antimicrobiens sont totalement synthétiques comme les sulfamides.

1.2.1. Mécanismes d'action des substances antibactériennes

Les antibiotiques empêchent la multiplication des bactéries ou entraînent leur destruction par action au niveau d'une ou plusieurs étape(s) métabolique(s) indispensable(s) à la vie de la bactérie. Ces substances agissent au niveau de la paroi et/ ou du cytoplasme par cinq modes d'action (tableau 1).

Les parois bactériennes possèdent une structure unique inexistante chez les cellules eucaryotes, cette propriété rend les antibiotiques qui interfèrent avec sa synthèse (tableau 1) plus sélectifs. D'autres antibiotiques inhibent la synthèse protéique par fixation sur la petite ou la grande sous unité du ribosome procaryote. Certains antibiotiques exercent aussi leurs action en inhibant la synthèse des acides nucléiques ou en détériorant les membranes cellulaires. Les quinolones par exemple inhibent l'ADN gyrase et interfèrent ainsi avec la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN (Chambers et Sande, 1998). D'autres antibiotiques agissent comme des antimétabolites et bloquent le fonctionnement normal de certaines voies métaboliques (Prescott et *al.*, 2003).

Tableau 1. Mécanismes d'action de substances antibactériennes (Prescott et *al.*, 2003).

Agent	Mécanisme d'action
	Inhibition de la synthèse de la paroi
Pénicilline	Active les enzymes lytiques de la paroi. Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pentage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Ampicilline	
Vancomycine	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation
Bacitracine	Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action du transporteurs lipidique qui transfère le précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire
	Inhibition de la synthèse protéique
Streptomycine	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans lectures de l'ARNm
Gentamicine	
Chloramphénicol	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation de la liaison peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase
Erythromycine	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique
	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activité impliquant l'ADN
	Destruction de la membrane cellulaire
Polymyxine B	Se fixe à la membrane cellulaire et en perturbe la structure et les propriétés de perméabilité
	Antagonisme métabolique
Sulfamide	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque

1.3. Antioxydants et antimicrobiens naturels

1.3.1. Antioxydants naturels

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1997 ; Romieu et Trenga, 2001). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances comprenant les enzymes à activité catalytique spécifique mais aussi à différentes molécules hydro ou liposolubles.

Outre les substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants présents dans son alimentation. Les sources et les mécanismes d'action de quelques antioxydants naturels sont présentés dans le tableau 2. Les plus importants antioxydants sont: la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les flavonoides.

Tableau 2. Sources alimentaires de certains nutriments et son mécanisme d'action proposé par Romieu et Trenga, 2001.

Nutriment	Propriété et Mécanisme	Source alimentaire
Vitamine C (acide ascorbique)	*antioxydant hydrosoluble * scavage $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 , le $\cdot\text{OH}$, * la régénération de la vitamine E	Fruits, agrumes
Vitamine E (α -tocophérol)	* antioxydant liposoluble * bloque la peroxydation lipidique en réagissant avec le radical peroxy *piège le $^1\text{O}_2$ *réaction rapide avec les radicaux libre lipidique	Légumes, œufs, huiles
B carotène, lycopène et autres caroténoïdes	* antioxydant liposoluble * inhibe la peroxydation lipidique * scavage le $\cdot\text{O}_2$ * inactiver l'oxygène singulet	Fruits et légumes orange et verts: pomme de terre et carotte.
Flavonoides	* Capture directe de radicaux libres * Interaction avec les ions métalliques *Inhibition de divers enzymes	Fruits, légumes, thé vert et propolis

1. Vitamine E (α tocophérol)

Les tocophérols sont des molécules apportées par l'alimentation existant sous quatre isoformes (α , β , γ et δ). De ces quatre isoformes, l' α - tocophérol (la vitamine E) possède la plus forte activité antioxydante grâce à ses 3 substituants méthyles (figure 1) (Kamal- Eldin et Appelqvist, 1996).

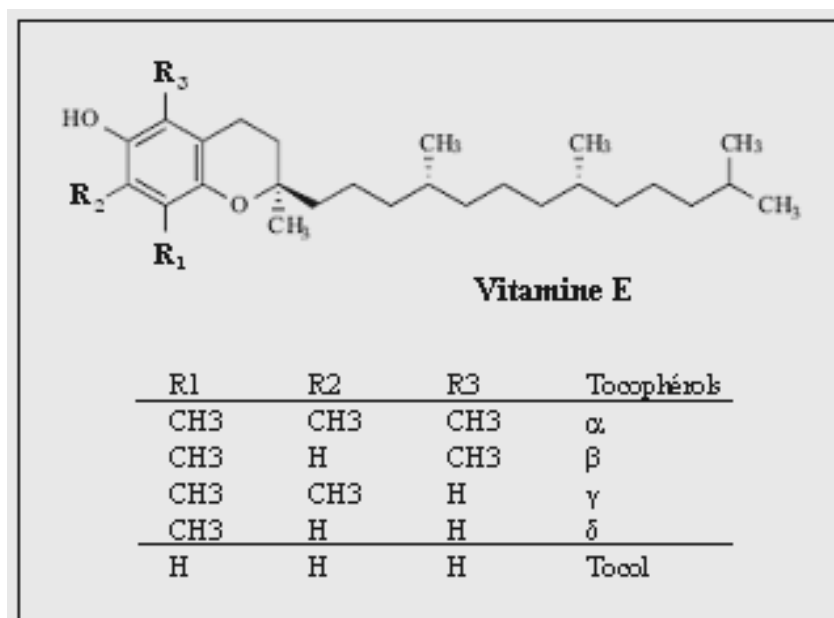
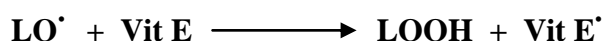


Figure 1. Structure des tocophérols (Coulon, 2004).

La vitamine E inhibe directement la peroxydation lipidique à l'intérieur des LDL (Datta et al, 2004). Par son caractère lipophile, la vitamine E peut s'insérer au sein des membranes où elle réagit plus rapidement avec les radicaux libres lipidiques (les radicaux alkoxy (LO^{\bullet}), les radicaux peroxy (LOO^{\bullet}) et les radicaux alkyles (L^{\bullet}) qu'avec l'oxygène (Traber et Atkinson 2007). En effet, elle cède son atome d'hydrogène phénolique au radical lipidique conduisant à la formation d'un hydroperoxyde, selon les réactions suivantes (Coulon, 2004).



La vitamine E radicalaire ainsi formée, sera régénérée grâce à l'acide ascorbique et le glutathion (Evans, 2000).

Les tocophérols réagissent aussi comme des piègeurs chimiques des radicaux oxygénés, surtout l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Blokhina et *al.*, 2003 ; Azzi, 2007). La vitamine E est considérée aussi comme un antioxydant indirect car elle inhibe la NADPH oxydase (Prévot-D'alvise, 2006).

2. Vitamine C (acide ascorbique)

Contrairement à la vitamine E qui réagit à l'intérieur des lipides membranaires, l'acide ascorbique est utilisé comme un système de transport d'électron dans le cytosol et les fluides extracellulaires (Evans, 2000). Elle participe aussi à la régénération de la vitamine E (Favier, 2003). L'acide ascorbique est l'antioxydant majeur du plasma où il piège les espèces réactives avant qu'elles ne réagissent avec les membranes biologiques et les lipoprotéines (Datta et *al.*, 2004). Il piège aussi $^1\text{O}_2$ et s'associe rapidement avec l'HOCL généré dans les sites inflammatoires (Halliwell Gutteridge, 1989). Il peut réagir avec le H_2O_2 , le $\cdot\text{OH}$, le radical peroxyde ($\text{LOO}\cdot$) (Koeschlin-Ramonatxo, 2006).

3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes forment une famille de polyènes conjugués pigmentaires aux capacités antioxydantes similaires à celles des tocophérols (Coulon, 2004). Les caroténoïdes comme le β -carotène, le γ -carotène ou le lycopène sont des composés liposolubles, transportés à l'intérieur des particules lipoprotéiques (Pryor, 1984 ; Clarkson et Tompson, 2000). Dans les conditions physiologiques (basse pression d' O_2), les caroténoïdes sont d'excellents piègeurs de radicaux libres (Barros et *al.*, 2007). L'effet antioxydant du β - carotène est dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur (Coulon, 2004). Le β - carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes. Le radical peroxyde se fixe sur un carbone de la chaîne poly-insaturée et sera stabilisé (Milane, 2004). Les caroténoïdes sont aussi capables d'inactiver l'oxygène singulet (Datta et *al.*, 2004).

4. Flavonoïdes

Le terme de flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (Marfak, 2003), les flavonoïdes se trouvent dans les différentes parties des plantes à savoir: les graines, les tiges et les fleurs. Ils sont très abondants dans différents fruits et légumes, dans le thé, le propolis et le miel. Plus de 4000 types de flavonoïdes ont été isolés à partir de diverses plantes (Datta et *al.*, 2004). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les

flavonols, les isoflavones, les flavanone et les anthocyanidines (Figure 2). Ils sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques comme entre autres l'activité antioxydantes, anti-inflammatoire, anti-tumorale (Vukies et *al.*, 2008), anti-allergique (Yamamura et *al.*, 1998) et anti-ischémique (Rump et *al.*, 1995).

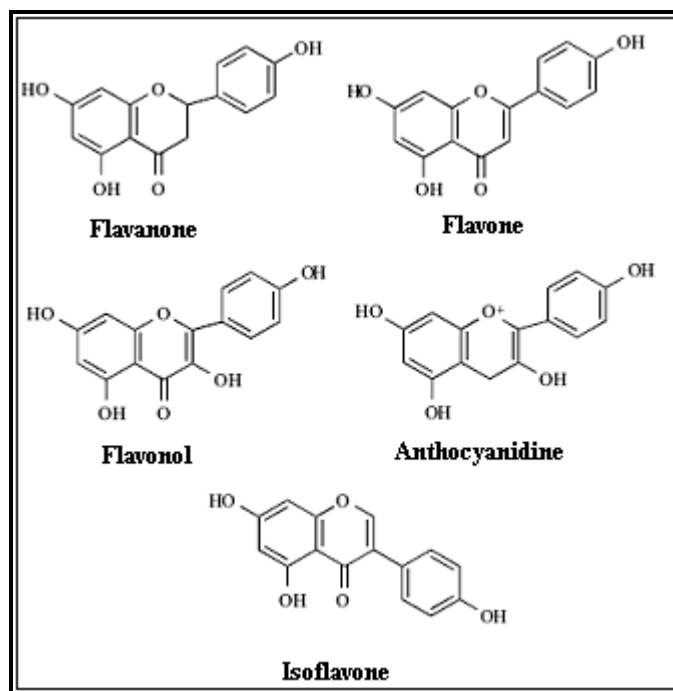
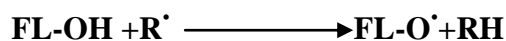


Figure 2. Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Dalle-donne, 2006).

Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes sont reliés à leur activité antioxydante (Ghedira, 2005). Les flavonoïdes possèdent une structure chimique idéale qui leur confère une capacité à piéger les radicaux libres, et ils sont considérés comme les antioxydants les plus efficaces *in vitro* même plus que les tocophérols et l'acide ascorbique (Blokhina et *al.*, 2003). L'activité antioxydante des flavonoïdes peut être exercée par 3 mécanismes différents :

1. Capture directe de radicaux libres : Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leur potentiel antiradicalaire (Fiorucci, 2006). De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes (FL-OH) est essentiellement liée à leur capacité de réduire les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxydes, hydroxyles, peroxydes, et alkoxydes par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante (Marfak, 2003) :



Le radical flavonoxy (FL-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Marfak, 2003) (Figure 3).

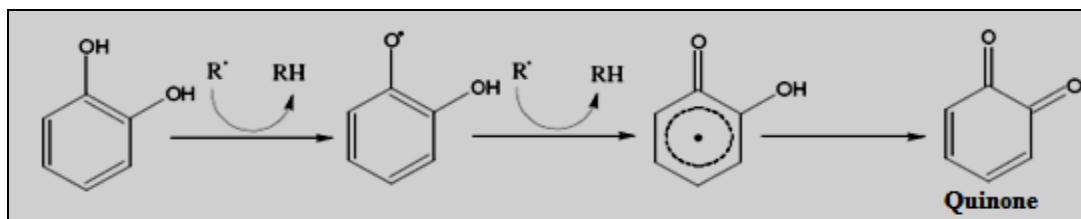


Figure 3. Scavenging des ROS (R[•]) par les flavonoides (Marfak, 2003).

2. Interaction avec les ions métalliques : Les flavonoides sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques en particulier le fer et le cuivre et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi la production de ROS (Rice-Evans et *al.*, 1997, Fiorucci, 2006).

3. Inhibition de divers enzymes : Les enzymes qui peuvent être inhibées par les flavonoides sont la xanthine oxydase, la lipo-oxygénase, les cyclo-oxygénase, et les nitriques oxyde synthase (NOS) (Fiorucci, 2006). En outre, les flavonoides préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (Milane, 2004). Ils sont donc de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (De Whalley et *al.*, 1990).

1.3.2. Antimicrobiens naturels

La découverte des antibiotiques fût un grand évènement dans l'histoire de l'humanité. Cependant, l'utilisation abusive de ces substances est la cause de l'apparition de la résistance et du développement des allergies. En effet, la résistance aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses (Witte et *al.*, 2008). Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactérienne et induisant la dissémination des souches multirésistantes. De ce fait, les recherches sont orientées vers la caractérisation de nouveaux agents antimicrobiens d'origine naturelle, plus précisément d'origine végétale qui peuvent substituer les antibiotiques classiques ou agir d'une manière synergique avec ces derniers.

Les plantes synthétisent différents métabolites secondaires comme les phénols et leurs dérivés. Ces substances qui constituent un moyen de défense pour les plantes contre leurs

différents prédateurs sont souvent pourvus d'activités antimicrobiennes remarquables (Nitta et *al.*, 2002 ; Kordali et *al.*, 2008).

***Flavonoïdes**

Plusieurs flavonoïdes ont montré des activités antibactériennes remarquables, tels que la quercétine (Plaper et *al.*, 2003) et les catéchines (Si et *al.*, 2006). Les flavonoïdes exercent cet effet via trois mécanismes : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique et enfin l'inhibition du métabolisme énergétique (Cushine et Lamb, 2005).

L'un des mécanismes d'action qui se trouve à l'origine de l'effet antimicrobien des flavonoïdes serait la capacité d'inhiber la synthèse des acides nucléiques. Les catéchines, par exemple, qui sont les principaux composés du thé vert sont capables d'inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN chez *Protéus vulgaris* et *Staphylococcus aureus* (Mori et *al.*, 1987). En effet, les flavonoïdes peuvent s'intercaler par leur noyau B (figure 4) entre les bases des acides nucléiques ou faire des liaisons avec ces derniers. L'effet des flavonoïdes sur la synthèse des acides nucléiques serait également dû à l'inhibition de certaines enzymes clés de la synthèse des acides nucléiques (Plaper et *al.*, 2003). La quercétine et l'apigénine par exemple, inhibent l'ADN gyrase d'*E. Coli* après la formation d'un complexe avec une sous unité de cette enzyme inhibant de ce fait son activité ATPase (Plaper et *al.*, 2003). La rutine par contre, inhibe les topoisomérases de décaténation de l'ADN chez *E. Coli* et stimule l'activité de clivage des topoisomérases (Bernard et *al.*, 1997).

La membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne constitue une autre cible des flavonoïdes. Ces derniers sont capables de détruire cette barrière (Ikigai et *al.*, 1993 ; Kusuda et *al.*, 2006) ou de changer la fluidité membranaire (Tsuchiya et *al.*, 2000). En effet, en présence de certains flavonoïdes comme les catéchines, il se produit une perte de biomolécules intracellulaires telles que les nucléotides chez *Staphylococcus mutans*, cette perte serait le résultat d'un changement de la perméabilité de la membrane cellulaire et d'une perturbation de sa fonction (Cishine et lamb, 2005). Ce mode d'action a été notamment attribué au propolis qui a montré la capacité de diminuer la résistance des cellules aux antibiotiques et un effet synergique avec des antibiotiques comme la tétracycline (Mirzoeva et *al.*, 1997 ; Bastos et *al.*, 2008) et l'ampicilline (Stepanovic et *al.*, 2003). D'autres études ont rapporté que les flavonoïdes peuvent aussi interférer avec le métabolisme énergétique des bactéries. En effet, certains flavonoïdes comme les retrochalcones et le flavanone lonchocarpole A inhibent fortement la consommation de l'oxygène (Haraguchi et *al.*, 1998).

***Phénols simples et acides phénoliques**

Les Phénols simples et les acides phénoliques sont parmi les molécules bioactives les plus simples du métabolisme secondaire des plantes. Ces substances montrent une importante toxicité envers les microorganismes (Cowan, 1999). Les sites et le nombre des groupements OH dans les phénols seraient en relation avec cette toxicité envers les microorganismes. Cet effet antimicrobien augmente avec le nombre des groupements OH. Cet effet est probablement dû à l'inhibition de certaines enzymes via des réactions avec leurs groupements sulfhydryl ou par des interactions non spécifiques avec ces dernières (Yamamoto et Ogawa ; 2002; Elzaawely et *al.*, 2005 ; Taguri et *al.*, 2006)

***Quinones**

Les quinones sont des substances extrêmement réactives très répandues dans la nature possédant des cycles aromatiques avec des groupements cétones (figure 4). Il a été rapporté que les quinones sont capables de se complexer irréversiblement avec les acides aminés nucléophiles des protéines conduisant souvent à leur inactivation et à la perte de leurs fonctions (Cowan, 1999). Ce-ci serait probablement à l'origine de l'effet antimicrobien de ces substances. Leurs cibles probables au sein de la cellule microbienne seraient les protéines d'adhésion de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires (Cowan, 1999).

***Tannins**

Le terme de tannins désigne un groupe de polymères phénoliques capables de tanner la peau des animaux. Ils se trouvent pratiquement dans toutes les parties de la plante (bois, écorces, racines, feuilles et fruits). Ce groupe de composés a suscité un grand intérêt au cours de ces dernières décennies vu qu'il a été rapporté que la consommation des boissons contenant les tannins tels que le thé vert peut guérir ou prévenir plusieurs maladies (Zhao, 2006 ; Khan et Mukhtar, 2007). Plusieurs activités physiologiques humaines telles que la stimulation des cellules phagocytaires et une variété d'actions anti-infectieuses ont été attribuées aux tannins (Bruneton, 1999). Une de leurs actions moléculaires est la formation de complexes avec les protéines par des forces non spécifiques en particulier, les liaisons hydrogènes et hydrophobes (Haslam, 1996 ; Stern et *al.*, 1996). Le mode d'action antimicrobienne des tannins serait similaire à celui des quinones, cela peut être lié à sa capacité de détruire la membrane cytoplasmique (Funatogawa et *al.*, 2004) d'inactiver les adhésines de surface, les enzymes et les protéines de transport membranaires (Cowan, 1999 ; Kusuda et *al.*, 2006).

*Polypeptides

Les peptides inhibiteurs de la croissance des microorganismes sont connus depuis longtemps (Brown et Hancock, 2006). La plupart de ces peptides inhibiteurs sont chargés positivement et comportent des ponts dissulfures. Il semblerait qu'ils agissent par la formation de canaux ioniques dans la membrane microbienne ou par inhibition compétitive de l'adhésion des protéines microbiennes aux polysaccharides des récepteurs de la cellule hôte (Yang et al ; 2006 ; Dolezilvoka et al., 2007).

*Huiles essentielles

Plusieurs études ont rapporté que les huiles essentielles exercent une action antimicrobienne à large spectre qui touche aussi bien les bactéries (Chang et al., 2008), les champignons (Kumar et al., 2006) que les virus (Kokh et al., 2008). Les huiles essentielles de l'origan par exemple, inhibent fortement la croissance de *Escherichia coli*, de *Listeria monocytogena*, de *Salmonella typhimurium* et de *Staphylococcus aureus* (Oussalah et al., 2007). Il semblerait que cet effet serait dû à la présence du carvacrole. Le mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles est en générale mal connu et serait probablement due à la destruction de la membrane cytoplasmique ou à la rupture de la paroi cellulaire de la bactérie (Cowan, 1999 ; Rasooli et al., 2006).

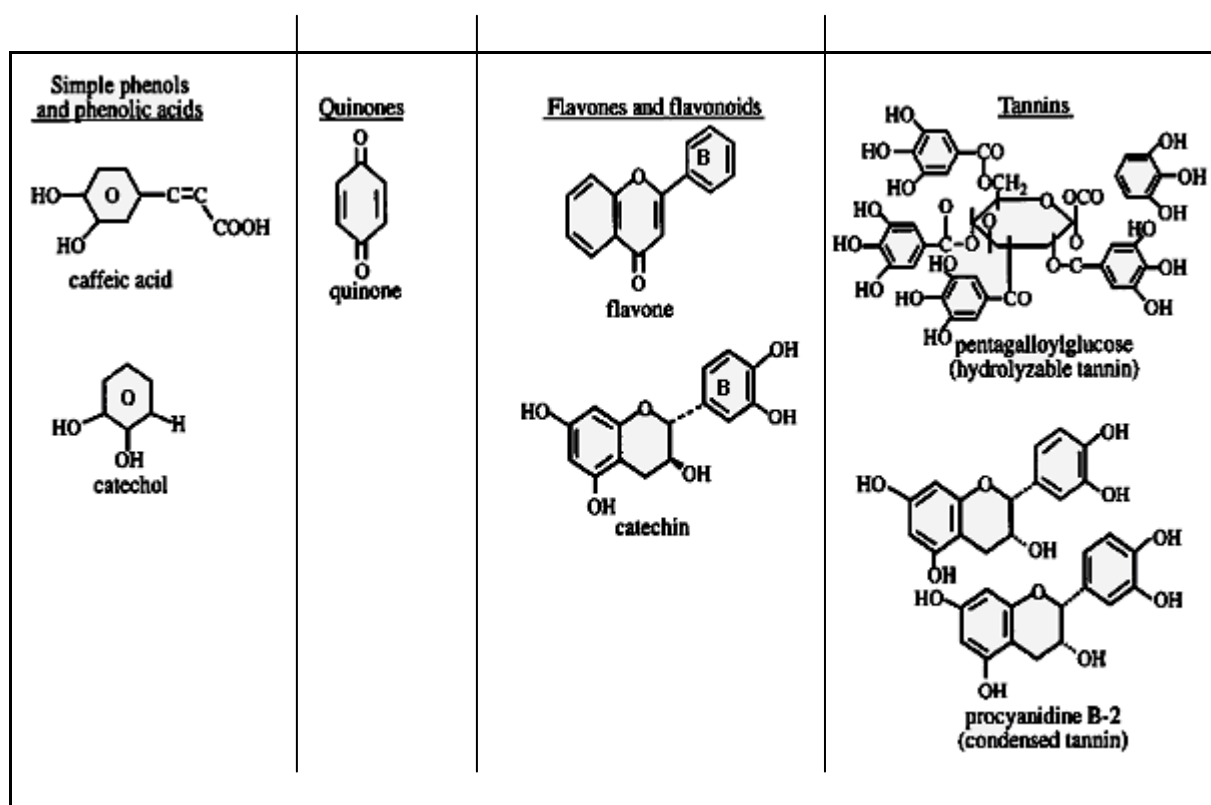


Figure 4. Structure de certains composés d'origine végétale doués d'activité antimicrobienne (Cowan, 1999).

II. Plantes utilisées

2.1. Le thé (*Camellia sinensis*)

Il existe de très nombreuses sortes de thé commerciaux qui diffèrent selon les variétés botaniques, l'âge des feuilles, la variété de traitement et l'origine géographique. Le thé commercial peut être vert, noir, semi fermenté (oolong) ou décaféiné. Le thé vert est stabilisé par la chaleur sèche ou par la vapeur, procédé qui sert à inhiber les polyphénols oxydases (Frei et Higdon, 2003). Il est ensuite roulé et séché rapidement ou plus au moins torréfié (figure 5). Le thé noir est flétri pendant 20 heures, puis roulé, fermenté en atmosphère humide et séché à l'air chaud. Le thé de l'oolong est partiellement fermenté. Le thé décaféiné est produit par mélange des feuilles sèches du thé vert, noir ou semi fermenté avec un solvant organique qui dissout la caféine qui sera ensuite éliminée (Bruneton, 1999 ; Chan et *al.*, 2007).



Figure 5. Photographie du thé (*Camellia sinensis*), A : plante fraîche; B: feuilles sèches (thé commercial)

2.1.1. Composition chimiques

Les feuilles de thé comportent plusieurs types de composants dont les polyphénols sont les plus majoritaires, constituant de 10 à 30% de leur poids sec (Farhoush et *al.*, 2007). Cette teneur varie selon le climat (Chan et *al.*, 2006), l'âge de la feuille (les feuilles jeunes en sont plus riches), la saison (plus élevée en été) (Bruneton, 1999) et la variété (assamica de l'Inde 30% et sinensis de Chine 22%) (Yao et *al.*, 2006). Ces polyphénols comprennent entre autres les catéchines, les flavonols, les flavanones, les acides phénoliques et les esters galliques de glucose (tanin galliques). Les catéchines comme l'épigallocatechine (EGC) ;

l'épigalocatéchine galate (EGCG) ; les galocatéchines (GC) et l'épicatéchine (EC) sont les polyphénols les plus abondants du thé (Lin et *al.*, 2003 ; Yao et *al.*, 2006 ; Chan et *al.*, 2006). Une tasse de thé vert apporterait ainsi 300 à 400 mg de polyphénols. Après fermentation (thé noir), la composition du thé change, et la couleur de l'infusion passe du jaune pâle (thé vert) au rouge brun (thé noir) (Brunton, 1999, Bhattacharyya et *al.*, 2006). Outre les composés phénoliques, les feuilles du thé contiennent des protéines, des acides aminés et des glucides (Bruneton, 1999 ; Chen et *al.*, 2005). Elles comportent également des hétérosides d'alcools terpéniques, aliphatiques et aromatiques responsables de l'arôme de l'infusion (Bruneton, 1999). Des bases puriques (caféine) (Rong et *al.*, 2005 ; Chen et *al.*, 2006), des vitamines (acide ascorbique et vitamine K) (Wanatab et *al.*, 1998 ; Reto et *al.*, 2007) ainsi que des éléments minéraux (Mn, Co, Ca, Cu, Fe, Mg, P, K, Na et Zn) entrent également dans la constitution des feuilles de thé (Gallaher et *al.*, 2006 ; Mehra et Baker, 2007.).

2.1.2. Activité biologique

Le thé vert (extrait aqueux des feuilles de *Camellia sinensis*) est l'un des boissons les plus populaires et les plus consommées dans le monde, vue son arôme, son goût et surtout ses effets biologiques. D'ailleurs, en orient le thé était utilisé comme une plante médicinale pendant 4000 années avant d'être une boisson (Bruneton, 1999 ; Reto et *al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que l'incidence des maladies ou le risque de développer des pathologies est beaucoup plus faible chez les buveurs de thé ou dans les régions dans lesquelles le thé est couramment consommé (Benzi et *al.*, 1999 ; Zhao, 2006 ; Tsai et *al.*, 2006). De ce fait, l'étude des propriétés biologiques du thé a suscité un grand intérêt au cours de ces dernières décennies. En effet, plusieurs études ont rapporté que la consommation régulière du thé diminuerait significativement la cholestérolémie, la triglycéridémie et le rapport LDL/HDL d'où la diminution du risque d'athérosclérose et de la prévalence des maladies cardiovasculaires (Brunton, 1999; Burssil et *al.*, 2006; Cheng, 2006). Le thé jouerait aussi un rôle préventif envers différentes maladies telles que l'Alzheimer, le Parkinson (Chaturvedi et *al.*, 2006 ; Zhao, 2006), l'obésité, le diabète (Cheng, 2006), l'ischémie (Brad et *al.*, 2006) et les ulcères (Maity et *al.*, 1998). Le thé agit aussi comme agent anti-mutagène (composé isolé du thé) (Van der Merwe et *al.*, 2006), anti-prolifératif (Kuo et *al.*, 2005) et anti-inflammatoire (De Bacquer et *al.*, 2006). Le thé protégerait également contre différents types de cancers comme le cancer du colon (Hirose et *al.*, 2001) de l'intestin (Hirose et *al.*, 2002), de la bouche (Chandra Mohan et *al.*, 2006) de la peau (Katiyar et *al.*, 2007) et les tumeurs du cerveau (Zhang et *al.*, 2006). Cet effet serait dû notamment à l'induction de l'apoptose et à l'inhibition des mutations, des enzymes protéolytiques de l'invasion, de l'angiogénèse, de la

signalisation intracellulaire ainsi que des dommages de l'ADN. Mais actuellement, c'est le potentiel antioxydant du thé qui retient le plus d'attention, vu que le stress oxydant est la base pathologique de la plupart des maladies chroniques (Farhoush et *al.*, 2007).

***Activité antioxydante**

Différentes études ont montré que le thé est pourvu d'une activité antioxydante très puissante. En effet, il a été montré, par exemple que l'extrait aqueux du thé diminue significativement la peroxydation lipidique dans l'intestin grêle et les poumons et qu'il est capable d'augmenter la résistance des érythrocytes envers le radical peroxy (Sakakibara et *al.*, 2006). Cette activité serait notamment attribuée à la présence des catéchines (Yamamoto et *al.*, 2006). Selon d'autres auteurs, l'infusion du thé augmenterait également le taux des antioxydants plasmatiques chez l'homme (Benzi et *al.*, 1999). Certaines études ont rapporté que cette activité du thé est en grande partie due à la présence des polyphénols (Hashimoto et *al.*, 2003 ; Farhoosh et *al.*, 2007). Les polyphénols du thé agissent aussi comme antioxydants en piégeant des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène ainsi. (Zhao, 2006 ; Tsai et *al.*, 2006). Ils peuvent aussi fonctionner comme des antioxydants indirectement soit par l'inhibition des enzymes prooxydantes telles que la iNOS (Nitric Oxide Synthase inductible) (Lin et *al.*, 2006), lypooxygénase, cyclooxygénase et la xanthine oxydase ; soit par l'induction des enzymes antioxydantes comme la SOD et la glutathion S transférase (Frei et Higdon, 2003).

***Activité antimicrobienne**

Le thé vert est également un antimicrobien efficace. En effet, il exerce une activité notable contre les bactéries de l'appareil digestif (Wu et *al.*, 2007) et celles responsables de la détérioration des aliments (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, et *Bacillus cereus*) (Si et *al.*, 2006). Le thé exerce aussi une activité bactéricide envers différentes souches pathogènes et même celles qui sont résistantes à la ciprofloxacine comme *staphylococci* et *pseudomonas aeruginosa* (Lee et *al.*, 2003). Les polyphénols du thé peuvent diminuer la thermo-résistance des bactéries formants des spores telles que *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium thymoaceticum* (Sakanaka et *al.*, 2000). Le thé possède également une activité antifongique (Sato et *al.*, 2000) et antivirale, sur l'épstein bar virus et le virus de l'influenza (Sato et *al.*, 2000 ; Song et *al.*, 2005).

2.2. L'origan (*Origanum glandulosum*)

L'origan ou *Origanum glandulosum* est une plante aromatique appartenant à la famille des lamiacées et largement distribuée dans la région méditerranéenne y compris l'Algérie et la Tunisie (Bendahou et al, 2007). Il s'agit d'une plante vivace de 20 à 60 cm de hauteur, très aromatique et couverte de poils mous (figure 6). Ses fleurs sont roses et ses feuilles sont ovales (Fournier, 1999).



Figure 6. Photographie de la plante de l'origan (*Origanum glandulosum*) A, plante fraîche ; B, feuilles sèches (origan commercial)

2.2.1. Composition chimique

L'origan comporte différents types de composés dont les plus abondants sont les composés phénoliques comme les tannins (Fournier, 1999; Ivanova et al., 2005), les flavonoides, l'acide caféique et l'acide rosmarinique (Kouri et al., 2007). L'origan est également riche en huiles essentielles. La fraction majoritaire est celle du carvacrol suivi par le thymol, le *p*cimene et le γ terpinene avec respectivement : 85.49%, 3.78%, 2.62% et 2.06% de l'huile essentielle (Bampidis et al., 2005).

2.2.2. Activité biologique

L'origan est en général très utilisé en cuisine italienne et méditerranéenne comme épice sous sa forme fraîche ou sèche. La plante séchée est également utilisée dans l'industrie alimentaire pour améliorer le goût (Bertelli et al, 2003). L'infusion de l'origan est recommandée contre la catarrhe chronique et l'asthme humide, les troubles circulatoires, la jaunisse, les maux de gorge, la toux, les névralgies et pour calmer les maux de dents (Fournier, 1999). Il est aussi utilisé comme antalgique dans les affections de la cavité buccal

et ou du pharynx et en cas de congestion nasale et du rhume (Bruneton, 1999). L'origan est aussi utilisé pour soulager des douleurs rhumatismales et des crampes (Fournier, 1999). L'extrait aqueux de l'origan a montré également un effet antihyperglycémiant chez les rats diabétiques, mais sans affecter la concentration plasmatique de l'insuline (Lemhadri et *al.*, 2004). L'huile essentielle de l'origan possède aussi un effet antimutagène, une activité insecticide et serait capable d'altérer la croissance du trypanosome (Ipek et *al.*, 2005; Santoro et *al.*, 2006; Calmasur et *al.*, 2006; Mezzoug et *al.*, 2007).

***Activité antioxydante**

Peu d'études ont rapporté l'effet antioxydant de l'origan. Certaines ont montré que les extraits alcooliques de l'origan était capable d'inhiber la peroxydation lipidique, l'oxydation des LDL humains et de piéger les radicaux libres (Dorman et *al.*, 2003; Chun et *al.*, 2005 ; Kapeka et *al.*, 2005). Cette activité serait due en grande partie à la présence des polyphénols. Les huiles essentielles de l'origan ont également exercées une forte activité antioxydante et qui serait comparable à celle du tocophérol et du BHT. Cette activité antioxydante des huiles essentielles est souvent attribuée au thymol et au carvacrol (Kulisic et *al.*, 2004).

***Activité anti microbienne**

L'origan aurait également une activité antimicrobienne considérable. En effet, il a été rapporté que l'extrait méthanolique de l'origan inhibe la croissance des bactéries appartenant au genre *helicobacter* (Chun et *al.*, 2005). D'autres auteurs ont montré que l'hydrosol de l'origan exerce un effet inhibiteur envers la croissance de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 2392 *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501 (Sagdiç, 2003). Les huiles essentielles de cette plante ont aussi montré une activité antibactérienne et anti fongique en vers une multitude de bactéries et de champignons (Baydar et *al.*, 2004, Bendahou et *al.*, 2007 ; Sahin et *al.*, 2004) et inhibent également la croissance et le développement des spores des levures des aliments (Souza et *al.*, 2007).

2.3. Le gingembre (*Zingiber officinalis*)

Le gingembre (*Zingiber officinalis*), est une plante herbacée vivace appartenant à la famille des zingibéracées (figure 7). C'est une plante rampante au rhizome épais et tuberculeux qui se trouve ramifié dans un seul plan (Grunwald et Janicke, 2006).



Figure 7. Photographie de *Zingiber officinalis* montrant la partie aérienne et les rhizomes de la plante (A : rhizomes secs ; B : rhizomes frais).

Le gingembre est cultivé en Inde, en Chine, dans tout le sud-est asiatique (Indonésie, Philippines, etc.) ainsi qu'en Afrique tropicale (Nigeria). L'aspect du rhizome varie selon le mode de préparation : gingembre gris, gingembre blanc ou gingembre confit. La cassure est fibreuse et granuleuse, l'odeur est aromatique et la saveur est chaude et piquante. (Bruneton, 1999 ; Sabulal, 2006).

2.3.1. Composition chimique

Les rhizomes de gingembre sont très riches en amidon qui représente près de 60%, mais ils renferment également des protéines, des graisses, des huiles essentielles (Bruneton et *al.*, 1999). Les rhizomes frais du gingembre contiennent aussi de l'anthocyanine qui constitue 0,67-2,38 mg/100g du rhizome (Ijima et *al.*, 2003). Leur composition en huiles essentielles varie beaucoup selon l'origine géographique, mais les éléments principaux sont des carbures sesquiterpéniques qui représentent 30 à 70 % des huiles essentielles de la plante. Les constituants responsables de la saveur très marquée de la plante sont connus sous les noms de [3-6], [8], [10] et de [12]-gingérol.

2.3.2. Activité biologique

Les rhizomes de gingembre sont très anciennement utilisés en Inde et en Chine soit comme épice soit comme plante médicinale. La plante est utilisée pour le traitement populaire de différents désordres tels que la fièvre, les douleurs musculaires et les maux de la gorge, la toux, les sinusites, les diarrhées, les crampes, l'indigestion, le manque d'appétit et la grippe (Ma et Gang, 2006) et ainsi pour soulager ou calmer les symptômes de l'arthrite et les rhumatismes (Khanom et *al.*, 2000).

Chez les personnes diabétiques et hypercholestrolémiques, la consommation de la poudre du gingembre diminue le taux de glycémie, le taux du cholestérol, de LDL et des VLDL (Andallu et *al.*, 2004). Le gingembre est également utilisé dans le traitement des nausées et des vomissements lors de la grossesse chez la femme (Bryer, 2000). Il a été aussi rapporté que l'extrait aqueux du gingembre exhibe une activité enthélmintique contre les nématodes gastro-intestinaux (Iqbal et *al.*, 2006), une activité contre l'obésité, une activité anti inflammatoire et antithrombotique (Han et *al.*, 2005 ; Thomson et *al.*, 2002). Il a été montré que l'extrait éthanolique du gingembre peut prévenir le développement de l'athérosclérose chez la souris en réduisant le taux, l'oxydation et l'agrégation des LDL plasmatiques réduisant de ce fait l'accumulation du cholestérol cellulaire (Fuhrman, 2000). Le gingérol et le shogaol, constituants majeurs du gingembre seraient d'importants agents anti cancéreux (Manju et Nalini, 2005). Ces derniers auraient notamment la capacité de prévenir la malignité du cancer *in vivo* et *in vitro* par inhibition de l'angiogénèse (Kim et *al.*, 2005). De plus, ces constituants montrent aussi une grande activité antiplaquettaire qui serait due à l'inhibition de la cyclooxygénase (Nurtjahja-Tjendraputra et *al.*, 2003).

***Activité antioxydante**

Les substances naturelles extraites du gingembre sont également d'importants agents antioxydants. En effet, il a été rapporté que l'addition du gingembre au régime alimentaire des rats prévient la formation des ROS et maintient l'intégrité des érythrocytes (Ahmed et *al.*, 2000). De plus, l'incorporation du gingembre dans l'alimentation des rats âgés diminue le stress oxydant (Topic et *al.*, 2002). Le taux des enzymes impliquées dans la défense antioxydante est significativement augmenté, accompagné par une réduction de la peroxydation lipidique dans le foie et les poumons de ces rats (Kota et *al.*, 2008). Une diminution des produits de l'oxydation des protéines dans le foie des rats ayant consommé du gingembre est également observée (Kota et *al.*, 2008). Le [6] gingérol un majeur composant du gingembre inhibe la synthèse de NO[•] et prévient les dommages NOO[•] dépendantes et serait également capable d'inhiber la NADPH oxydase et la xanthine oxydase (Ippoushi et *al.*,

2003 ; Kim et *al.*, 2005). L'activité antioxydante du gingembre serait attribuée aux polyphénols présents dans l'extrait.

***Activité antimicrobienne**

Des activités antimicrobiennes ont également été attribuées au gingembre. Des travaux ont par exemple montré que l'extrait éthanolique du gingembre exerce une activité antifongique (Ficker et *al.*, 2003) et antibactérienne importantes notamment envers les bacilles. De plus, l'extrait hexanique du gingembre réduit la concentration minimale inhibitrice des aminoglycosides chez les enterococcus résistants à la vancomycine. Les huiles essentielles du gingembre ont montré également un effet inhibiteur significatif envers *Candidat albicans*, *Aspergillus niger* (*antifongique*), *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas sp* (*antibactérien*) (Wannissorna et *al.*, 2005 ; Sabulal et *al.*, 2006). L'huile essentielle du gingembre a montré aussi un effet contre le virus de l'herpes (Koch et *al.*, 2008). Une protéine isolée à partir du rhizome de gingembre a montré un effet inhibiteur envers différents champignons comme *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella, arachidicola*, et *Physalospora piricola* (Wang et T B Ng, 2005).

Matériels

et

Méthodes

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

1.1. Plantes

Trois plantes ont été utilisées dans cette étude à savoir le thé, le gingembre et l'origan. Le thé utilisé (*Camellia sinensis sp*) est de type vert de marque « DISMA », il est originaire de Chine et acheté du marché local. Le gingembre (*Zingiber officinalis sp*) est aussi acheté du marché local sous sa forme sèche, son origine est aussi la Chine. Pour l'origan (*Origanum glandulosum sp*), il a été récolté de la région de Ain Oulmen au sud de Sétif.

1.2. Bactéries

L'activité antimicrobiens des extraits aqueux des trois plantes étudiées a été testée sur des souches bactériennes dont certaines (*Escherichia coli* : ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* : ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* : ATCC2592 3) proviennent de l'American Type Culture Collection, tandis que les autres (*Bacillus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*), nous ont été fournis par le laboratoire de bactériologie du CHU de Sétif, où elles ont été isolées à partir de prélèvements cliniques humains.

II. Produits chimiques

2.1. Solutions de travail

Tous les produits chimiques utilisés dans cette étude sont de grade analytique et proviennent de Sigma (St Louis, USA), Aldrich (Steinhaim, Allemagne), Fluka (Buchs, Suisse) ou Merck (Darmstadt, Allemagne).

- * DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl) (0.004%), préparé dans le méthanol pur.
- * β carotène (1mg/ml), préparé dans le chloroforme pur.
- * FeCl_2 (2mM), préparé dans de l'eau distillée.
- * Ferrozine (5mM), préparé dans de l'eau distillée.
- * BHT (Butylated Hydroxy Toluene) (2mg/ml), préparé dans l'éthanol pur.
- * Acide ascorbique (0,5 mg/ml), préparé dans de l'eau distillée.
- * EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) (1mg/ml), préparée dans de l'eau distillée.
- * Milieu Mueller Hinton (38g/l), préparé dans de l'eau distillée.
- * Bouillon nutritif (26g/l), préparé dans de l'eau distillée.

2.2. Milieux de cultures

Lors de la réalisation des antibiogrammes ou de la détermination de l'activité antimicrobienne des différents extraits étudiés, les bactéries sont cultivées sur un milieu solide de Mueller Hinton (Bio Rad). Tandis que la détermination de la CMI se fait sur des bactéries cultivées dans le bouillon nutritif de Mueller Hinton (Sigma).

2.3. Antibiotiques

Les antibiotiques de références employés dans cette étude se présentent sous forme de disques comportant: la polymyxine (PB) à 300 UI, la doxycycline (DOT) à 30UI ou le chloramphénicol (CMP) à 30µg.

III. Méthodes d'extraction

Les plantes utilisées dans cette étude sont toutes consommées sous forme de boissons chaudes voir même froides. C'est pour cette raison que les extraits aqueux de ces plantes sont choisis dans cette étude pour tester leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Pour le thé et l'origan nous avons utilisé les feuilles, tandis que pour le gingembre nous avons utilisé les rhizomes secs, après les avoir broyés. L'extraction est réalisée en milieu aqueux selon deux méthodes à savoir, l'infusion et la décoction (Stege et al, 2006).

- **Infusion** : Les feuilles de thé vert ou d'origan (5g) et les rhizomes de gingembre (5 ou 10g) sont déposés dans 100 ml d'eau distillée bouillante et laissés infuser pendant 20mn dans un récipient couvert.

-**Décoction** : Les mêmes proportions de plantes et d'eau distillée sont utilisées dans cette méthode, sauf que les mélanges sont laissés bouillir pendant 20mn.

Une fois le temps de l'infusion ou de la décoction écoulé, les extraits obtenus après élimination des feuilles ou des morceaux de rhizomes sont centrifugés à 2000 t/min pendant 7mn. Le surnageant est en suite lyophilisé et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

IV. Activité antioxydante

Les extraits aqueux du thé, de l'origan et du gingembre, obtenus par infusion ou décoction sont testés pour évaluer leur capacité antioxydante. Trois différents tests d'évaluation sont utilisés, à savoir le test du DPPH qui permet de déterminer l'effet scavenger, le système β -carotène/acide linoléique qui détermine le pouvoir réducteur et le test de chélation des métaux.

4.1. Effet scavenger des extraits étudiés envers le radical DPPH

L'évaluation de l'effet scavenger des extraits étudiés envers le radical DPPH est réalisée selon la méthode décrite par Que et ses collaborateurs (2006). Pratiquement, 2 ml de la solution de DPPH (0,1mM) sont ajoutés à 2 ml d'eau distillée contenant différents volumes d'acide ascorbique à 0.5 mg /ml ou des extraits étudiés (thé et origan à 1mg/ml, gingembre à 10mg/ml). Le contrôle est préparé de la même manière que pour les échantillons sauf que la substance testée est substituée par de l'eau distillée. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc. L'activité scavenger des extraits étudiés est alors exprimée en % et calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité scavenger (\%)} = [(Ac - Ae) / Ac] \times 100$$

*Ac : absorbance du contrôle.

*Ae : absorbance de l'échantillon.

4.2. Test du système β carotène/acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits étudiés est évaluée dans cet essai, par le système β -carotène/acide linoléique, selon la méthode décrite par Sun et Hu (2005), à laquelle certaines modifications ont été apportées. Pratiquement, une émulsion est préparée en mettant dans un ballon contenant 0.2 g de tween40, 1 ml de solution de β -carotène (1mg /ml) préparée dans le chloroforme pur. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation rotative pendant 4 min à 45°C à l'aide du rotavapor (Buchi R- 210 Stwitzerland). L'acide linoléique (25 μ l) et l'eau distillée (100 ml) sont en suite ajoutés au mélange suivi par une forte agitation pour former l'émulsion. Des aliquotes de 10 ml de cette émulsion sont immédiatement déposés dans des tubes contenant 700 μ l d'eau distillée (contrôle), 700 μ l d'une solution BHT (produit de référence) à 2mg/ml ou 700 μ l de l'extrait étudié. Immédiatement après le dépôt de l'émulsion dans les tubes, l'absorbance des mélanges au temps 0 est mesurée à 490 nm. Les tubes sont alors incubés dans un bain marie à 50C° et l'absorbance du mélange est mesurée toutes les 15 minutes pendant 2 heures. Les lectures sont effectuées contre un blanc constitué de la même émulsion que celle du départ mais dépourvue de β -carotène et dans laquelle les échantillons sont remplacés par leurs solvants. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition est calculée en appliquant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [1-(Aet- Ae_0) / (Act-Ac_0)] \times 100$$

Aet: absorbance de l'échantillon après deux heures.

Ae₀: absorbance de l'échantillon au temps 0.

Act : absorbance du contrôle après deux heures.

Ac₀: absorbance du contrôle au temps 0.

4.3. Chélation des métaux

La capacité des extraits étudiés à fixer les ions Fe^{2+} est évaluée selon une méthode adaptée de celle rapportée par Fei et ses collaborateurs (2006) d'une part et Oktay et ses collaborateurs (2003) d'autre part. Pour cela, 50 μ l de la solution de $FeCl_2$ (2Mm) et 100 μ l de la solution de ferrozine (5mM) sont ajoutées à 1850 μ l d'eau distillée contenant différents volumes d'EDTA à 1 mg/ml ou de l'extrait étudié (10mg/ml). Le contrôle est préparé de la même façon en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée. Les mélanges sont incubés à température ambiante pendant 10min puis l'absorbance est mesurée à 562nm. Le pourcentage de l'activité de chélation des extraits étudiés est calculé comme suit :

$$\text{Chélation (\%)}: [(Ac-Ae)/At] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

Ae : absorbance de l'échantillon.

V. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des différents extraits aqueux obtenus par décoction et par infusion du thé, du gingembre et de l'origan a été déterminée sur plusieurs souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*). Une fois l'effet obtenu, il est systématiquement quantifié. L'étude qualitative détermine le degré de sensibilité des microorganismes à la substance ajoutée au milieu. Différentes techniques sont utilisées pour étudier cet effet. La plus importante est la méthode des disques dont le principe se base sur la diffusion des substances testées du disque vers le milieu de culture solide. Cependant, l'étude quantitative mesure la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la substance testée.

Dans un premier temps, la sensibilité des bactéries envers les différents extraits utilisés est testée par la technique de diffusion sur l'agar. Dans le cas où le test est positif (importante zone d'inhibition), une étude quantitative est alors effectuée pour la détermination des CMI.

5.1. Etude de l'effet antibactérien des extraits étudiés (test de diffusion sur l'agar)

L'activité antibactérienne, obtenue avec les extraits étudiés est comparée à celle des antibiotiques standards. Cette approche fournit une meilleure preuve de l'action antibactérienne des substances utilisées. La technique utilisée (Rahal, 2005) permet de mesurer *in vitro* le diamètre du halo d'inhibition (zone claire) qui représente la zone de non croissance

bactérienne. Plus le diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antimicrobienne est importante. La figure 8 résume les différentes étapes de cette technique.

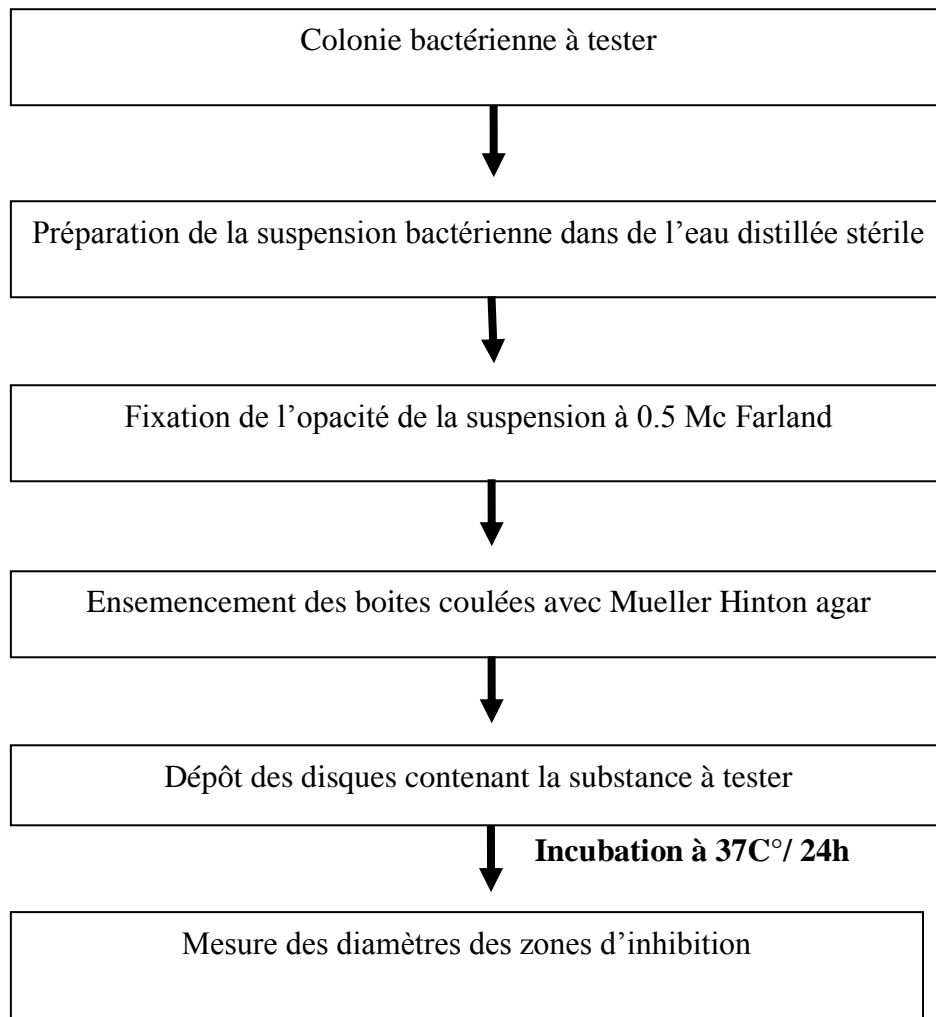


Figure 8. Etapes de l'étude de l'effet inhibiteur des extraits sur les bactéries.

Pratiquement, une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité, correspond à une absorbance de 0.08-0.1 mesurée à 625 nm (Rahal, 2005). Un inoculum est prélevé de cette suspension et immédiatement ensemencé sur des boites de Pétri contenant une couche de gélose Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage qui consiste à tremper un écouvillon stérile dans le tube contenant la suspension bactérienne précédemment préparée et à le frotter sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées. Le frottement de l'écouvillon sur la même boite de pétri doit être répété à trois reprises en tournant à chaque fois la boite d'un angle de 60°. Une fois l'ensemencement effectué, des disques de 6 mm de diamètre, préparés à partir de

papier filtre stériles sont imprégnés de 15 µl de l'extrait étudié (préparé dans de l'eau distillée à 0,4g/ml pour le thé et l'origan et à 70mg/ml pour le gingembre à 10%). Ces disques imprégnés sont en suite déposés sur la surface de la géloseensemencée suivie d'une incubation de 24 heures à 37°C. Chaque boîte de Pétri est réalisée en duplicata et comprend 4 disques dont trois sont imprégnés du même extrait et le quatrième sert de disque contrôle et se trouve imprégné d'eau distillée stérile. D'autres boîtes comportent des disques d'antibiotiques de références qui sont utilisés comme standards. Après le temps d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits étudiés sont mesurés et comparés à ceux obtenus avec les antibiotiques standards.

5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Cet essai a été réalisé afin de mieux définir l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne induite par les extraits étudiés. Cette technique est réalisée selon une méthode adaptée de celle rapportée par Ozturk et Ercisli, (2007) et Candan et ses collaborateurs (2003). Pratiquement, des dilutions successives d'un facteur de $\frac{1}{2}$ sont réalisées à partir de solutions mères des extraits à tester, préparés dans de l'eau distillée stérile aux mêmes concentrations que celles utilisées dans l'essai précédant. Par la suite, 100µl de chaque concentration obtenue sont déposés dans trois puits d'une microplaque stérile. Ce volume est alors complété, dans chacun de ces trois puits par 95 µl de milieu de culture stérile (Mueller Hinton liquide) et 5 µl de la suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland (souche sensible). Dans les puits témoins les extraits sont remplacés par de l'eau distillée stérile. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les puits sont examinés à l'œil nu. Un milieu trouble indique une croissance bactérienne, tandis qu'un milieu clair indique une inhibition. Afin de confirmer les inhibitions obtenues, un prélèvement de chaque puits présentant un aspect clair est transféré dans des boîtes de pétri contenant de la gélose Mueller Hinton, préalablement coulée sous forme de lignes parallèles de 5 cm de long. Ces boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 C°. Les valeurs des CMI sont déterminées comme étant les plus faibles concentrations des extraits testés qui induisent une absence visible de la croissance bactérienne (Ozturk et Ercisli, 2007).

Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique (M) des n valeurs obtenues \pm l'écartype (SD) [M \pm SD]. Le test de Student est utilisé pour évaluer la signification des effets des différentes substances testées. La différence est considérée statistiquement significatives au risque 5% (p<0,05).

Les IC₅₀ des extraits testés sont déterminées par la méthode du Logit à partir de la courbe de régression linéaire établie par la transformation linéaire dite de "Logit-Log probit" dont la formule de l'équation de régression est la suivante :

$$\mathbf{Logit = a (-Log vol) + b}$$

Dont :

$$\mathbf{Logit = Log \frac{C}{100 - C}}$$

C : pourcentage d'inhibition.

Log = logarithme décimal.

Vol : volume de l'extrait

Résultats

Résultats

1. Extraction

Le thé, le gingembre et l'origan sont le plus souvent consommés sous forme de boissons chaudes ou froides, préparées par décoction ou infusion. Ceci est la raison pour laquelle nous avons choisi ces deux méthodes pour obtenir les extraits de ces plantes afin d'étudier leurs activités anti-oxydantes et anti-microbiennes.

Après extraction, les liquides obtenus sont lyophilisés et le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{Poids du lyophilisat}}{\text{Poids initial de la plante}} \times 100$$

Les différents rendements obtenus sont présentés dans le tableau 3:

Tableau 3. Rendements (%) des extractions du thé, origan et gingembre.

Méthode d'extraction	Thé (5%)		Origan (5%)		Gingembre 5%		Gingembre (10%)	
	Infusion	Décoction	Infusion	Décoction	Infusion	Décoction	Infusion	Décoction
Rendement	21,4%	21,5%	21,8%	18,1%	5,3%	5,7%	4,8%	6,7%

Aucune différence n'est constatée entre l'infusion et la décoction du thé ou du gingembre à 5%. Par contre, l'infusion a donné le meilleur rendement avec l'origan et la décoction a montré un rendement plus élevé avec le gingembre à 10%.

2. Activité antioxydante

2.1. Effet scavenger en vers le radical DPPH

Le test de réduction du radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation des activités antioxydantes. Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule stable non radicalaire. La capacité de réduire ce radical est déterminée par la diminution de l'absorbance à 517nm induite par la substance étudiée.

Les différentes concentrations des extraits aqueux du thé, préparés par infusion ou décoction ont montré des effets scavengers très significatifs ($P < 0,01$) en vers le radical DPPH (**figure 9**). Ces effets restent dose dépendante jusqu'à une concentration égale à 10µg/ml. A

des doses supérieures à celle-ci, les activités antiradicalaires des deux extraits du thé restent stables et la courbe forme un plateau à la valeur de 88% d'inhibition (**figure 9**). A la même dose, l'acide ascorbique a donné une activité anti-oxydante supérieure à 95%.

La valeur de 50% d'activité antioxydante est produite par 3,25µg/ml de l'extrait de l'infusion du thé et par 3,03µg/ml de l'extrait de décoction. Par contre, l'acide ascorbique a exhibé le même pourcentage d'activité antioxydante mais à une dose de 2,60 µg/ml seulement.

Les extraits de l'origan obtenus par décoction ou infusion ont également présenté une importante activité anti-radicalaire en vers le DPPH ($p < 0,01$) (**figure 10**). Ces activités sont dose-dépendantes à des concentrations comprises entre 1µg/ml et 20µg/ml. A partir de 20µg/ml, les effets piègeurs des deux extraits de l'origan se stabilisent et atteignent un maximum d'environ 86% (**figure 10**).

La réduction de 50% des molécules du DPPH est obtenue à une concentration de 5µg/ml avec les deux extraits de l'origan. Ces concentrations sont supérieures à celles du thé d'un facteur de 1,5 pour l'infusion et de 1,6 pour la décoction. Alors que l'acide ascorbique a donné le même pourcentage d'activité mais avec une concentration pratiquement deux fois plus faible que celle des extraits de l'origan.

La réduction du DPPH augmente aussi très significativement ($p < 0,01$) en présence de l'extrait du gingembre obtenu par décoction (**figure 11**), tandis que pour l'extrait de l'infusion, l'effet ne devient statistiquement significatif qu'à partir de 62µg/ml ($p < 0,01$). Ces effets antiradicalaires sont positivement corrélés avec les concentrations des deux extraits. A 187µg/ml, l'extrait obtenu par infusion engendre une réduction d'environ 76%. Alors qu'à la même concentration, l'extrait obtenu par décoction a induit une réduction d'environ 92%.

La valeur de l'IC₅₀ est de 32µg/ml dans le cas de la décoction, alors que dans le cas de l'infusion, cette concentration est égale 75µg/ml soit pratiquement le double. Ces valeurs sont supérieures à celle obtenue avec l'acide ascorbique d'un facteur de 29 dans le cas de l'infusion et de 12 dans le cas de la décoction.

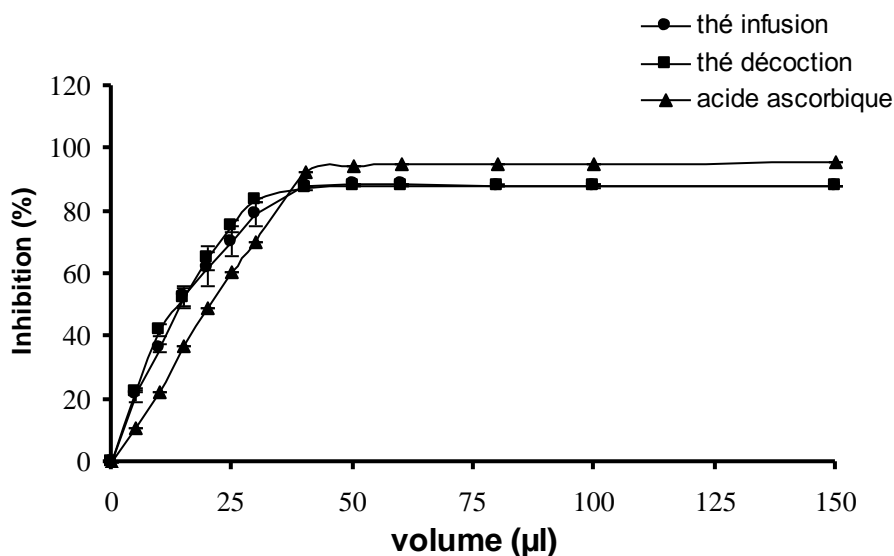


Figure 9. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé et de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) évaluée par le test de réduction du DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcent de réduction du radical DPPH par rapport au contrôle considéré comme le 0% de réduction. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Thé ou acide ascorbique vs contrôle; P est toujours $<0,01$ (test t. Student).

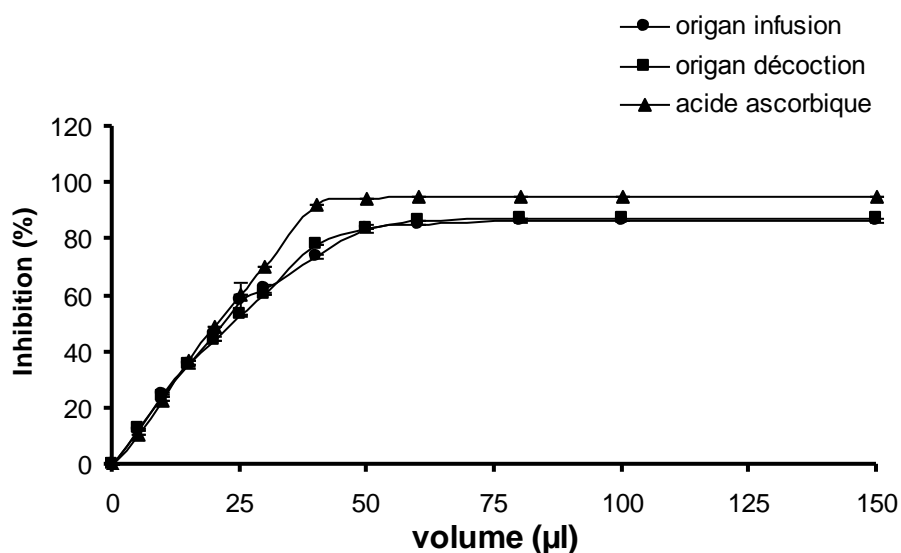


Figure 10. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux (infusion et décoction) de l'origan et de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) évaluée par le test de réduction du DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcent de réduction du radical DPPH par rapport au contrôle considéré comme le 0% de réduction. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Origan ou acide ascorbique vs contrôle; P est toujours $<0,01$ (test t. Student).

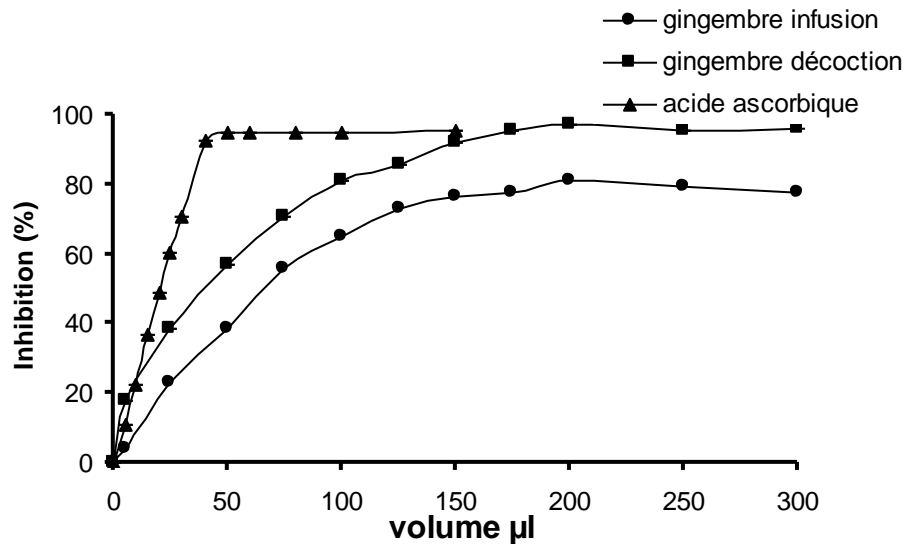


Figure 11. Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux (infusion et décoction) du gingembre et de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) évaluée par le test de réduction du DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcent de réduction du radical DPPH par rapport au contrôle considéré comme le 0% de réduction. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Gingembre ou acide ascorbique vs contrôle; P est toujours $<0,01$ (test t. Student).

2.2 Test du β -carotène

La capacité antioxydante des extraits étudiés est aussi évaluée par le système β -carotène/acide linoléique. Les radicaux libres provenant de l'oxydation de l'acide linoléique attaquent le β -carotène et induisent sa décoloration. La présence de substances pourvues d'une activité antioxydante peut réduire cette décoloration par la neutralisation des radicaux libres de l'acide linoléique et d'autres radicaux formés dans le milieu (Sun et Hu, 2005).

Les extraits aqueux (infusion et décoction) du thé, de l'origan et du gingembre ont montré une activité antioxydante très importante. En effet, en présence de ces extraits (130 μ g/ml), les absorbances de la solution du β -carotène restent stables durant tout le temps d'incubation (**figure 12, 13, 14**). Après 30 minutes d'incubation par exemple, l'absorbance de la solution du β -carotène diminue d'environ 60% en l'absence de toute substance (contrôle), tandis qu'elle diminue d'environ de 3 % ($p<0,01$) seulement en présence des deux extraits du thé (**figure 12**). Cette absorbance reste aussi constante après 30 minutes en présence de l'extrait de l'origan préparé par infusion mais diminue de 5% ($p<0,01$) seulement avec l'extrait de l'origan préparé par décoction (**figure 13**).

En présence de l'extrait du gingembre préparé par décoction, l'absorbance de la solution du β -carotène diminue de 12% ($p<0,01$) après 30 minutes également, alors qu'avec l'extrait obtenu par infusion, la diminution de l'absorbance est beaucoup plus importante, et est de 25% ($p<0,01$) (**figure 14**).

Après deux heures d'incubation, l'absorbance du contrôle diminue de près de 95%, par contre, en présence de l'extrait du thé obtenu par décoction, l'absorbance du β -carotène est réduite de 7% ($p < 0,01$) seulement et de 12% ($p < 0,01$) avec l'extrait préparé par infusion. Cette diminution est respectivement de 8% et de 17% ($p < 0,01$) avec l'extrait de l'origan préparé par décoction et infusion. Alors qu'avec les deux extraits du gingembre, l'absorbance du β -carotène décroît de plus de 30% ($p < 0,01$). L'incubation avec le BHT, utilisé comme antioxydant de référence à la même concentration que les extraits étudiés (130 μ g/ml), a donné des absorbances qui sont restées pratiquement constantes durant tout le temps d'incubation.

De ce fait, après deux heures, les extraits du thé obtenus par décoction et infusion ont induit une inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique de 88% et de 93% respectivement ($p < 0,01$). Les deux extraits de l'origan ont également engendré des inhibitions semblables (83% et 93% ($p < 0,01$) pour l'infusion et la décoction respectivement. Ainsi, les extraits du thé et de l'origan préparés par décoction ont produits un effet pratiquement identique à celui induit par le BHT qui a donné, après deux heures d'incubation une inhibition égale à 96% ($p < 0,01$). Par contre, les deux extraits du gingembre sont moins efficaces et l'inhibition induite n'était que de 68% ($p < 0,01$) avec les deux extraits.

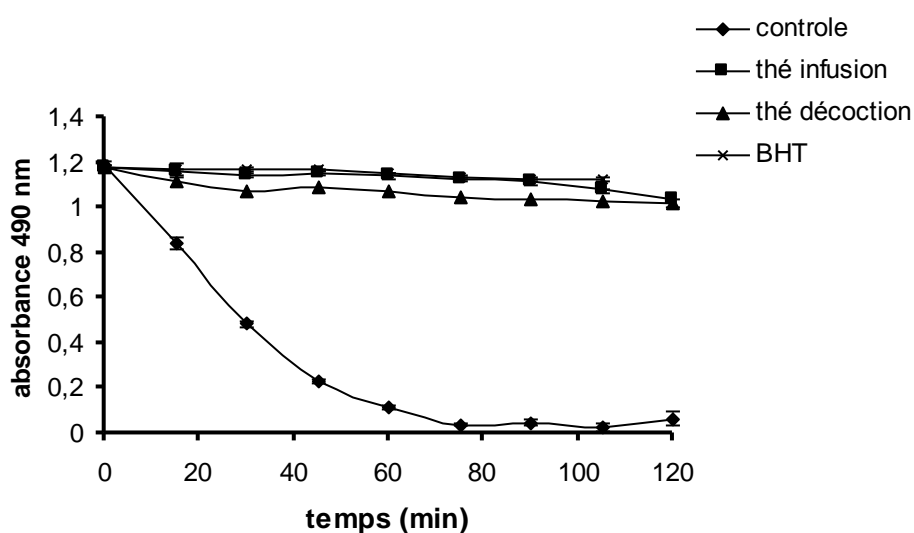


Figure 12. Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé et du BHT (antioxydant de référence). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Thé ou BHT vs contrôle; P est toujours $< 0,01$ (test t. Student)

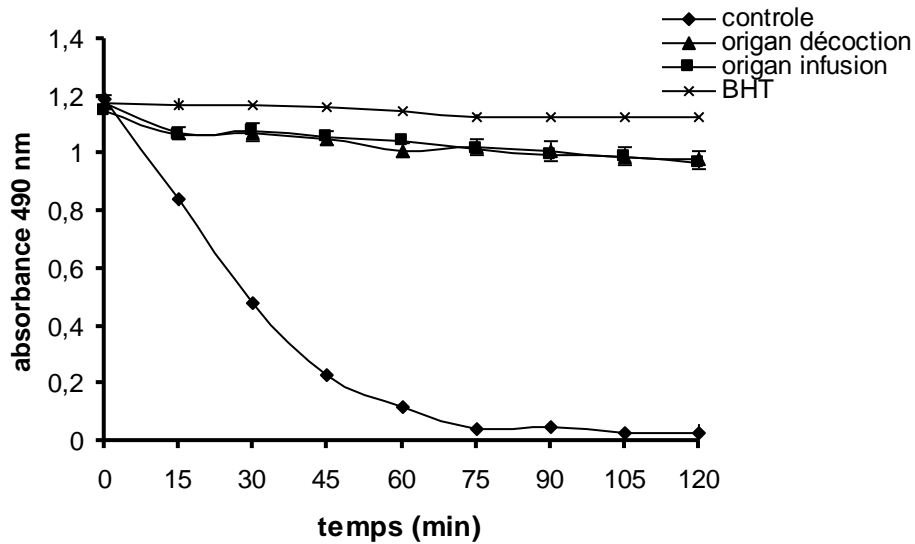


Figure 13. Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) de l'origan et du BHT (antioxydant de référence). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Origan vs contrôle; $p < 0,05$ après 15 min, à partir de 30 min: $p < 0,01$. BHT vs contrôle; P toujours $< 0,01$ (test t. Student).

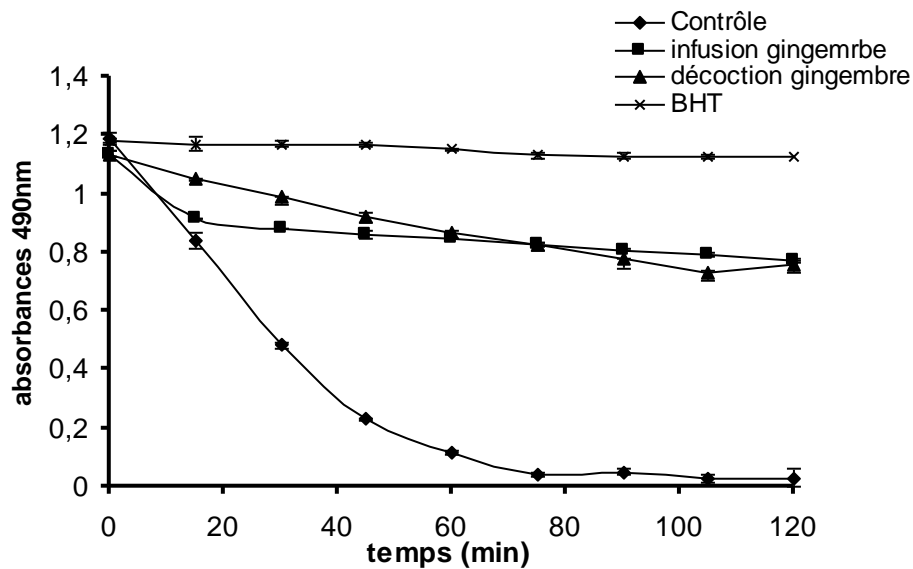


Figure 14. Changement de l'absorbance du β -carotène à 490nm en présence des extraits aqueux (infusion et décoction) du gingembre et du BHT (antioxydant de référence). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Gingembre (infusion) vs Contrôle; $p < 0,05$ à $t=30$ min, à partir de $t=30$ min : $p < 0,01$; gingembre (décoction) ou BHT vs contrôle; p toujours $< 0,01$ (test t. Student).

2.3 Test de chélation des métaux

La capacité des extraits aqueux du thé, de l'origan et du gingembre à fixer les ions Fe^{2+} est également estimée dans cette étude. La ferrozine peut former des complexes avec les ions Fe^{2+} produisant alors une coloration rouge. La présence d'agents chélateurs dans le milieu inhibe la formation de ces complexes, et induit une diminution de l'intensité de la couleur.

Les différentes concentrations des deux extraits aqueux du thé ont exhibé des effets chélateurs envers les ions Fe^{2+} statistiquement très significatifs ($p < 0,01$) et qui sont positivement corrélés avec la dose (**figure 15**). A une concentration de 4,5mg/ml (concentration maximale utilisée), les deux extraits du thé ont montré un maximum d'activité de chélation d'environ 75% et 72% pour l'infusion et la décoction respectivement. La détermination des IC_{50} a donné des valeurs de 1,73mg/ml pour l'infusion et de 1,55mg/ml pour la décoction. L'EDTA, utilisé comme chélateur de référence a produit un effet chélateur très important et supérieur à celui du thé. En effet, il a montré une activité maximale égale à 97% à une concentration égale à 200 $\mu\text{g/ml}$ seulement et avec une IC_{50} de 51 $\mu\text{g/ml}$ soit une concentration 20 fois plus faible que celles des deux extraits du thé.

Les deux extraits de l'origan ont également montré une activité de chélation très importante (**figure 16**). Cette activité est hautement significative ($p < 0,01$) avec toutes les doses testées de l'extrait obtenu par infusion, alors que l'extrait obtenu par décoction présente une activité qui devient hautement significative ($p < 0,01$) à partir de 750 $\mu\text{g/ml}$. A Une concentration de 1mg/ml, l'activité de chélation des deux extraits de l'origan atteint 45% dans le cas de l'infusion et 32% dans le cas de la décoction. Cette activité augmente ensuite d'une manière faiblement corrélée avec la dose pour n'atteindre que 69% pour l'infusion et 65% pour la décoction à une concentration de 4,5mg/ml (**figure 16**). Les IC_{50} obtenues sont de 2,5mg/ml et de 2,8mg/ml dans le cas de l'infusion et de la décoction respectivement.

Les deux extraits du gingembre ont montré un plus faible effet chélateur envers les ions Fe^{2+} (**figure 17**). Pour l'extrait de la décoction, cet effet est très significatif avec toutes les concentrations utilisées ($p < 0,01$). Mais avec l'extrait de l'infusion, l'effet chélateur ne devient statistiquement significatif qu'à partir de 1,5mg/ml ($p < 0,05$), à partir de 2,5mg/ml l'activité de l'extrait devient hautement significative ($p < 0,01$). A la concentration maximale utilisée (4,5mg/ml), l'activité de chélation atteint 31% dans le cas de l'infusion, et 33% dans le cas de la décoction (**figure 17**).

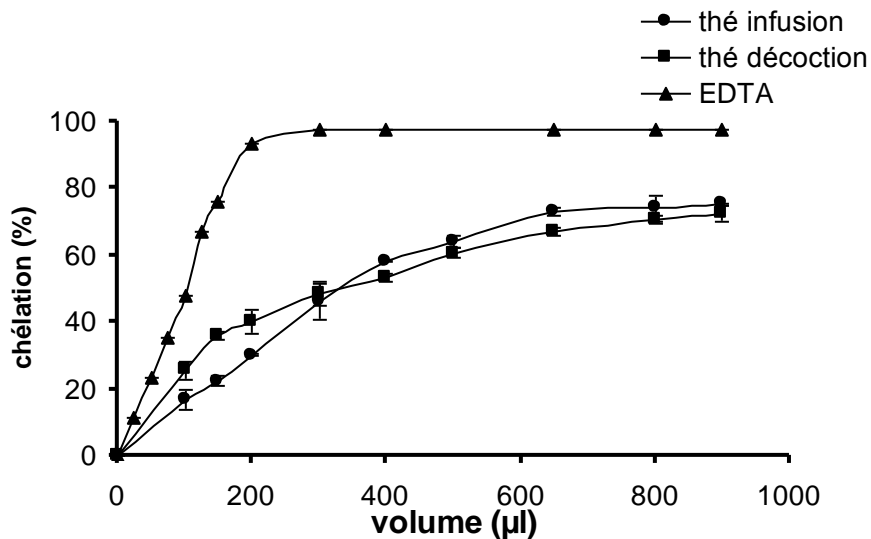


Figure 15. Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé et de l'EDTA (chélateur de référence) envers les ions Fe^{2+} . Les résultats sont exprimés en pourcent de chélation des ions Fe^{2+} par rapport au contrôle considéré comme le 0% de chélation. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Thé ou EDTA vs contrôle; P toujours <0,01 (test t. Student).

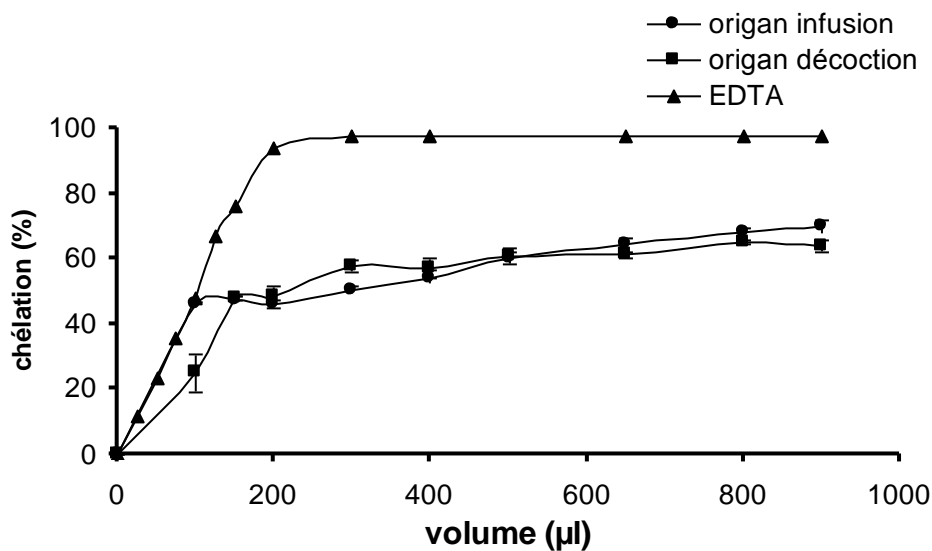


Figure 16. Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) de l'origan et de l'EDTA (chélateur de référence) envers les ions Fe^{2+} . Les résultats sont exprimés en pourcent de chélation des ions Fe^{2+} par rapport au contrôle considéré comme le 0% de chélation. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3). Origan (infusion) ou EDTA vs contrôle P toujours <0,01; origan (décoction) à 100µl : p<0,05 à partir de 150µl p<0,01 (test t. Student).

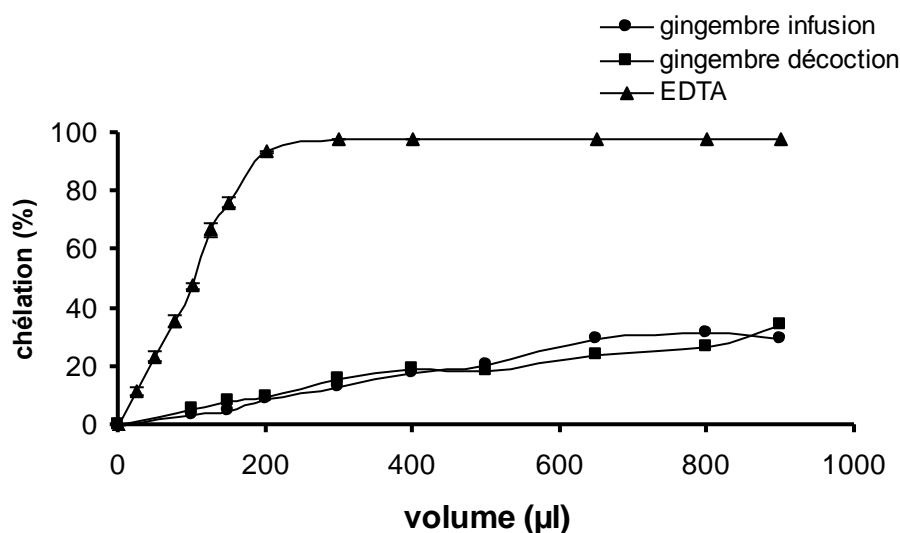


Figure 17. Effet chélateur des extraits aqueux (infusion et décoction) du gingembre et de l'EDTA (chélateur de référence) envers les ions Fe²⁺. Les résultats sont exprimés en pourcent de chélation des ions Fe²⁺ par rapport au contrôle considéré comme le 0% de chélation. Chaque point représente la moyenne ± SD (n=3). Gingembre (décoction) ou EDTA vs contrôle ; P toujours <0,01 (test t de student). Gingembre (infusion), différence non significative jusqu'à 200µl, entre 300 et 400µl p<0,05, à partir de 500µl P<0,01 (test t. Student).

3. L'effet antibactérien des extraits

L'effet antimicrobien des extraits aqueux du thé, de l'origan et du gingembre est évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par les extraits aqueux du thé (3mg/disque), de l'origan (3mg/disque) et du gingembre (1mg/disque) préparés par infusion (Inf) ou décoction (Déc) et les antibiotiques (PB, DOT et CMP)

	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)								
	Thé		Origan		Gingembre		Antibiotiques		
	Inf	Déc	Inf	Déc	Inf	Déc	PB	DOT	CMP
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	6	6	8,5	8	6	6	15	21	26
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6	25	6	6	6	6	9	6	6
<i>S. aureus</i> ATCC 2592 3	6	12	6	6	6	6	16	12	20
<i>salmonella typhi</i>	6	10	6	6	6	6	15	6	6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	30	30	22	29	6	6	14	6	6

Les deux extraits du gingembre obtenus par infusion ou décoction n'ont montré aucun effet sur aucune des 5 souches testées (**tableau 4**). Les deux extraits de l'origan ont montré une activité inhibitrice envers uniquement la croissance d'*E. Coli* et d'*E. agglomerans* (**tableau 4**). En effet, ces deux extraits ont induit respectivement des zones d'inhibition d'un diamètre d'environ 8mm seulement pour l'infusion et la décoction avec *E. coli* (**figure18**). Ces effets sont bien plus faibles que ceux obtenus avec les antibiotiques standards utilisés, à savoir la polymyxine B (PB), la Doxycycline (DOT) et le chloramphénicol (CMP) qui ont donné des diamètres d'inhibition de 15, 21 et 26mm respectivement avec *E. coli* (**figure 18**).

La même concentration des deux extraits de l'origan a produit une plus forte activité envers *E. agglomerans* (**figure 19**) avec des zones d'inhibition de 29 et de 22mm de diamètre pour la décoction et l'infusion respectivement. Parmi les 3 antibiotiques utilisés, seul la PB a donné un effet significatif, et avec un diamètre d'inhibition de 14 mm seulement. Cet effet reste bien plus faible que celui obtenu avec les deux extraits de l'origan (**figure 19**).

L'extrait du thé préparé par décoction, a également induit des effets inhibiteurs importants envers la croissance de toutes les souches testées sauf *E. coli* (**tableau 4**). Cet extrait a en effet, produit des zones d'inhibition de 25mm, 12mm, 10mm et 30mm de diamètre avec respectivement *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhi* et *E. agglomerans* (**figure20**). Cependant, seule *E. agglomerans* était sensible à l'action de l'extrait préparé par infusion qui a produit une zone d'inhibition de 30mm de diamètre (**figure 20**). De ce fait, le thé a produit des effets inhibiteurs envers *P. aeruginosa* et *E. agglomerans* plus importants que ceux induits par la polymyxine B (**Tableau 4**).

Les deux extraits du thé, de l'origan et du gingembre obtenus par décoction ou infusion n'ont montré aucun effet inhibiteur envers la croissance de *Bacillus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*.

Du fait que seule *E. agglomerans* a montré une importante sensibilité aux deux extraits du thé et de l'origan, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est réalisée uniquement avec cette souche. Les résultats obtenus montrent que l'extrait du thé préparé par décoction a une CMI égale à 1,56mg/ml, alors qu'avec l'infusion la CMI est de 3,12mg/ml. Par contre, les deux extraits de l'origan ont donné une CMI de 12,5mg/ml, soit une valeur 12 et 4 fois plus forte que celle déterminée avec la décoction et l'infusion du thé respectivement.

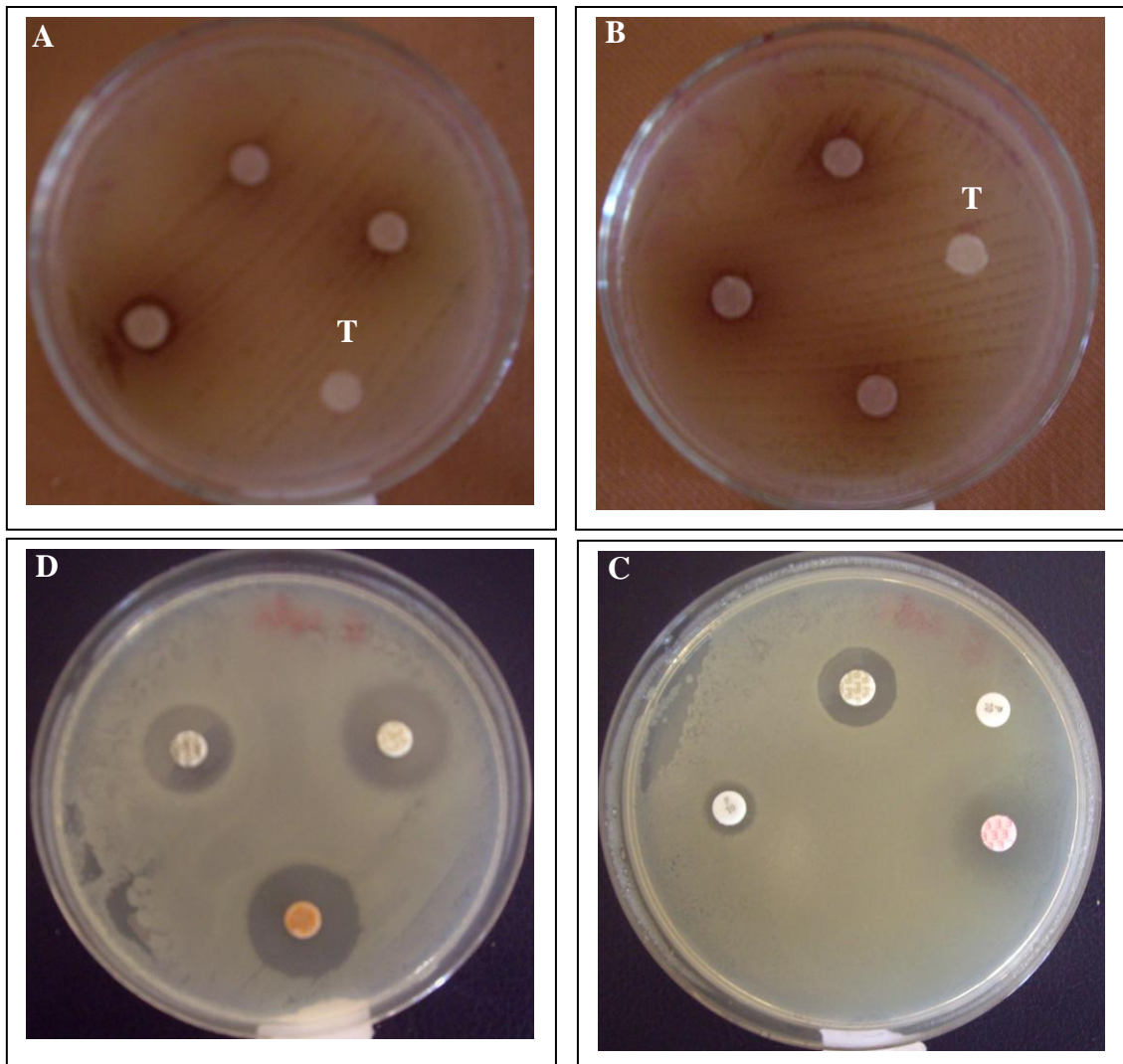


Figure 18. Photographies des zones d'inhibition de la croissance d'*E. coli* induites par l'extrait d'infusion (A) de décoction (B) de l'origan et les antibiotiques; polymyxine B (C) et doxycycline (D).

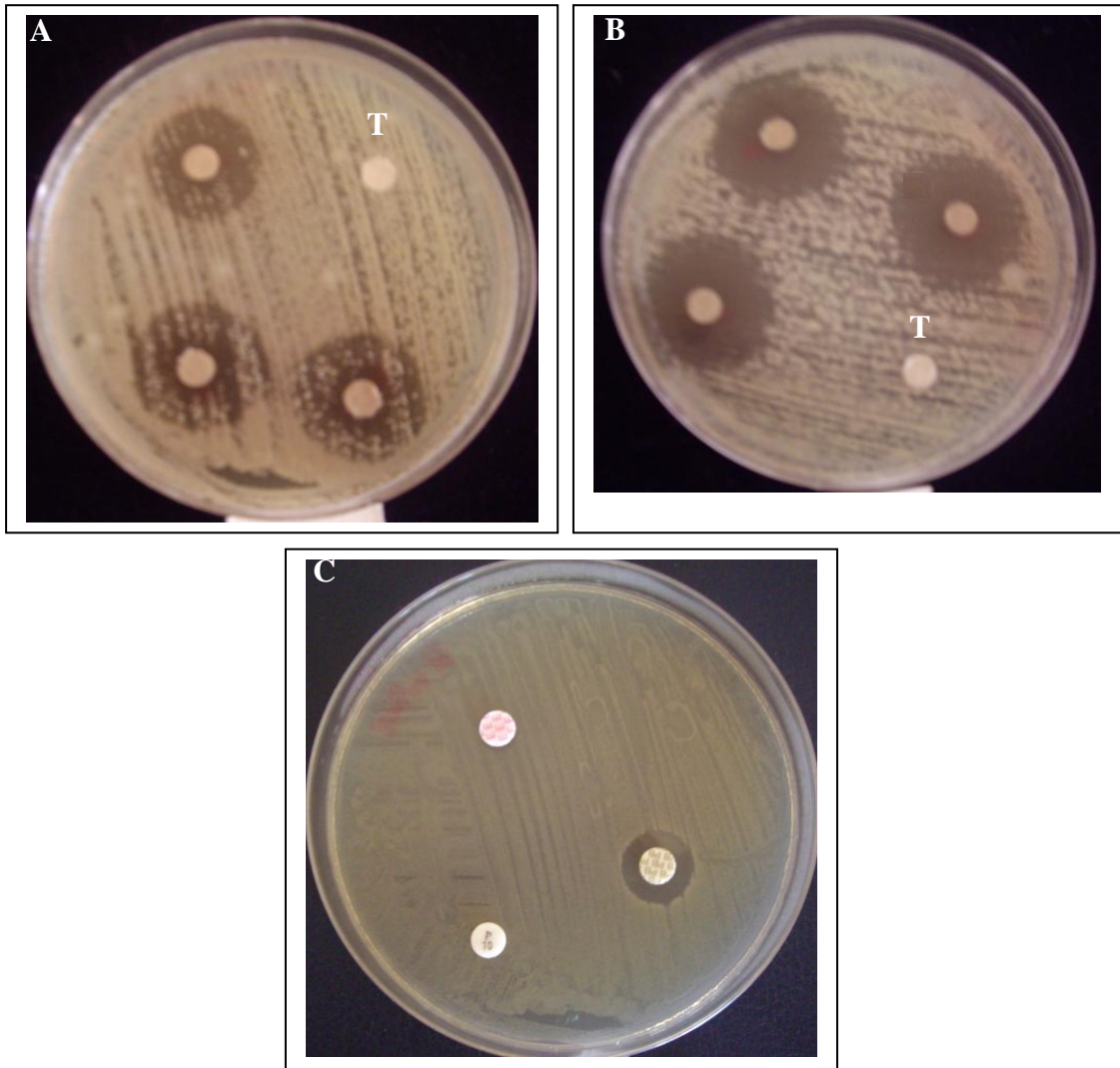


Figure 19. Photographies des zones d'inhibition de la croissance d'*E. agglomerans* de l'extrait d'infusion (A), de décoction (B) d'origan et de la polymyxine B (C).

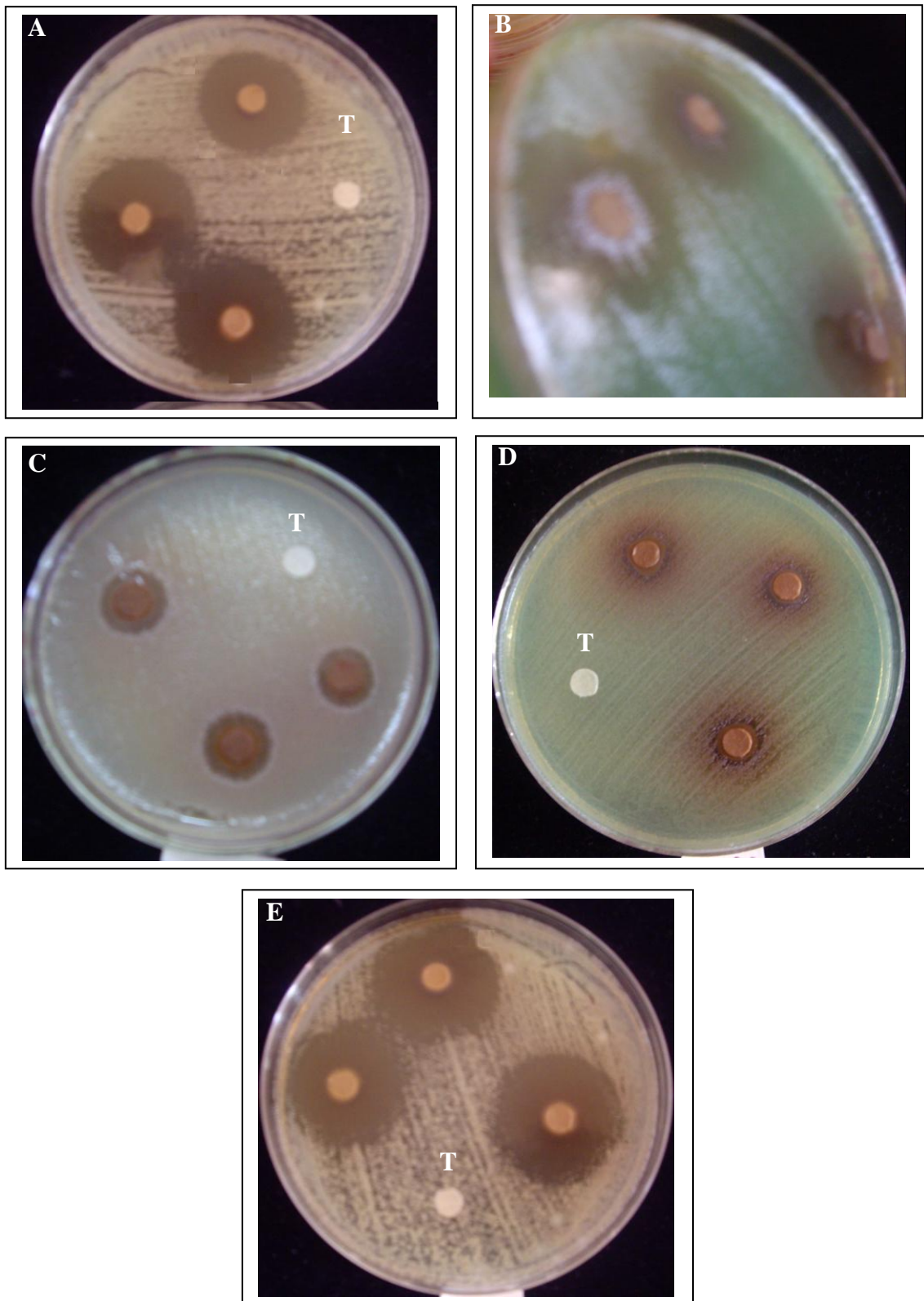


Figure 20. Photographie des zones d'inhibition de la croissance de *E. agglomerans* (A), de *P. aeruginosa* (B), de *S. aureus* (C), de *S. typhi* (D) induites par l'extrait du thé obtenu par décoction et d'*E. agglomerans* produits par l'extrait du thé obtenu par infusion (E).

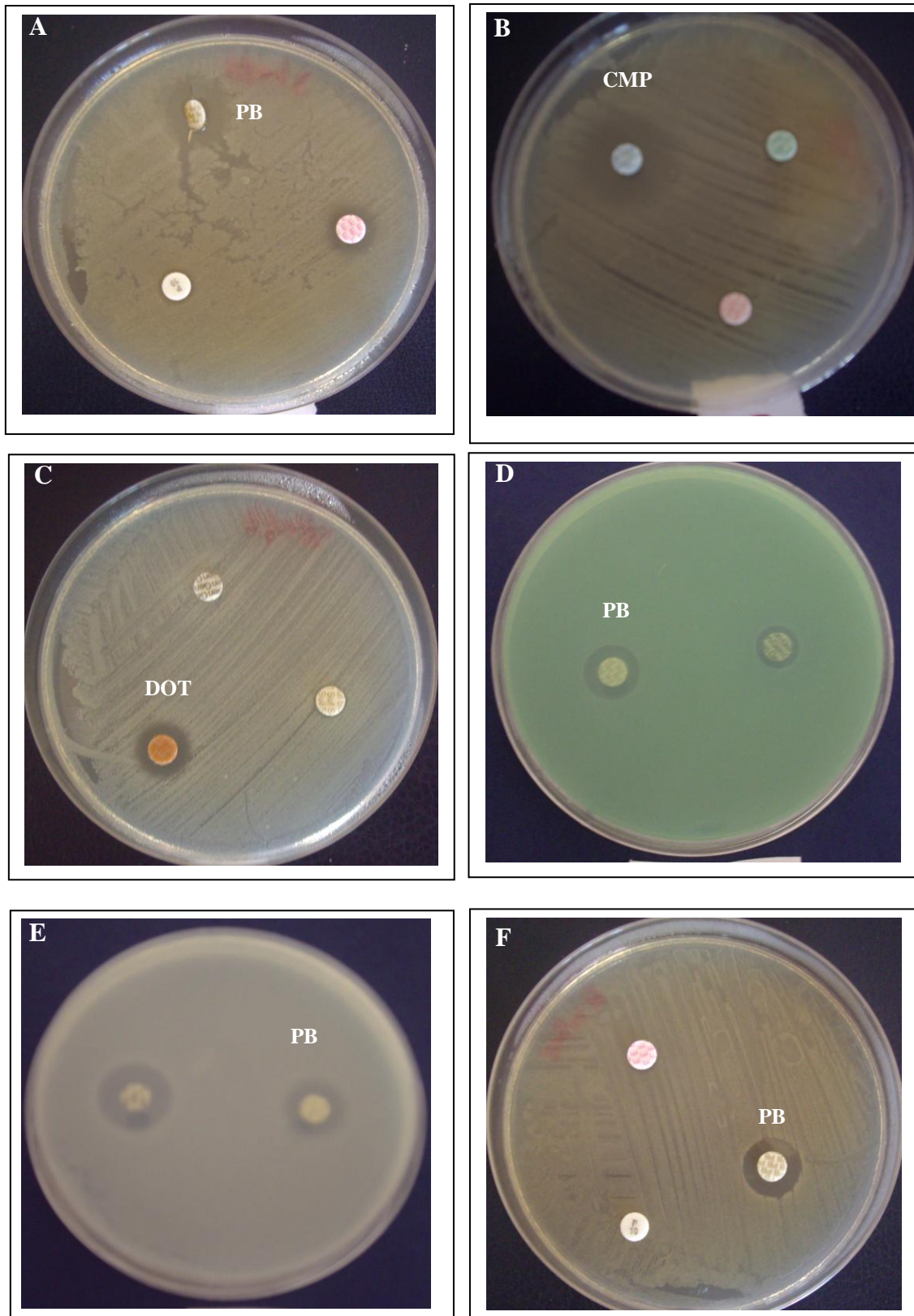


Figure 21. Photographies des zones d'inhibition induites par les antibiotiques (CMP, DOT ou PB) envers *S. aureus* (A, B, C), *P. aeruginosa* (D), *S. typhi* (E) et *E. agglomerans* (F).

Discussion

et

conclusion

Discussion

1. Extraction

L'extraction par les solvants organiques est souvent la méthode la plus utilisée pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, dans la présente étude, nous avons choisi d'étudier les extraits aqueux du thé, de l'origan et du gingembre du fait que ces plantes sont le plus souvent utilisées pour la préparation de boissons.

Le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su et al. 2005). Dans cette étude, l'extraction aqueuse du thé et de l'origan a donné un rendement plus élevé que celui obtenu avec le gingembre (tableau 3). Cette différence est probablement due à la nature et à la partie de la plante utilisée, car les conditions de l'extraction (solvant, température et temps) sont les mêmes pour les trois plantes. En effet, la partie du gingembre utilisée est les rhizomes, qui constituent des organes très rigides, ce qui a rendu probablement l'extraction de ses composants hydrosolubles plus difficile comparée à celle des feuilles du thé et de l'origan. L'infusion et la décoction du thé à 5% donnent le même rendement (tableau 1), ce qui semble indiquer que la température (décoction) n'a pas d'effet sur le rendement de l'extraction du thé. Le contraire a été rapporté par Su et ses collaborateurs (2006) selon lesquels, le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. D'autres auteurs ont également montré que le taux de rendement de chaque extraction décroît significativement avec l'âge de la feuille du thé (Farhoosh et al. 2007). Cela a été attribué aux changements physiologiques de la feuille et/ou au transport des composés chimiques dans la plante durant la période de croissance. L'infusion de l'origan a donné un rendement qui est un peu plus élevé que celui obtenu avec la décoction (tableau 1). L'infusion et la décoction du gingembre à 5% ont donné le même rendement, cependant, celui obtenu avec la décoction à 10% est nettement supérieur à celui obtenu avec l'infusion.

2. Activité antioxydante

Le test de la réduction du radical stable DPPH est un modèle pratique et largement utilisé pour évaluer l'activité scavenger et antioxydante en général des substances étudiées (Duan et al., 2006). Ce test est basé sur la réduction de la solution alcoolique du DPPH en présence d'antioxydants donateurs d'atomes d'hydrogène, aboutissant à la formation de la forme non radicalaire DPPH-H. L'activité réductrice des substances étudiées est alors

déterminée par leur capacité à diminuer l'absorbance de la solution du DPPH à 517nm (Que et al., 2006).

Le test du β -carotène/ acide linoléique est un autre modèle qui mesure indirectement la capacité des antioxydants à inhiber la peroxydation lipidique. Le principe de ce test est basé sur la propriété antioxydante des caroténoïdes qui, après neutralisation des radicaux libres se détériorent et perdent leur coloration ce qui va se traduire par une diminution de l'absorbance à 490nm (Barros et al., 2007).

Les métaux de transition qui jouent un rôle important dans le processus d'oxydation sont capables de générer des radicaux $\cdot\text{OH}$ à partir des peroxydes par la réaction de Fenton. Dans le test de chélation des métaux, les antioxydants ayant un pouvoir chélateur inhibent la formation du complexe ferrozine/fer qui a une absorbance caractéristique à 562nm. La diminution de cette absorbance détermine l'activité chélatrice des substances étudiées (Wu et al., 2006).

2.1. Activité antioxydante du thé

Les deux extraits aqueux du thé obtenus par infusion et décoction, ont montré des effets scavengers très importants envers le radical DPPH (figure 9). De tels résultats témoignent de la présence de substances douées d'activité scavengers dans les deux extraits étudiés. L'effet des antioxydants sur ce radical serait dû à leur capacité à céder des atomes d'hydrogène (Oktay et al., 2003 ; Que et al., 2006).

Les résultats obtenus montrent que l'effet des extraits du thé préparés par décoction sont similaires à ceux induits par les extraits obtenus par infusion ce qui indique que les composés responsables de cette activité scavenger envers le radical DPPH sont extraits aussi bien par infusion que par décoction.

Des études antérieures ont montré des résultats semblables pour les extraits aqueux du thé préparés par infusion (Chan et al., 2007 ; Su et al., 2006). Selon certains auteurs, ces effets anti-radicalaires du thé seraient dus à la présence de polyphénols, connus pour leurs activités antioxydantes (Almaraz-Abarka et al., 2006). En effet, il a été montré qu'il existe une grande corrélation entre la concentration en polyphénols et l'activité antioxydante du thé (Turkmen et al., 2006). Les catéchines sont les principaux composés phénoliques présents dans le thé et ils seraient pourvus d'une grande activité réductrice envers le DPPH (Zhu et al., 2001 ; Chan et al., 2007 ; Manian et al., 2008). L'étude du mécanisme par lequel les catéchines piègent le radical DPPH a montré que les deux cycles A et B (figure 22) des catéchines sont les principaux sites de la réaction antioxydante (Zhu et al., 2001 ; Sang et al., 2002). Cette

activité est en relation avec le nombre et l'emplacement des groupements hydroxyles dans ces molécules (Frei et Higdon, 2003).

Certaines études ont également montré que d'autres composés phénoliques peuvent être en relation avec l'activité antioxydante observée. En effet, il a été rapporté que le traitement thermique du thé durant la préparation des extraits conduit à l'oxydation progressive des polyphénols, un processus qui conduit à la formation de macromolécules douées d'un grand pouvoir anti-radicalaire (Mansoco, 1998 ; Su et al., 2006).

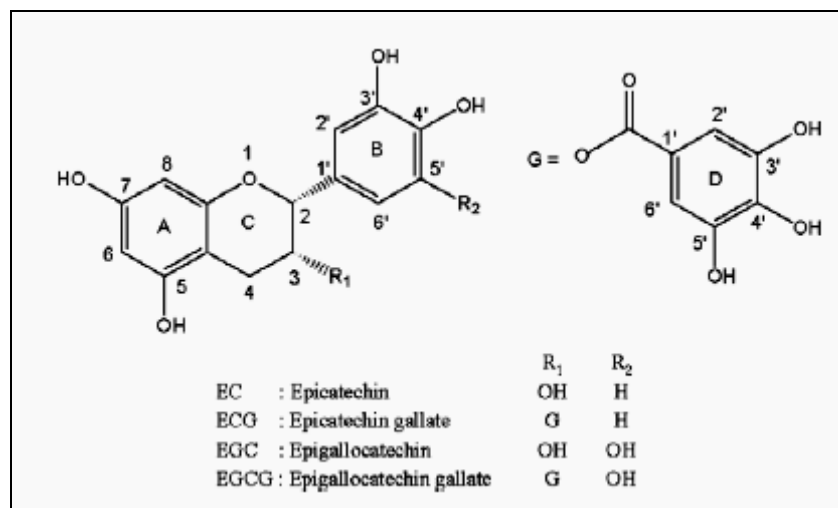


Figure 22. Structure chimique des principaux polyphénols du thé

En présence des extraits aqueux (infusion et décoction) du thé, l'absorbance du β -carotène est restée stable durant toute la durée d'incubation. Ceci indique qu'il y a présence de substances dans l'extrait du thé qui auraient inhibé la peroxydation lipidique et/ou neutralisé les radicaux générés par l'oxydation de l'acide linoléique ce qui prévient l'oxydation du β -carotène. Du fait que le thé est très riche en composés phénoliques et que ces derniers sont dotés d'une grande activité antioxydante, l'effet du thé obtenu avec ce test serait probablement aussi dû à ces molécules, en particulier les catéchines. En effet, Laporta et ses collaborateurs (2007) ont rapporté que dans les émulsions huileuses, les catéchines ont un coefficient de partition très élevé et donc une grande affinité aux constituants membranaires des cellules. L'activité antioxydante de ces substances est liée à leur capacité à traverser et à modifier la fluidité de la bicouche lipidique (Caturla et al., 2003), au nombre des groupements OH et au degré de polymérisation de ces substances. Selon d'autres études (Hashimoto et al., 2003), l'effet des extraits aqueux du thé serait également due à la présence des tannins. Ces derniers ont montré en effet, une grande activité inhibitrice, qui est supérieure même à celle obtenue par l'antioxydant de référence BHA (butylated hydroxy anisol). Il a été également rapporté que les composés phénoliques extraits à partir du thé vert (42 composés différents)

ont, pour la plupart produit une activité inhibitrice très puissante supérieure même à celle du tocophérol. L'étude de la relation structure/activité a montré aussi que l'action antioxydante augmente avec la condensation de deux molécules flavan 3-ols (Hashimoto et al., 2003). D'autres auteurs ont également indiqué que certaines glycoprotéines du thé, telle que la TPC (tea polysaccharide conjugate), pourrait être responsable de cet effet antioxydant (Chen et al., 2005).

Les extraits aqueux du thé préparés par infusion ou décoction ont montré un effet chélateur très puissant envers les ions Fe^{2+} . Ce qui signifie que les principes actifs entrent en compétition avec la ferrozine et forment de ce fait des complexes avec les ions Fe^{2+} . Peu d'études ont été réalisées sur l'effet chélateur de l'extrait aqueux du thé. Chan et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'infusion du thé vert a donné une activité chélatrice d'environ 42% à une concentration de 3,3mg/ml. Cette activité est inférieure à celle obtenue dans la présente étude, qui atteint les 65% à la même concentration. L'âge et l'origine des feuilles pourraient influencer cette activité chélatrice. En effet, il a été rapporté que les feuilles jeunes du thé exhibent un effet chélateur plus important que celle des feuilles âgées, avec des inhibitions de 68% et 48% respectivement à une concentration de 7mg/ml (Chan et al., 2007). L'effet chélateur des extraits du thé a été attribué aux polyphénols et à la TPC présents dans le thé (Frei et Higdon, 2003 ; Chan et al., 2005). Les agents chélateurs sont des antioxydants secondaires qui forment des liaisons avec les ions métalliques et réduisent alors leur potentiel redox et stabilisent donc leur forme oxydée (Oktey et al., 2003).

2.2. Activité antioxydante de l'origan

Les deux extraits aqueux de l'origan ont induit une très importante activité scavenger envers le radical DPPH qui atteint environ 86%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Chun et ses collaborateurs (2005) qui ont rapporté une réduction de plus de 80% du radical DPPH par l'extrait aqueux de l'origan commercial. Cette réduction est en relation avec la présence de substances hydrosolubles capables de céder un atome d'hydrogène au radical DPPH pour donner la forme non radicalaire. Il a été rapporté que la famille des lamiacées, à laquelle appartient l'origan, est très riche en polyphénols (Tepe et al., 2005). Il est par ailleurs connu que les polyphénols sont doués de propriétés scavenger envers différents types de radicaux, ce qui leur confère une grande capacité antioxydante. Plusieurs études ont rapporté que l'origan est riche en différents composés phénoliques (Capecka, 2005 ; Skerget et al., 2005 ; Kouri et al., 2007), comme l'acide rosmarénique, l'acide caféique et quelques flavonoides (Kouri et al., 2007). D'ailleurs, l'activité anti-radicalaire des extraits de l'origan envers le DPPH a été attribuée plus précisément aux flavonoides et aux acides phénoliques

(acide rosmarénique et l'acide caféique) (Capecka, 2005). Il a été rapporté aussi que l'augmentation de la température au cours de l'extraction n'implique pas nécessairement la dégradation ou l'oxydation des composés bioactifs (Meizoso et al., 2006), cela explique peut être les effet similaires des extraits de l'origan préparés par infusion ou par décoction.

Les résultats apportés par cette étude montrent que les deux extraits aqueux de l'origan induisent une forte inhibition de l'oxydation du β -carotène. Cet effet obtenu est bien meilleur que celui produit par l'extrait méthanolique de l'origan. En effet, utilisé à une concentration supérieure plus de 10 fois à celle utilisée dans cette étude, l'extrait méthanolique n'a montré qu'un très faible effet inhibiteur envers l'oxydation de l'acide linoléique (24%) (Sahin et al., 2004). Les polyphénols présents dans les extraits de l'origan seraient encore à l'origine de ces effets antioxydants. En effet, ces polyphénols peuvent inhiber la réaction de la peroxydation lipidique en chaîne et de neutraliser d'autres radicaux (Chun et al., 2005). Certaines études ont montré que les extraits de l'origan sont capables de protéger l'acide linoléique de l'oxydation et les flavonoides y seraient à l'origine (Kouri et al., 2007). Ces flavonoides possèdent des groupements OH libres qui peuvent céder des atomes hydrogènes pour bloquer la réaction radicalaire au cours de l'oxydation de l'huile (Skerget et al., 2005). D'autres études ont rapporté que l'activité antioxydante des extraits aqueux de l'origan est due à la présence d'un taux élevé de composés phénoliques lipophiles (Chun et al., 2005). Il apparaît donc que la fraction lipidique des extraits de l'origan semble jouer aussi un rôle dans l'inhibition de la peroxydation lipidique.

La présente étude constitue la première à investiguer l'effet chélateur des extraits aqueux de l'origan. Les résultats obtenus montrent que les deux extraits aqueux de l'origan inhibent fortement la formation du complexe ferrozine/fer, indiquant que les extraits aqueux de l'origan comportent des composés chélateur capables de fixer efficacement les ions Fe^{2+} . Généralement, l'activité antioxydante des espèces de la famille des lamiacées, est attribuée particulièrement aux acides phénoliques et aux flavonoides présents dans ces plantes (Capecka et al., 2005).

2.3. Activité antioxydante du gingembre

Les deux extraits aqueux du gingembre induisent une forte réduction du radical DPPH. Cependant, l'effet scavenger exercé par la décoction (92%) était plus important que celui produit par l'extrait préparé par infusion (72%). Cette différence est très probablement due à la méthode d'extraction. En effet, il est possible que la décoction ait extrait un taux plus élevé ou plus de molécules réductrices que l'infusion. D'ailleurs, la décoction est la méthode la plus conseillée pour la préparation des extraits à partir des organes rigides de plantes tels que les

rhizomes (Grunwald et Janicke, 2006). Les extraits aqueux du gingembre ont montré une grande activité réductrice envers le radical DPPH, mais avec des concentrations relativement élevées et les IC₅₀ obtenues sont beaucoup plus importante que celle de l'acide ascorbique (29 et 12 fois plus pour l'infusion et la décoction respectivement). Le solvant utilisé lors de l'extraction joue un rôle important dans la nature et la teneur des composés de l'extrait. L'extrait du gingembre obtenu avec le CO₂ par exemple, a montré une forte activité scavenger envers le radical DPPH à seulement 20µg/ml (Stoilva et al., 2007). Cette activité a été attribuée à la présence des polyphénols (871mg/g extrait sec). Bandyopadhyaya et ses collaborateurs (2006) a rapporté que le gingérol ou le zingérone présents dans les rhizomes frais et secs respectivement, sont responsables de l'activité antioxydante du gingembre et ils ont rapporté aussi que l'extrait éthanolique a plus d'activité antioxydante que l'extrait aqueux car la plupart des constituants sont thermosensibles.

Les deux extraits du gingembre ont également inhibé l'oxydation du système β-carotène/acide linoléique. Ces résultats indiquent que les extraits du gingembre sont capables d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique ou de neutraliser les radicaux libres formés dans le système. Il a été montré en effet, que l'extrait du gingembre obtenu avec le CO₂ inhibe la peroxydation de l'acide linoléique présent dans l'émulsion acide linoléique/eau (Stoilva et al., 2007). Selon ces auteurs, les antioxydants hydrophobes se dirigeraient vers l'interface huile/eau, ce qui protégerait la phase huileuse de l'oxydation. Différentes activités biologiques du gingembre dont l'activité antioxydante, sont attribuées aux gingérols et aux shogaols qu'il comporte (Etoh et al., 2002 ; Nakazawa et Ohsawa, 2002). En effet, il a été rapporté que l'activité antioxydante de l'extrait organique du gingembre prévient l'oxydation du β-carotène, cependant, l'élimination du gingérol et du shogaol diminue fortement cette activité (Zancan et al., 2002).

Les deux extraits du gingembre n'ont montré qu'un faible effet chélateur envers les ions Fe²⁺ (figure 9). Cet effet, bien que faible, peut être expliqué par l'existence de molécules hydrosolubles de faible quantité ayant la capacité de fixer ou de faire des liaisons avec les ions fer. Certaines études ont trouvé un effet chélateur important de l'extrait organique du gingembre (Stoilova et al., 2007). D'autres études ont rapporté que l'extrait chloroformique d'une espèce de la famille des zingibéracées présente un effet chélateur envers les ions Fe²⁺ avec une IC₅₀ de 142 µg/ml (Policegoudra et al., 2007). Ces auteurs ont rapporté que les structures contenant deux ou plus des groupements fonctionnels suivants OH, SH, COOH, PO₃H₂, CO, NR₂, dans une configuration de structure fonctionnelle favorable sont responsables de l'activité chélatrice.

En somme, les trois plantes étudiées dans le présent travail ont montré des activités antioxydantes non négligeables. Le thé et l'origan, utilisés sous forme de feuilles produisent des effets antioxydants très importants et qui sont pratiquement similaires. Par contre, le gingembre dont les rhizomes ont été utilisés a montré un effet antioxydant bien plus faible que celui exhibé par le thé et l'origan. Cette différence peut être expliquée par le fait que les feuilles sont des organes souples et fins dont les composés chimiques hydrosolubles sont plus facilement extraits que ceux des rhizomes du gingembre utilisés dans cette étude qui constituent des organes rigides et fibreux.

Les deux extraits du thé et de l'origan (infusion et décoction) ont montré des effets scavengers très importants et similaires. Par contre, les deux extraits du gingembre ont montré des effets moindres, la décoction a donné un effet relativement meilleur par rapport à celui obtenu avec l'infusion. Ces mêmes extraits aqueux du gingembre étaient également moins efficaces dans l'inhibition de la peroxydation lipidique comparés à ceux du thé et de l'origan qui ont montré des effets semblables très puissants. Le pouvoir chélateur des extraits du thé et de l'origan était également plus important que celui exercé par les deux extraits du gingembre qui ont produit des activités très faible.

Il est connu que le thé, l'origan et le gingembre sont consommés sous forme de boissons chaudes préparées par infusion ou par décoction. D'après les résultats obtenus, il est préférable de préparer l'extrait du gingembre par décoction, opération qui est en générale recommandée pour la préparation des extraits à partir d'organes rigides. Par contre pour le thé et l'origan on ne note aucune différence entre l'infusion et la décoction. L'infusion et la décoction du thé et de l'origan produit des extraits aux activités antioxydantes relativement similaires. En terme d'activité antioxydante, le thé est un peu plus puissant que l'origan suivi ensuite par le gingembre.

3. Activité antibactérienne

3.1. Gingembre

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les extraits aqueux du gingembre n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées à savoir : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. typhi* et *E. agglomerans*. La méthode d'extraction employée dans cette étude (extraction aqueuse) pourrait être à l'origine de ces résultats. En effet, plusieurs études ont rapporté que les extraits aqueux de différentes plantes, de la famille des astéracées et des lamiacées ne présentent aucune activité antimicrobienne, alors que les extraits organiques et les huiles essentielles de ces plantes inhibent très significativement la croissance des souches testées (Candan et al., 2003 ; Sokmen et al., 2004 ; Tepe et al., 2005). Dans la majorité des cas, les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles (Candan et al., 2003). La plupart des études effectuées sur l'activité antibactérienne du gingembre sont réalisées sur des extraits organiques, l'extrait aqueux n'a fait l'objet d'aucune étude. En effet, des études ont montré que les extraits méthanoliques et ceux de l'acétate d'éthyle de *Zingiber myoga*, une espèce du gingembre, produisent une grande zone d'inhibition chez *Bacillus cereus*, activité attribuée à la présence du miogadial (Abe et al., 2004). D'autre part, le 10-gingérol isolé à partir de l'extrait du gingembre à l'aide d'hexane diminue fortement la CMI des aminoglycosides envers les entérocoques résistantes à la vancomycine (Nagoshi et al., 2006). Par contre, l'huile volatil d'une autre espèce des zingibéracée a montré un très faible effet envers les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (Sabulal et al., 2006).

3.2. Origan

Toutes les souches bactériennes testées dans cette étude (Gram⁺ ou Gram⁻) sont résistantes aux deux extraits aqueux de l'origan, à l'exception d'*Enterobacter agglomerans* qui était très sensible aux deux extraits. Les résultats de la présente étude indiquent peut être la présence de substances actives dans les extraits de l'origan, auxquelles seule l'*Enterobacter agglomerans* serait sensible. Cette activité pourrait être dû à la présence des tannins, pourvus une grande activité antibactérienne (Cowan et al., 1999). Il a été rapporté auparavant que l'extrait aqueux de l'origan (vulgaire) ne montre qu'un faible effet inhibiteur envers la croissance d'*Helicobacter pylori* (Chun et al., 2005). Ces substances bioactives, responsables de l'effet obtenu dans cette étude pourraient être d'huiles essentielles ou volatiles, d'autant plus que la grande zone d'inhibition est observée avec les souches incubées avec l'extrait

préparé par décoction. Selon certaines études, l'huile essentielle de l'*Origanum glandulosum* a montré un effet antibactérien envers diverses souches bactériennes Gram⁺ et Gram⁻ (Bendahou et al., 2007). Ils ont attribué l'activité de ces huiles à leur richesse en composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. Par contre, il a été rapporté que l'extrait méthanolique de l'*Origanum vulgare* n'a aucun effet envers toutes les souches bactériennes testées (Gram⁺ ou Gram⁻ y compris l'enterobacter) (Sahin et al., 2004). Cependant, l'huile essentielle de cette espèce d'origan a engendré des effets antibactérien et antifongique importants (Sahin et al., 2004). Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'huile essentielle des plantes médicinales contient plus de substances antimicrobiennes que les extraits aqueux, méthanolique, éthanolique ou hexaniques.

3.3. Thé

Contrairement aux extraits de l'origan et du gingembre, l'extrait du thé préparé par décoction a inhibé la croissance de *S. aureus*, souche Gram⁺ ainsi que *P. aeruginosa*, *S. typhi* et *E. agglomerans*, trois souches Gram⁻. L'extrait de l'infusion n'a inhibé que *E. agglomerans* (tableau 2). Des résultats similaires ont été obtenus par Wu et ses collaborateurs (2007) qui ont montré que l'extrait aqueux du thé inhibe la croissance de *S. aureus* de plus de 56%, alors que *E. coli* était résistante. Par contre, *Bacillus* s'est montré sensible avec un pourcentage d'inhibition de 51% (Wu et al., 2007). Il est à noter que dans la présente étude, *Bacillus* était résistante au deux extraits du thé. D'autres études ont également rapporté un effet antibactérien important du thé envers *S. typhi*, *S. aureus* et *B. cereus* (Si et al., 2006). Il a été rapporté que cette activité inhibitrice du thé serait due à la présence des polyphénols, particulièrement des catéchines. Ces substances seraient capables de provoquer des altérations dans la morphologie de la bactérie qui serait peut être le résultat d'une perturbation de la division cellulaire (Si et al., 2006). Ces molécules pourraient agir également par des liaisons ou des intercalations entre les domaines de la membrane lipidique de la bactérie (activité qui serait en relation avec le degré d'hydroxylation du cycle B des catéchines) ou encore par une liaison directe au peptidoglycane (Stapleton et al., 2004). Les groupements gallate des catéchines par leur queue amphipathiques peuvent probablement faire des interactions avec la membrane cytoplasmique ce qui conduit à l'inhibition de la consommation de l'oxygène et à l'altération de la chaîne respiratoire (Stapleton et al., 2004).

Dans la présente étude, l'évaluation de l'effet antibactérien des trois plantes montre que l'activité antibactérienne exhibée par le thé était plus importante que celle obtenue avec l'origan; cependant, le gingembre n'a montré aucun effet sur aucune des souches testées. La décoction du thé a inhibé plus de souches bactériennes que l'infusion, qui a donné quand même une inhibition de la croissance de *Enterobacter agglomerans* qui était aussi importante que celle de la décoction. Les deux extraits de l'origan étaient plus actifs envers la même souche *Enterobacter agglomerans*, sauf que la décoction était encore plus efficace que l'infusion. Ces différences semblent indiquer que la décoction ait extrait un taux plus élevé ou plus de principes actifs doués d'activité antibactérienne que l'infusion. Généralement, l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèces de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries (Loziene et al., 2006). D'après ces résultats et en terme d'activité antibactérienne, il est plus recommandé de préparer le thé et l'origan par décoction.

La comparaison de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des trois plantes étudiées, indique que dans les limites des résultats obtenus, le gingembre n'a aucune activité antibactérienne. Cependant l'origan a montré un puissant pouvoir antioxydant mais une faible activité antibactérienne. Par contre le thé a exhibé un très puissant effet antioxydant et un effet antibactérien moyen.

L'existence d'une corrélation entre l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits a été rapportée par certaines études (Caturla et al., 2003 ; Chan et al., 2005). Selon ces études, la grande activité antioxydante indiquée par le test du β carotène montre une bonne capacité à agir sur l'interface eau/huile des émulsions et la grande activité scavenger indiquée par le test du DPPH montre la présence d'antioxydants hydrosolubles (Chan et al., 2005). Ces deux types d'antioxydants peuvent agir en synergie pour inhiber la croissance de la bactérie par différents mécanismes comme l'hyperacidité cytosolique, la perturbation de la chaîne de transport électronique, la déstabilisation membranaire, la perturbation du transport membranaire ainsi que l'inhibition du métabolisme bactérien (Chan et al., 2005).

D'après les résultats obtenus dans cette étude, il est possible de conclure que le thé est un puissant agent antioxydant et un antibactérien moyen. L'origan constitue aussi une importante source de substances antioxydantes, mais ne présente pas d'activité antibactérienne significative. Alors que les deux extraits aqueux du gingembre ne montrent aucun effet antioxydant ou antibactérien remarquable.

Conclusion générale

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés aux effets antioxydants et antibactériens des extraits aqueux préparés par infusion et par décoction du thé, de l'origan et du gingembre ; trois plantes médicinales largement consommées.

Les deux extraits du thé et de l'origan ont montré des effets scavenger très puissants envers le radical DPPH, un remarquable effet inhibiteur envers l'oxydation du β -carotène et un pouvoir chélateur important envers les ions Fe^{2+} . Alors que ces effets antioxydants se sont manifestés plus faiblement avec les deux extraits du gingembre.

Les deux extraits préparés par infusion ou par décoction dans le cas du thé et de l'origan ont produits des effets antioxydants similaires. Par contre l'extrait du gingembre obtenu par décoction était plus efficace que l'infusion.

La décoction du thé a présenté un effet inhibiteur envers la croissance bactérienne de quatre souches des bactéries testées, alors que l'infusion du thé ainsi que la décoction de l'origan ont sensiblement inhibé la croissance de l'*Enterobacter agglomerans* uniquement. L'infusion de l'origan n'a également inhibé que la croissance de l'*Enterobacter agglomerans* mais à moindre degré. Par contre, les deux extraits du gingembre n'ont exhibé aucun effet antibactérien.

Les résultats obtenus, bien que préliminaires permettent de conclure que le thé et l'origan sont d'excellents agents antioxydants et sont doués d'activité antibactérienne moyenne. Le gingembre présente un effet antioxydant moyen et se trouve dépourvu de pouvoir anti-bactérien.

Pour faire suite à cette étude il est possible de :

- Appliquer d'autres tests pour une meilleure évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiés.
- Elargir le spectre des microorganismes (autres souches bactériennes, levures, champignons) et l'utilisation d'autres techniques pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.
- Caractérisation des principes actifs responsables de l'activité antioxydante dans le thé et l'origan.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abe M, Ozawa Y, Uda Y, Yamada F, Morimitsu Y, Nukamura Y, Osawa T (2004). Antimicrobial activities of diterpene dialdehydes, constituents from myoga (*Zingiber mioga* roscoe), and their quantitative analysis. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1601-1604.
- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD (2000). Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol*, **38**, 443-450.
- Almaraz-Abarca N, Campos MG, Reyesa JA, Jimenez NN, Corrala JH, Gonzalez-Valdez SD (2002). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compos Anal*, **20**, 119-124.
- Andallu B, Radhhika B, Suryakantham (2003). Effect of aswagandha, ginger and mulberry on hyperglycemia and hyperlipidemia. *Plant Foods Hum Nutr*, **58**, 1-7.
- Aruoma OI (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia pacific J Clin Nutr*, **8**, 53-63.
- Aurousseau B (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs production, *Anim prod*, **15**, 67-82.
- Azzi A (2007). Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic Biol Med*, **43**, 16-21.
- Babior B M, Lambeth J D, Nauseef, W (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 342-344.
- Bacquer DD, Clays EA, Delanghe LB, De Backer G (2006). Epidemiological evidence for an association between habitual tea consumption and markers of chronic inflammation. *Atherosclerosis*, **189**, 428-435.
- Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB, Chatzopoulou S (2005). Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass. *Anim Feed Sci Technol*, **121**, 285-295.
- Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta AG (2004). Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr Med Chem*, **11**, 369-387.
- Bandyopadhyay M, Chakraborty R, Raychaudhuri U (2007). A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT- Food Sci Technol*, **40**(5), 842-851.

- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*, **103**, 413–419.
- Bartosz G (2003). Generation of reactive oxygen species in biological system. *Commun Toxicol*, **9**, 5-21.
- Bastos MEAF, Simone MB, Jorge DM, Soares AEE, Spivak M (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *J Invert Pathol*, **97**, 273–281.
- Baydar H, Sagdic O, Oozkan G, Karadogan T (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **15**, 169–172.
- Beani, J. C. (1995) Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Rev Int Péd*, **259**, 2-7.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini F, Costa J (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* desf. Essential oil and extracts obtained by microwave extraction comparaison with hydrodistillation. *Food Chem*, **106**, 132–139.
- Benzie IFF, Szeto YT, Strain JJ, Tomlinson B (1999). Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nut cancer*, **34**, 83- 87.
- Berger MM (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr Clin mtab*, **20**, 48–53.
- Bernard FX, Sable S, Cameron B *et al*, (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomérase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 992-998.
- Bertelli D, Plessi M, Miglietta F (2003). Effect of microwaves on volatile compounds in *origanum*. *LWT*, **36**, 555–560.
- Bhattacharyya N, Seth S, Tudu B, Tamuly P, Jana A, Ghosh D, Bandyopadhyay R, Bhuyan M (2006). Monitoring of black tea fermentation process using electronic nose. *J Food Eng*, **80**, 1146-1156.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot*, **91**, 179-194.
- Borel JP, Maquart F-X, Gillery Ph et Exposito M (1999). Inflammation. In *Biochimie pour le clinicien. Mécanismes moléculaires et chimiques à l'origine des maladies*. Frison - Roche (Paris), pp : 26-27-28.

- Brad A. Sutherland, Rahman RMA, Appleton I (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem*, **17**, 291–306.
- Brown K L and Hancock E W (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol*, **18**, 24–30.
- Brown KL and Hancock RE (2005). Cationic host deffense (antimicrobial) peptides. *Cur Opin Immunol*, **18**, 24-30.
- Bruneton J (1999). *Pharmacognosie, phytochimie : plantes médicinale*, 3^{ème} édition, technique et documentation, (Paris), pp : 299, 301, 540, 1076-1079.
- Bryer E, CNM, MSN (2003). A literature review of the effectiveness of Ginger in alleviating mild to moderate nausea and vomiting of pregnancy. *J Midwifery Womens Health*, **50**, 1-3.
- Bursill CA, Abbey M, Roach PD (2007). A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*, **93**, 86-93.
- Calmasur O, Aslan I, Sahin F (2006). Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Ind Crops Prod*, **23**, 140–146.
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Dferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millifolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*, **87**, 216-220.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chem*, **93**, 223–226.
- Caturla N, Vera-Samper E, Villalain J, Mateo CR, Micol V (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipide model membranes. *Free Radic Biol Med*, **34**, 648–662.
- Chambers HF and Sande MA (1998). Medicaments antimicrobiens. In: Haedman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Rudon RW and Gilman AG. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. New York: Mc Graw Hill; 1027-1029.
- Chan EWC, Lim YY, Chew YL (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chem*, **102**, 1214-1222.

- Chandra Mohan KVP, Devaraj H, Prathiba D, Hara Y, Nagini S (2006). Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1760**, 1536–1544.
- Chang CW, Changa L, Chang ST and Cheng S (2008). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Res*, **42**, 278 – 286.
- Chaturvedi RK, Shukla S, Seth K, Chauhan S, Sinha C, Shukla Y and Agrawal AK (2006). Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **22**, 421 – 434.
- Chen H, Zhang M and Xie B (2005). Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chem*, **90**, 17-21.
- Chen X, Li W and Wang H (2006). More tea for septic patients? Green tea may reduce endotoxin-induced release of high mobility group box1 and other pro-inflammatory cytokines. *Med Hypotheses*, **66**, 660–663.
- Cheng TO (2006). All teas are not created equal the Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol*, **108**, 301 – 308.
- Chiarugi P and Fiaschi T (2006). Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*, **19**, 672–682.
- Chun SS, Vatter DA, Lin YT, Shetty K (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*, **40**, 809–816.
- Clarkson PM and Thompson HS (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, **72** (suppl), 637S–46S.
- Coulon L (2004). Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. Thèse de Doctorat .Institut National des Sciences Appliquées(Lyon), pp : 59-70.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinl Microbiol rev*, **12**, 564–582.
- Cushnie TPT and Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J antimicrobial agents*, **26**, 343-356.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D and Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, **52**, 601-623.
- Datta AG, Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A and Ghosh G (2004). Oxidative stress induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr Med Chem*, **11**, 369-387.

- De Bacquer D, Clays E, Delanghe J, De Backer G (2006). Epidemiological evidence for an association between habitual tea consumption and markers of chronic inflammation. *Atherosclerosis*, **189**, 428–435.
- De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JRS, Jessup W and Leake DS (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by *macrophages*. *Biochem Pharmacol*, **39**, 1743-50.
- Dellatre J, Duran G, Jardillier JC (2004). Biochimie pathologique. Aspect moléculaire et cellulaire, édition : flammarion, p : 59-74.
- Dolezilkova I , Mackova M, Tomas Macek T (2007). Short peptides with antimicrobial activity isolated from plants. *J Biotechnol*, **131**, S40–S42.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ (2003). Characterisation of the antioxidant properties of deodorised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*, **83**, 255–262.
- Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem*, **95**, 37-43.
- Elzaawely AA, Xuan TD and Tawata S (2005). Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT, aerial parts. *Biol Pharm Bull*, **28**, 2225—2230.
- Es-Safi N, Kollmann A, Khelifi S and Ducrot P (2007). Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure–activity relationship. *LWT*, **40**, 1246–1252.
- Etoh H, Kondoh T, Noda R, Singh IP, Sekiwa Y, Morimitsu K and Kubota K (2002). Shogaols from *Zingiber officinale* as promising antifouling agents. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1748-1750.
- Evans w j (2000). Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr*, **72**(suppl):647S–52S.
- Farhoosh R, Golmovahhed GA and Khodaparast MHH (2007). Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chem*, **100**, 231–236.
- Favier A (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Ficker CEA, Smith ML, Susiarti SB, Leaman DJ, Arnason JCIT (2003). Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). *J Ethnopharmacol*, **85**, 289–293.

- Fiorucci (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat. Université de Nice-Sophia Antipolis. Spécialité: Chimie, pp: 19-25.
- Fournier P (1999). *Plantes médicinales*, tome III, (France), pp : 128-130.
- França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol, Part A* **146**, 621–631.
- Frei B and Higdon JV (2003). Antioxidant activity of tea polyphénols in vivo: evidence from animal studies. *Am Soc Nutr Sci*, 3275S-3284S.
- Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, Coleman R and Aviram M (2000). Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates Development of Atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr*, 1125-1131.
- Funatogawa A, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, et al (2004). Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter Pylori*. *Microbiol. Immunol*, **48**, 251-261.
- Gallaher RN, Gallaher K, Marshall AJ, Marshall AC (2006). Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *J Food Composit Anal*, **19**, S53–S57.
- Ghedira K (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4**, 162-169.
- Grunwald J et Janicke (2006). *Guide de la phytothérapie*, 1^{ère} édition, pp : 380.
- Habsah MA, Amran MA, Mackeen MMA, N.H. Lajis NHA, Kikuzaki HB, Nakatani NB, Rahman AAC, Ghafar D, Ali AM (2002). Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol*, **72**, 403–410.
- Halliwell B (1997). Antioxidants: the basics- What they are and how to evaluate them. In: Si H: antioxidants in disease mechanisms and therapy. Advances in pharmacology academic press London, **38**, pp: 4-6.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*(Oxford), pp:11,60,81,86,90,92,123,125,247,254,256,319.
- Han L K, Gong X J, Kawano S, Saito M, Kymura Y, Okuda H (2005). Antiobesity action of *Zingiber officinalis roscoe*. *Pharm soc jpn*, **125**, 213-217.
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K and Kinoshita T (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochem*, **48**, 125-129.

- Hashimoto F, Ono M, Masuoka C, Ito Y, Sakata Y, Shimizu K, Nonaka G, Nishioka I and nohara T (2003). Evaluation of the antioxidatif effect (*in vitro*) of tea polyphénols. *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 396-401.
- Haslam, E (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod*, **59**, 205–215.
- Hirose M, Hoshiyab TC, Mizoguchib YC, Nakamurac A, Akagib KC, Shirai T (2001). Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-Dimethylhydrazine or 2,20-dihydroxy-di-n propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett*, **168**, 23-29.
- Hirose M, Yamaguchib TC, Mizoguchib YC, Akagib KC, Futakuchib M, Shirai T (2002). Lack of inhibitory effects of green tea catechins in 1,2- dimetylhydrazine-induced rat intestinal carcinogenesis model: comparison of the different formulations, administration routes and doses. *Cancer Lett*, **188**, 163–170.
- Hwang ES, Kim GH (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicol*, **229**, 1–10.
- IijimaY, Yoshiara M, Morimitsu Y and Kubota K (2003). Anthocyanin Compounds in Japanese Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and Their Quantitative Characteristics. *Food Sci Technol Res*, **9**, 292–296.
- Ikigai H, Naka T, Hara Y and Shimamura T (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem Biophys Acta*, **1147**, 132-136.
- Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Can Baser KH (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem*, **93**, 551–556.
- Ippoushi K, Azuma K, Ito H, Horie H, Higashio H (2003). [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sci*, **73**, 3427–3437.
- Iqbal Z, Lateef MA, Akhtar MSB, Ghayur MNC, Gilani AH (2006). In vivo anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *J Ethnopharmacol*, **106**, 285–287.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **96**, 145–150.
- Kamal-Eldin And appelqvist LA (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipides*, **31**, 671-761.

- Katiyar S, Craig A, Elmetsa B, Santosh K, Katiyara B (2007). Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *J Nutr Biochem*, **18**, 287-296.
- Khan N, Mukhtar H (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*, **81**, 519–533.
- Khanom F, Kayahara H and Tadasa K (2000). Superoxyde-scavenging and prolyl endopeptidase inhibitory activities of Bangladeshi indigenous medicinal plants. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 837-840.
- Kim EC, Min JKA, Kim TYC, Lee SJA, Yang HOD, Han SB, Kim YM, Kwon YG (2005). [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 300–308.
- Kim HAW, Murakami A, Abe M, Ozawa Y, Morimitsu Y, Willams MV and Ohigashi M (2005). Suppressive effects of mioga ginger and Ginger constituents on reactive oxygen and nitrogen species generation, and the expression of inducible pro-inflammatory genes in macrophages. *Antioxidants and redox signalling*, **7**, 11- 12.
- Klebanoff JS (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, **77**, 598-625.
- Koch C, Reichling BJ, Schneeleb J, Schnitzler P (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phyto Med*, **15**, 71–78.
- Koeschlin-Ramonatxo C (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr clin metab*, **20**, 165–177.
- Kordali S, Cakir A, Ozer AH, Cakmakci R, Kesdek M and Mete E (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 1-8.
- Kota N, Krishna P, Polasa K (2008). Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. *Food Chem*, **106**, 991–996.
- Kouri G, Tsimogiannis D, Haido Bardouki H, Oreopoulou V (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, **8**, 155-168.
- Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milosa M, (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*, **85**, 633–640.
- Kumar VP, Chauhan NS, Rajani HPM (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **107**, 182–188.

- Kuo PLA, Hsu YLB, Lin TCC, Lin CC (2005). The antiproliferative activity of prodelpinidin B-2 3-O-gallate from green tea leaf is through cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells. *Food Chem Toxicol*, **43**, 315–323.
- Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Yoshida T, Shiota T, Tsuchiya T and Hatano T (2006). Polyphenolic constituents structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 1423-1431.
- Laporta O, Perez-Fons L, Mallavia R, Caturla N, Micol V (2007). Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chem*, **101**, 1425–1437.
- Lee YL, Cesario DT, Wang MB, Shanbrom E, MD and Thrupp LMD (2003). Antibacterial activity of vegetables and juices. *Nutr*, **19**, 994 –996.
- Lehucher-Michel M P, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*, **30**, 1076-1081.
- Lemhadri A, Zeggwagh NA, Maghrani M, Jouad M, Eddouks M (2004). Anti hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *J Ethnopharmacol*, **92**, 251–256.
- Lin CC, Lu MJ, Chen SJ and Chen HoS (2006). Heavy fermentation impacts NO-suppressing activity of tea in LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem*, **98**, 483–489.
- Ma X et Gang DR (2006). Metabolic profiling of in vitro micropropagated and conventionally greenhouse grown ginger (*Zingiber officinale*). *Phytochem*, **67**, 2239-2255.
- Maity S, Vedasiromoni RG and Ganguly DK (1998). Role of glutathione on antiulcer effect of hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *Jpn J Pharmacol*, **72**, 278- 292.
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C and Leboulenger F (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ*, **2**, 91-104.
- Manian R, Anusuya A, Siddhuraju P, Manian S (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem*, **107**, 1000–1007.
- Manju V and Nalini TN (2005). Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta*, **358**, 60–67.
- Manzocco L, Anese M, Nicoli MC (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensmittel-Wissenschaftund-Technol*, **31**, 694-698.

- Marfak A (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes .Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de Depsides. Thèse de Doctorat.Université de Limoges. Spécialité: Biophysique, pp:6-34.
- Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, **77**, 147-161.
- Mehra A and Baker CL (2007). Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*, **100**, 1456–1463.
- Meizoso IR, Marin FR, Herrero M, Senorans FJ, Reglero G, Cifuentes A, Ibanez E (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J Pharm Biomed anal*, **41**, 1560–1565.
- Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, Amkiss S, Skali NS, Abrini J, Zhiri A, Baudoux D, Diallo B, El Jaziri M, Idaomar M (2007). Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat Res*, **629**, 100–110.
- Milane H (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications. Thèse de Doctorat .Université Louis Pasteur (Strasbourg). Spécialité Pharmacologie, pp : 13-3.
- Mirzoeva OK, Grichnin RN, Calder PC (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res*, **152**, 239-246.
- Mori A, Nichino C, Enoki R and Twata S (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *ptoteus vulgaris* and *staphylococcus aureus*. *Phytochem*, **26**, 2231-2234.
- Nagoshi C, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Kariama R, and Tsuchya T (2006). Synergistic effect of [10]-gingerol and aminoglycosides against vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*, **29(3)**, 443-447.
- Nakazawa T, Ohsawa K (2002). Metabolism of [6]-gingerol in rats. *Life Sci*, **70**, 2165-2175.
- Nanjo F, Mori M, Goto K and Hara Y (1999). Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1621-1623.
- Nitta T, Arai T, Takamatsu H, Inatomi Y, Murata H, Linuma M, Tanaka T, Ito T, Asai F, Ibrahim I, Nakanishi T and Watab K (2002). Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin resistance *staphylococcus aureus*. *J health sci*, **48**, 273- 276.

- Nurtjahja-Tjendraputra E, Ammit AJ, Roufogalis BD, Tran VH, Duke CC (2003). Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thromb Res*, **111**, 259–265.
- Oktey M, Gulcin I, Kufrevioglu O I (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm Wiss Technol*, **36**, 263-271.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18**, 414–420.
- Ozturk S and Ercisli S (2007). Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food Control*, **18**, 535–540.
- Pelletier E, Campbell PGC et Denizeau F (2004). Défaillance de la synthèse des hormones corticostéroïdes. In *Ecotoxicologie Moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Press de l'université du Québec (Canada), pp : 182-184, 447.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr clin metab*, **16**, 233–239.
- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer R and Jerala L (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Res Commun*, **306**, 530-536.
- Policegoudra RS, Abiraj K, Gowdab DC, Aradhya SM (2007). Isolation and characterization of antioxidant and antibacterial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *Journal of Chromatography B*, **852**, 40–48.
- Prescott LM, Harley JP and Klein DA (2003). La chimiothérapie antimicrobienne. In: *Microbiologie*, 2ème édition (Bruxelles), pp: 806-811.
- Prévot-D'alvise N (2006). International free radical summer school. Université du Sud Toulon-Var. *Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire*, pp:3
- Pryor WA (1984). In *Free radicals in Molecular Biology, Aging and Disease* ; Armstrong D, Sohal RS, Culter RG and Slater T.F. Eds. *Raven Press, New York, NY*, pp13.
- Que F, Mao L, Zhu C, Xie G (2006). Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT -Food Sci Technol*, **39**, 111-117.
- Rahal K (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rasooli I, Rezaei MB and Allameh A (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int J Infect Dis*, **10**, 236—241.

- Reto MA, Maria E, Figueira AB, Filipe HMA and Almeida CMM (2007). Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME–GC-FID. *Food Chem*, **100**, 405–411.
- Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G (1997). Antioxidant proprieties of phenolic compounds. *Trends in plant sci*, **2**, 152-159.
- Rodriguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M, Senorans FJ, Reglero G, Cifuentes A, Ibanez E (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J Pharm Biomed Anal*, **41**, 1560–1565.
- Romieu I and Trenga C (2001). Diet and obstructive lung diseases. *Epidemiol Rev*, **23 (2)**, 269-287.
- Rump AF, Schussler M, Acar D, Cords A, Ratke A, Theisohm M, Rosen R, Klaus W, Friek U (1995). Effect of different inotropes with antioxydant properties on accute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen pharmacol*, **26**, 306-311.
- Sabulal AB, Dan MB, Anil John AJa, Kurup RA, Pradeep NSC, Valsamma RKC, George V (2006). Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochem*, **67**, 2469–2473.
- Sagdic O (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm Wiss Technol*, **36**, 467–473.
- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G, Ozer G (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern anatolia region of Turkey. *Food Control*, **15**, 549–557.
- Sakakibara H, Ashida H, Fukuda I, Furuyashiki FT, Sano T, Nonaka Y, Hashimoto T and KanazawaK (2006). A frequent drinking of green tea lowers the levels of endogenous oxidative stress in small intestines, erythrocytes and kidneys in rats. *J Clin Biochem Nutr*, **39**, 32–39.
- Sakanaka S, Juneja LR and Nanuguchi M (2000). Antimicrobial effect of green tea polyphenols on thermophilic spore- forming bacteria. *J Biosci Bioeng*, **90 (1)**, 81-85.
- Sang S, Cheng X, Stark RE, Rosen RT, Yang CS and Ho CT (2002). Chemical study on antioxidant mechanism of tea catechins: Analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2 diphenyl-1- picrylhydrazyl. *Bioorg Med Chem*, **10**, 2233-2237.
- Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Salgado APSP, Menna-Barreto RFS, Soares MJ (2006). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.)

- essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res*,
- Sato J, Goto K, Nanjo F, Kawai S and Murata K (2000). Antifungal activity of plant extracts against *Arthrimum sacchari* and *Chaetomium funicola*. *J Biosci Bio Eng*, **90(4)**, 442-446.
- Sedensky MM and Morgan PG (2006). Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Exp Gerontol*, **41**, 237-245.
- Senator A (2004). Etude de la relation entre le stress oxydant et la protéine du prion «PrP» cas de stress induits par le paraquat et le cuivre .Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas (Sétif), pp: 43-48.
- Servais S (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. Thèse de *Doctorat*. Université Claude Bernard (Lyon), pp:19-34.
- Si W, Gong J, Tsao RS, Kalab M, Yang R and Yin Y (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J Chromatogr*, **1125**, 204–210.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, **89**, 191–198.
- Sokmen A, Sokmen N, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M, Akpulat A (2004). The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* afan. (Asteraceae). *Phytother Res*, **18**, 451-456.
- Song JM, Lee KH, Seong BL (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res*, **68**, 66–74.
- Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, **18**, 409–413.
- Stapleton PD, Gettert J, Taylor PW (2006). Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, **111**, 276–279.
- Stege AP W, Davicinoa R C, Vegaa A E, Casalib Y A, Correac S and Micalizzia B (2006). Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomed*, **13**, 724–727.
- Stepanovic S, Antic N, Dakik I and Svabic-Vlahovic M (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res*, **158**, 353-357.

- Stern J L, Hagerman A E, Steinberg P D and Mason PK (1996). Phlorotannin-protein interactions. *J Chem Ecol*, **22**, 1887–1899, 211.
- Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova AB, Denev PC, Gargova S (2007). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chem*, **102**, 764–770.
- Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J Food Composition Anal*, **19**, 348-353.
- Taguri T, Tanaka T and Kouno I (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull*, **29(11)**, 2226—2235.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chem*, **90**, 333-340.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA and Sokmen A (2006). Screening of the potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*, **95**, 200-204.
- Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM,Alnaqeeb MA, Khan I, Ali M (2002). The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **67(6)**, 475-478.
- Topica B, Tanib E, Tsiakitzisb K, Kourounakisb PN, Derea E, Hasenohrla RU, Hackerc R, Matternc CM, Huston JP (2002). Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of *zingiber officinale* and *ginkgo biloba* in the aged rat. *Neurobiol Aging*, **23**,135–143.
- Traber MG and Atkinson (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, **43**, 4–15.
- Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH and Ho SC (2006). Comparaison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food Chem*,
- Tsuchiya H and Linuma M (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *PhytoMed*, **7**, 161-165.
- Turkmen N, Sari F and Velioglu YS (2006). Effect of extraction on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and folin- ciocalteu methods. *Food Chem*, **99**, 835-841.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44–84

- Van der Merwe JD, Joubert E, Richards ESA, Manley MA, Snijman PWB, Marnewick JLC and Gelderblom WCAA (2006). Comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. *Mutat Res*, **611**, 42-53.
- Vukics V, Kery A, Bonn GK and Guttman A (2008). Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. *Anal Bioanal Chem*, **1206(1)**, 11-20.
- Wang H and Bun TNg (2005). An antifungal protein from ginger rhizomes. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 100–104.
- Wannissorna B, Jarikasemb S, Siriwangchaib T, Thubthimthed S (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, **76**, 233–236.
- Watanab T, Nishiyama R, Yamamoto R, Nagai S and Terabe S (1998). Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine and ascorbic acid in commercial canned green and black teas in micellar electrokinetic chromatography. *Anal sci*, **14**, 435-438.
- White B (2007). Ginger: An Overview. *Altern med*, **75(11)**, 1690-1691.
- Witko-Sarsat V (2002). Cellules phagocytaires. In *Immunologie*, 4^{ième} édition, Bach J et Chatenoud L Eds, Médecine- Science Flammarion (Paris), pp : 99-104.
- Witte W, Cuny C, Klare I, Nubel U, Strommenger B and Werner G (2008). Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. *Int J Med MicroBiol*, **298**, 365–377.
- Wu C, Chen F, Wang X, Kim H, He G, Haley-Zitlin V, Huang G (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem*, **96(2)**, 220-227.
- Wu SC, Yenb GC, Wang BS, Chiud CK, Yend WJ, Changd LW, Duh PD (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT*, **(40)** 506–512.
- Yamamoto H and Ogawa M (2002). Antimicrobial activity of Perilla seed polyphénols against oral pathogenic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66 (4)**, 921-924.
- Yamamoto M, Miyamoto S, Moon JH, Murota K, Hara Y and Terao J (2006). Effect of dietary green tea catechin preparation on oxidative stress parameters in large intestinal mucosa of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70(1)**, 286-287.
- Yamamura S, Ozawa K, Ohtani K, Kasai R and Yamasaki K (1998). Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from menthe spicata. *Phytochem*, **48**, 131.

- Yang X, Li J, Li X, She R, Pei Y (2006). Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*, **27**, 3122–3128.
- Yao LH, Jiang YM, Caffin N, D'Arcy D, Datta N, Liu X, Singanusong R, Xu Y (2006). Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. *Food Chem*, **96**, 614–620.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Toma FA, Barbera S, Datta NN, Singanusong N and Chen S (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr*, **59**, 113–122.
- Zancan KC, Marques MOM, Petenate AJ, Meireles MA (2002). Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, **24**, 57–76.
- Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Rao J and Le AD (2006). Green tea extract and epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*, **5** (5) .
- Zhao B (2006). The health effects of tea polyphenols and their antioxidant mechanism. *J. Clin Biochem Nutr*, **38**, 59-68.
- Zhu N, Wang M, Wei GJ, Lin JK, Yang CS and Ho CT (2001). Identification of reaction products of (-)- epigallocatechin, (-)- epigallocatechin gallate and pyrogallol with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chem*, **73**, 345-349.