



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE **UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID**

– **TLEMCCEN**

THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT

Spécialité: **CHIMIE DES PRODUITS NATURELS, ANALYSES ET
APPLICATIONS**

Par :

Mme Fatima Zahra BENOMARI

Sur le thème

**VARIABILITE CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES
VOLATILS DES ESPECES AROMATIQUES A INTERET ECONOMIQUE
DES GENRES MENTHA, INULA, THYMUS, ASTERICUS ET
CHRYSANTHEMUM DE L'OUEST ALGERIEN**

Soutenu publiquement le 30 Avril 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Boufeldja TABTI	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr Nassim DJABOU	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr Cédric BERTRAND	Professeur	Université de Perpignan	Examineur
Mr Chaouki SELLES	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr David DUVAL	Maître de Conférences A	Université de Perpignan	Examineur
Mme Zahia HOUMANI	Professeur	Université de Blida	Invitée
Mr Hamdane ALLALOU	Président	Consortium PPAM&HE	Invité
Mr Mohamed MOUMANI	Directeur	Parc National de Tlemcen	Invité



**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID
TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**



THESE DE DOCTORAT LMD

MENTION
CHIMIE DES PRODUITS NATURELS, ANALYSES ET APPLICATIONS

Soutenue publiquement par

FATIMA ZAHRA BENOMARI

Le **30/04/2018**

**VARIABILITE CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES VOLATILS
DES ESPECES AROMATIQUES A INTERET ECONOMIQUE DES GENRES
MENTHA, INULA, THYMUS, ASTERICUS ET CHRYSANTHEMUM DE
L'OUEST ALGERIEN**

Jury de Thèse

Pr Boufeldja TABTI
Pr Cédric BERTRAND
Pr Chaouki SELLES
Dr David DUVAL
Dr Nassim DJABOU

Président	Université deTlemcen
Examineur	Université dePerpignan
Examineur	Université de Tlemcen
Examineur	Université de Perpignan
Encadrant	Université de Tlemcen

Invités

Pr Zahia HOUMANI
M. Hamdane ALLALOU
M. Mohamed MOUMANI

Université de Blida 1
Président Consortium PPAM&HE Algeria
Directeur Parc National de Tlemcen

À mon très cher

Dédicaces

À mes chers parents

Je vous remercie d'être toujours là pour moi, de m'avoir encouragé, soutenue d'avoir prié pour moi, je remercie mon dieu de m'avoir donné l'honneur d'être votre fille.

À ma belle famille

Je tiens à vous remercier pour votre encouragement, votre patience, et votre aide bien précieuse, merci d'être la deuxième famille que dieu m'a offert, merci à vous tous, ma belle-mère, mes beaux-frères et surtout ma belle-sœur Samia.

Maintenant je m'adresse à mon beau père, cette thèse est dédiée à votre présence autour de nous, à votre aide et votre patience, je vous remercie d'être le grand père à mes enfants.

À ma petite famille

À mon mari, merci d'être à mes côtés, et à mon rayon de soleil mon fils.

À mes frères et ma sœur

À mon amie Sarah

À mes proches et mes amies, et tous ceux qui m'ont soutenu

AVANT PROPOS

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage, la patience et la foi qui nous a donné pour mener à bien ce travail.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car à l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire, c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener ce travail à son terme.

Les travaux de recherche ont été effectués : **i)** au laboratoire des substances naturelles et bioactives « LASNABIO » pour tout ce qui est de la préparation des huiles essentielles, je tiens à remercier chaleureusement son directeur Pr Said GHALEM, ainsi que le chef d'équipe des huiles essentielles le Pr Boufeldja TABTI, et tous les membres du laboratoire LASNABIO pour toute l'aide qui m'ont apporté soit durant la thèse, mais aussi durant mon cursus de master ; **ii)** les analyses des fractions volatiles ont été réalisées au laboratoire de chimie des Produits Naturels CPN de Corse (France), je tiens à remercier son directeur Pr Alain MUSELLI, ainsi que son ancien directeur Pr Jean COSTA, et tous les membres du laboratoire CPN pour nous avoir ouvert leur porte et nous avoir donné la possibilité de réaliser des analyses et suivre la méthodologie du laboratoire CPN ; **iii)** la suite des extractions des huiles essentielles et leurs analyses ont été effectuées au laboratoire COSNA sous la direction du Pr Zoher ARRAR, Je souhaite lui adresser toute ma gratitude, je remercie ainsi son ancien directeur Pr Joseph KAJIMA, et tous les membres du laboratoire COSNA pour leur disponibilités et leur encouragements.

Cette thèse a été le fruit d'une collaboration entre l'université de Tlemcen et le groupement d'entreprise CONSORTIUM PPAM&HE ALGERIA, en menant un projet structurant de la filière PPAM en Algérie, encadré et porté par mon directeur de thèse Docteur-HDR Nassim DJABOU que je tiens grandement à le remercier pour sa patience, son encouragement, son exigence et son souci du détail qui m'ont incitée à approfondir ma réflexion. Merci pour tout.

Je tiens à remercier le Pr Cedric BERTRAND et toute l'équipe du laboratoire CRIOBE de l'Université de Perpignan, Vanessa ANDREU, Jule KOTARBA, pour m'avoir accueillie, je leur remercie pour, leur gentillesse et leurs aides précieuses dans la réalisation des activités biologiques liées au bio-contrôle.

Je remercie Pr Mourad BENDAHOU, membre du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) ainsi que toute son

équipe et surtout M. Abdel Mounaim KHADIR pour la réalisation des tests des activités antimicrobiennes.

Je veux aussi remercier les membres du Laboratoire d'Écologie et Gestion des Écosystèmes Naturels et surtout Dr Fayçal HASSANI pour l'identification botanique des plantes.

Je remercie vivement les étudiantes du master MBSA, Mlles Amina TAALBI, Ikram AMER BERRAHOU et Nora BENHAMOU pour l'aide qui m'ont apporté dans l'échantillonnage de quelques espèces qui font partie à mon sujet de thèse, ainsi que le responsable du master et de la formation doctorale Pr Mohamed El Amine DIB pour toute l'aide et l'accompagnement auquel j'ai eu droit.

Qu'il me soit permis de remercier Pr Said GHALEM directeur du laboratoire LASNABIO, ainsi que Pr Mohamed El Amine DIB responsable du master MBSA et Pr Boufeldja TABTI chef d'équipe des huiles essentielles pour leurs soutien moral et leurs conseils, ainsi que tous mes collègues du laboratoire LASNABIO.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude aux professeurs Boufeldja TABTI (Université de Tlemcen), Pr Chaouki SELLES (Université de Tlemcen), Pr David DUVAL (Université de Perpignan) et Pr Cedric BERTRAND (Université de Perpignan), pour l'honneur que me font en acceptant d'être les membres de jury de ma soutenance de thèse. Je tiens à leurs exprimer ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements vont également aux membres du Consortium PPAM&HE Algeria, son Président M. Hamdane ALLALOU et madame le membre du conseil scientifique Pr Zahia HOUMANI qui nous ont orienté et aider dans la réalisation de cette thèse et sa partie économique. Je les remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont aussi à M. Mohamed MOUMANI, directeur du Parc National de Tlemcen et président de l'association Forêt Modèle, qui nous a aidé dans la récolte et l'échantillonnage de certaines espèces ainsi que l'utilisation de leur pépinière des PPAM. Je le remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des organismes qui ont participé à l'aboutissement de ce travail de thèse : Université de Tlemcen, Université de Corse, Université de Perpignan, Consortium PPAM&HE Algeria, Parc National de Tlemcen, Conservation des forêts de la willaya de Tlemcen, l'entreprise Bio-source et

l'entreprise SAPHY international pour toute l'aide et surtout la confiance qu'ils m'ont accordée pour avancer dans mes recherches et les mener à terme.

Mes sincères remerciements s'adressent à ma famille, ma belle famille, et tous mes proches et mes ami(e)s qui m'ont soutenu(e) tout au long de mon parcours.

SOMMAIRE

Parti A

<u>INTRODUCTION</u>	P1
1. Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales (PPAM)	P2
2. Généralités sur les huiles essentielles	P3
3. Les hydrolats	P4
4. Intérêt économique	P5
4.1. Les Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales	P5
4.2. Les Huiles Essentielles	P5
5. Problématique de recherche	P7

Partie B

<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	P12
1. Famille des Lamiacées	P13
1.1. Genre <i>Mentha</i>	P13
1.1.1. <i>Mentha pulégium</i> (menthe pouliot).....	P14
1.1.2. <i>Mentha rotundifolia</i> (menthe des champs)	P15
1.1.3. <i>Mentha pipérita</i> (la menthe poivrée)	P16
1.1.4. <i>Mentha spicata</i> (menthe verte)	P17
1.2. Genre <i>Thymus</i>	P18
1.2.1. <i>Thymus ciliatus</i>	P19
1.2.1.1. <i>Thymus ciliatus</i> ssp <i>eu-ciliatus</i>	P19
1.2.1.2. <i>Thymus ciliatus</i> ssp <i>coloratus</i>	P20
1.2.1.3. <i>Thymus ciliatus</i> ssp <i>munbyanus</i>	P20
1.2.2. <i>Thymus inodorus</i> (<i>Micromeria inodora</i>)	P21
2. Famille des Astéracées	P22
2.1. Genre <i>chrysanthemum</i>	P23
2.1.1. <i>Chrysanthemum coronarium</i>	P24
2.2. Genre <i>Inula</i>	P25
2.2.1. <i>Inula viscosa</i>	P25
2.2.2. <i>Inula montana</i>	P26
2.3. Genre <i>Asteriscus</i>	P27
2.3.1. <i>Asteriscus maritimus</i> (<i>Pallenis maritima</i>).....	P27
2.3.2. <i>Asteriscus spinosus</i> (<i>Pallenis spinosa</i>).....	P28

Partie C

<u>L'ANALYSE DES MELANGES COMPLEXES DES VOLATILS DES PLANTES</u>	P31
1. Méthodes de préparation de l'échantillon	P32
1.1. Hydrodistillation	P33
1.2. Extraction liquide-liquide (Obtention de l'extrait d'hydrolat)	P34
2. Les méthodes d'identification des constituants des mélanges complexes des volatils	P34
2.1. Chromatographie en phase gazeuse « CPG »	P35
2.2. Chromatographie en phase gazeuse /spectrométrie de masse (CPG/SM)	P36
2.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	P37
3. Méthodologie d'analyse.....	P37

Partie D

<u>APPROCHE METHODOLOGIE – RESULTATS</u>	P42
1. L'apport de la Chromatographie Liquide sur Colonne (CLC)	P43
2. Utilisation des bibliothèques de données commerciales, un savoir-faire à acquérir.....	P44
3. La résonance magnétique nucléaire RMN du carbone 13	P45
4. Outil statistique	P45
4.1. Analyse en Composante Principale (ACP).....	P46
4.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	P46
5. Compositions chimiques des huiles essentielles	P47
5.1. Variabilité Chimique (Nombre des échantillons).....	P47
5.2. Séchage de la plante et détermination de la teneur en eau	P48

5.3. Espèces, sous-espèces et variétés.....	P49
5.3.1. Espèce	P49
5.3.2. Sous-espèces	P50
5.3.3. Variétés	P50
5.4. Partie de la plante utilisée	P51
5.5. Cycle végétatif de la plante et sa période de récolte	P52
5.6. Facteurs environnementaux	P55
6. Étude de la composition chimique des hydrolats	P56

Partie E

<u>VALORISATION DES HUILES ESSENTIELLES : ACTIVITES BIOLOGIQUES</u>	P59
1. Activité antioxydante	P60
1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	P60
1.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	P61
1.3. Test de blanchissement du β -carotène	P62
2. Activité antibactérienne	P65
2.1. Méthode par diffusion sur milieux solide (méthode des disques)	P66
2.2. Méthode sur milieux liquides	P66
3. Activité antifongique	P70
3.1. Méthode de diffusion	P71
3.2. Méthode de fumigation.....	P72
4. Activité insecticide et larvicide	P74
5. Activité antifongique des hydrolats	P77

Partie F

<u>ASPECT ECONOMIQUE</u>	P79
1. Contexte général.....	P80
2. Approche Intérêt Économique / Recherche Scientifique.....	P81
2.1. Huiles Essentielles jamais décrites dans la littérature	P82
2.1.1. Cas de <i>Thymus inodorus</i>	P82
2.1.2. Cas d' <i>Inula montana</i>	P82
2.2. Huiles essentielles jamais décrites en Algérie.....	P83
2.2.1. Cas de <i>Thymus ciliatus ssp manbyanus</i>	P83
2.2.2. Cas d' <i>Asteriscus maritimus</i> et d' <i>Asteriscus spinosus</i>	P83
2.3. Huiles essentielles décrites en Algérie et dans le monde.....	P83

<u>CONCLUSIONS</u>	P88
---------------------------------	------------

<u>REFERENCES</u>	P90
--------------------------------	------------

<u>LISTE DES TRAVAUX</u>	P103
---------------------------------------	-------------

<u>LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES</u>	P108
--	-------------

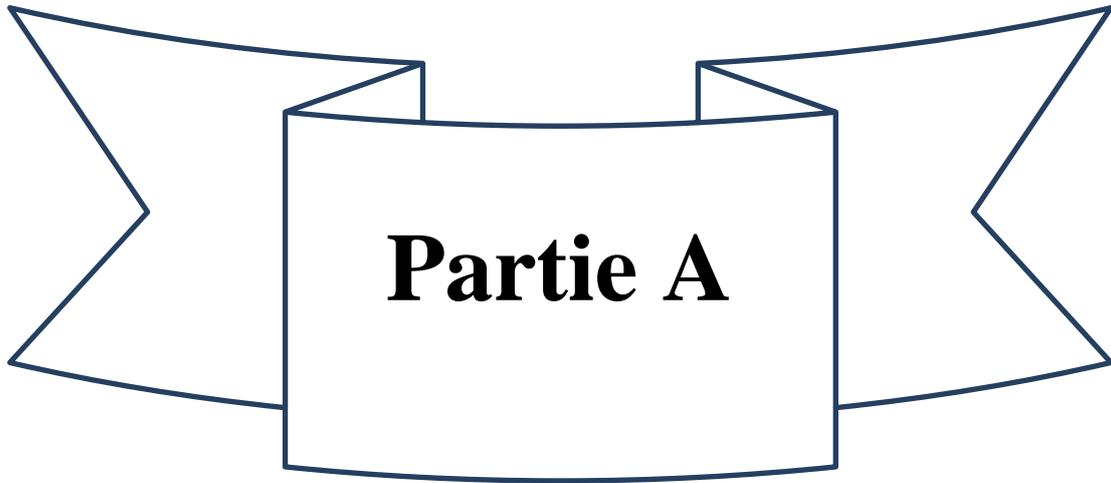
ARTICLE 1	P
-----------------	---

ARTICLE 2	P
-----------------	---

ARTICLE 3	P
-----------------	---

ARTICLE 4	P
-----------------	---

ARTICLE 5	P
-----------------	---



INTRODUCTION

1. Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales (PPAM)

Dans toutes les civilisations du monde, et depuis les temps les plus anciens, les plantes aromatiques et médicinales étaient étroitement liées à la vie quotidienne de l'homme. En médecine, en gastronomie, en parfumerie, et en cosmétique, toutes les plantes à parfums possèdent une place de choix. Cependant, depuis le début de l'ère industrielle, ces usages se perdent, les sociétés modernes ayant à leur disposition d'autres molécules, d'autres matériaux, et des moyens de production autrement plus conséquents. C'est ainsi qu'ont commencé à disparaître la plante-nourriture, la plante-soin et la plante-cosmétique ou parfum. Néanmoins, l'impact massif qu'à exercé l'industrialisation sur l'environnement a conduit à une prise de conscience générale en faveur de la santé de l'homme, qui commence à avoir la volonté de se retourner vers « le naturel ». L'utilisation des PPAM (plante entières) ou sous forme d'extraits, d'hydrolats ou d'huiles essentielles gagnent donc du terrain dans de nombreux domaines : agroalimentaire, cosmétique, phytothérapie, parfumerie...etc.

Caractérisé par une flore très riche, le bassin méditerranéen possède un nombre important de plantes à parfums aromatiques et médicinales à forte valeur ajoutée. En effet, le particularisme que possède la végétation méditerranéenne, entre autre le caractère de l'adaptation morpho-anatomique, lui confère une biodiversité exceptionnelle.

Connue comme le plus grand pays riverain de la Méditerranée. L'Algérie est reconnue par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. La richesse de la flore algérienne est donc incontestable, elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (FAO, 2012) [1]. Il faut toutefois rappeler que d'autres plantes, poussent un peu partout sur le sol algérien sans forcément être répertoriées, ou classées dans des zones géographiquement bien déterminées. Par exemple, celles qui poussent dans la péninsule de Collo, les monts de Tlemcen, la péninsule d'Arzew, le Cap Falcon, l'Ouarsenis, le Sersou, la région d'Aflou et le Djebel Aissa et/ou dans des domaines où terres privées à petites ou moyennes échelles, dans les zones steppiques et sahariennes et dans des terroirs où les plantes aromatiques et médicinales ne sont pas encore inventoriées [1].

Ainsi selon L'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie, « INRAA » dans son rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture en 2006, signale que sur les 1600 espèces spontanées utiles et cultivées, l'Algérie n'en utilise que 1 % [2].

En dépit de cette richesse floristique, la filière des plantes aromatiques et médicinales et de ses dérivés est peu développée en Algérie. En effet, il serait donc indispensable que le démarrage

d'une activité industrielle se fasse ; car selon le rapport de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature, 'UICN' et l'Agence Nationale pour la Conservation de la Nature, 'ANN' sur le Programme de la Biodiversité en Afrique du Nord [2], les chances de réussite d'une industrie de fabrication de médicaments à partir de plantes et leurs dérivés en Algérie existent et ceci grâce à l'abondance des plantes médicinales, à la diversité climatique, à l'existence d'une main d'œuvre et à l'expérience dans les domaines agronomique et artisanal.

Actuellement environ 25% des substances naturelles commercialisées sont d'origine végétale. Le nombre de plantes médicinales est estimé à environ 250 000 espèces, dont seulement quelques centaines ont fait l'objet d'une étude approfondie impliquant, la composition chimique et l'utilisation thérapeutique. Cependant, il reste toujours une grande quantité de molécules bioactives inconnues.

Depuis quelques années, la valorisation de ces plantes et de leurs dérivés (huiles essentielles, hydrolats) est devenue un facteur de développement économique d'un nombre important de pays émergents, il est donc nécessaire de suivre ce flot en s'appuyant sur des bases scientifiques qui peuvent apporter une contribution significative au développement de cette filière en Algérie.

2. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisaient au tant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Des hiéroglyphes égyptiens et des manuscrits chinois attestent que, dans l'antiquité, prêtres et alchimistes utilisaient des huiles essentielles à des fins thérapeutiques. Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante, de nouveaux composés, dans la recherche des molécules bioactives.

On appelle « huile essentielle » l'huile secrétée par la plante dont elle est extraite. Cette huile est dite « essentielle » au sens où elle constitue une substance aromatique naturelle qui est la « quintessence » de la plante. Une huile essentielle est un liquide concentré de composés aromatiques volatils extraits de matières premières végétales par différentes méthodes : entraînement par l'eau ou la vapeur d'eau, distillation sèche ou par des procédés mécaniques. Les huiles essentielles sont utilisées largement dans l'agroalimentaire et la parfumerie et, en plus petites quantités, dans le secteur des cosmétiques et dans celui de la santé, par exemple, dans des préparations pharmaceutiques, la phytothérapie et l'aromathérapie. L'industrie alimentaire consomme environ 60 % de la production des huiles essentielles et le reste est utilisé en parfumerie. Environ 300 huiles essentielles entrent couramment dans la fabrication des parfums et des arômes alimentaires, notamment les huiles essentielles de citron, de menthe poivrée et de romarin [3].

Selon les normes internationales, les huiles essentielles doivent être liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage, et de polarité moyenne. Ces mélanges complexes de diverses molécules (alcools, terpènes, cétones, aldéhydes, etc.), sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries. Elles sont également utilisées pour massage, inhalation ou ingestion. En industrie alimentaire, elles sont utilisées pour avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure, et pour réduire la prolifération des micro-organismes. Les huiles essentielles sont utilisées dans les aliments comme conservateurs antioxydant et antimicrobien.

3. Les hydrolats

L'hydrolat ou l'eau florale est l'eau distillée aqueux qui subsiste et que l'on sépare de l'huile essentielle après l'entraînement à la vapeur d'eau. Elle est plus ou moins aromatisée selon les plantes distillées car elle se charge de molécules aromatiques au cours de la distillation. La caractéristique principale de l'hydrolat c'est qu'il est produit uniquement au cours de la distillation et pourrait être décrit comme un distillat 100% non alcoolisé [4]. Les hydrolats contiennent, sous forme naturellement dissoute, certains composés aromatiques des huiles essentielles (moins de 5%), contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile.

Dans son ouvrage *Medical Aromatherapy*, le Dr Kurt Schnaubelt explique que l'hydrolat aromatique contient les composants hydrosolubles et volatils d'une plante qui lui donne souvent un parfum similaire mais moins intense à celui de l'huile essentielle, les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps quasi absents. La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles. Certains hydrolats présentent une plus grande proportion de molécules lipophiles comme ceux de *Mentha piperita* ou *Melissa officinalis* [5]. Sa composition plus riche en composants hydro-compatibles et privée de substances de types terpènes, diffère elle aussi, ce qui rend l'hydrolat très tolérable, anti-inflammatoire et antiseptique. L'utilisation des hydrolats s'est aujourd'hui répandue en aromathérapie. Certains sont utilisés comme toniques, ou dans le cas de l'hydrolat de l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*), comme antiseptique pour les pieds avant un massage aromathérapique [4].

Cependant, malgré cet engouement, les chercheurs ne s'y intéressent que très peu. Il existe donc un réel manque de données scientifiques traitant cet extrait naturel. Pourtant, la faible toxicité et la nature chimique des hydrolats en font un produit original, intéressant à étudier comme en rapportent les rares publications parues à ce sujet.

4. Intérêt économique

4.1. Les Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales

Utilisées en l'état frais ou séchées, à des fins culinaires ou thérapeutiques, les « PPAM » entrent en tant que composants dans la fabrication des cosmétiques, médicaments, en phytothérapie, ou autres produits de santé naturels, et sont aussi la base de produits transformés à haute valeur ajoutée comme: huiles essentielles, absolues, concrètes, extraits secs... La demande des «PPAM» et leurs dérivés pour l'agroalimentaire, la phytothérapie, les parfums et les produits cosmétiques naturels n'ont fait qu'augmenter. Ces «PPAM», dans les pays en voie de développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, n'ont pas cessé de jouer un rôle important dans leur pharmacopée traditionnelle et alimentaire. Durant ces dernières décennies les « PPAM » ont vu un regain d'intérêt ou leurs ventes ont augmenté entre 5 et 15%. L'Europe détient le plus grand marché, suivie par l'Asie, l'Amérique du Nord et le Japon. Les USA constituent le marché le plus grandissant. En effet le marché mondial des PPAM brutes (aucune transformation) est estimé à 64 milliards \$ avec plus de 35 000 plantes utilisées en industrie [6]. Pendant cette dernière décennie, la méfiance des consommateurs vis-à-vis des produits chimiques entraîne une croissance de ce marché (recherche de naturalité). Plusieurs secteurs d'activités sont concernés : (cosmétique, parfumerie, alimentaire, aromathérapie) par cette tendance. En 2012 les échanges mondiaux d'épices et d'aromates sont estimés à 450 000 tonnes par an, cette croissance s'accompagne avec de nouvelles tendances comme la prise en compte des problématiques du développement durable, bio équitable, la contractualisation et la relocalisation des productions. Le secteur de la cosmétique bio, à titre d'exemple, est en croissance de +25% de son chiffre d'affaires annuel en France, 450M€ en 2016 soit 3% du marché des cosmétiques [6]. Comme la demande de plantes médicinales est de plus en plus forte, tant en Asie du Sud que sur la scène internationale, on s'attend à ce que la valeur de ce commerce atteigne 5 billions US\$ d'ici à

4.2. Les Huiles Essentielles

Les pays en voie de développement dominent la production mondiale d'huiles essentielles, grâce à l'abondance des espèces nécessaires à la fabrication, aux avantages climatiques et au faible coût de la main d'œuvre. À titre d'exemple, les récoltes peu ou pas mécanisées, comme la rose

ou le jasmin, nécessitent une main d'œuvre importante dont les coûts sont nettement inférieurs dans les pays en développement. Ces derniers bénéficient en conséquence d'un avantage coût non négligeable sur les marchés internationaux et attirent les entreprises élaborant les arômes et les huiles essentielles. Cependant les pays industrialisés dominent lorsqu'il y a nécessité de haut rendement et de forte mécanisation comme par exemple la fabrication de lavandin en France. Les marchés importants des huiles essentielles sont localisés aux États-Unis, en Europe de l'Ouest, au Japon et au Canada. Les États-Unis possèdent un marché domestique important, mais étant donné les contraintes de coûts et de climat, la majeure partie des produits sont importés [7].

De nos jours, environ 150 huiles essentielles sont couramment commercialisées contre 300 il y'a 50 ans. La première huile essentielle mondiale en tonnage est l'huile essentielle d'orange, laquelle est un sous-produit de la production du jus d'orange puisqu'extraite de la peau d'orange par pression à froid. Elle est produite à hauteur de plus de 50 000 tonnes, principalement issue du Brésil et de la Floride (USA), représentant à eux deux près de 90 % du volume total commercialisé. Vient ensuite la menthe (*Mentha arvensis*) dont la production est estimée à 32 000 tonnes, puis les huiles essentielles d'eucalyptus (4 000 tonnes), et de menthe poivrée (3 300 tonnes) [8]. La production mondiale d'huiles essentielles a récemment été estimée à plus de 110 000 tonnes. Néanmoins, les trois huiles essentielles les plus vendues dans le monde représentent près de 90 % de ce volume total, avec deux grands groupes : les agrumes et les menthes, le Brésil est le premier producteur mondial d'huiles essentielles en termes de volumes, le deuxième étant vraisemblablement l'Inde pour sa production d'huile essentielle de menthe développée notamment au nord de Delhi. L'Inde a d'ailleurs repris le leadership de cette production au détriment de la Chine [8].

Toutes les huiles essentielles et les composantes chimiques qu'on y trouve naturellement sont dérivées de récoltes saisonnières et sont produites à travers le monde. Le climat, la géopolitique et les conditions du marché peuvent affecter le prix dramatiquement et provoquent parfois une grande volatilité. Certaines huiles essentielles peuvent être manufacturées pour certains composés aromatiques qui peuvent être isolés, alors que d'autres sont simplement conservées intactes et vendues comme un produit.

À l'égard de toutes les importations croissantes d'huiles essentielles et d'extraits de plantes en Algérie, il apparaît que la filière des huiles essentielles est peu développée malgré les fortes potentialités. Pour promouvoir ce secteur émergent et profiter des opportunités offertes, il est important d'engager cette filière dans la voie d'un développement durable qui veut concilier progrès économique, technologique, social et préservation de l'environnement.

5. Problématique de recherche

Cette thèse rentre dans le cadre d'un projet structurant porté par l'Université de Tlemcen en partenariat avec le groupement des entreprises, CONSORTIUM PPAM&HE ALGERIA, qui souhaite mettre en place une méthodologie de travail afin de caractériser les huiles essentielles algériennes présentant des compositions chimiques à forte valeur ajoutée. Pour se faire nous nous sommes donné comme objectif de mettre en place une méthodologie de recherche basée sur une sélection des espèces sur la base de leurs variabilités chimiques, leurs activités biologiques ainsi que l'intérêt économique porté sur chacune des huiles analysées, et cela afin d'aider le Consortium à structurer la filière des Huiles Essentielles en Algérie.

Les huiles essentielles sont des produits naturels à forte valeur ajoutée, elles sont utilisées, d'une part pour leurs propriétés odorantes, dans le secteur des cosmétiques et parfums, et d'autre part pour leurs propriétés médicinales. Les huiles essentielles sont d'une composition chimique très complexe; elles proposent parfois jusqu'à plusieurs centaines de molécules aromatiques actives, qui se trouvent en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées. Néanmoins, la diversification de la production d'huiles essentielles, ainsi que le contrôle de leur qualité, ne peuvent être envisagés que si la caractérisation de ces substances naturelles soit réalisée, et celle-ci passe par plusieurs étapes ; en commençant par la préparation de l'échantillon jusqu'à l'identification de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation. En effet, comme pour tous les produits naturels étant formés de mélanges généralement complexes, la composition d'une huile essentielle issue de deux plantes d'une même espèce botanique n'est pas constante, elle est dépendante de nombreux facteurs (pédoclimatique, agricole, extraction, cycle végétatif...etc.).

En se basant sur ce concept, nous avons pris pour but dans ce travail de thèse, d'étudier la variabilité chimique de certaines espèces communes à l'Algérie et dans le monde, afin d'établir des études comparatives, mais aussi des espèces endémiques de la région Ouest de l'Algérie, jamais décrites dans la littérature, afin d'identifier leurs compositions et de déceler toute spécificité pouvant caractériser leurs compositions chimiques. Pour ce faire, trois grands volets ont été développés : le principal volet est chimique, il concerne l'étude et la caractérisation de la composition chimique des volatils des plantes (huiles essentielles et hydrolats). Les deux autres volets sont totalement complémentaire étant donné qu'ils rentrent dans l'aspect pluridisciplinaire de la thèse : (i) un volet d'activités biologiques: il consiste à mettre en évidence les activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, insecticides et larvicides des huiles essentielles et hydrolats étudiés, (ii) un volet économique : ce volet est totalement complémentaire car il va non seu-

lement nous aider à sélectionner les meilleures compositions chimiques sur la base d'une étude du marché des huiles essentielles produites et commercialisées, mais aussi il va nous permettre de mettre en application des produits pouvant intéresser le monde industriel et ainsi apporter une plus-value à l'économie de notre pays.

Dans le volet chimique, le choix des plantes étudiées s'est effectué sur la base d'études comparatives de la composition chimique sur plusieurs rangs; ceci-dit une comparaison entre les espèces d'un même genre, les sous espèces d'une même espèce et entre les variétés d'une même espèce, et ainsi faire une comparaison entre les résultats obtenus et ceux rapportés dans la littérature. Pour cela nous avons choisi deux groupes de plantes: des plantes qui sont beaucoup étudiées que ce soit dans notre pays ou dans le monde et qui ont présenté des résultats très variés (cas des menthes et des thym), notre but était de faire une comparaison entre les résultats trouvés et la spécificité que peut représenter notre région. Le deuxième groupe est celui des plantes qui n'ont jamais fait l'objet d'études dans notre pays (thym, chrysanthème, inule et asteriscus) et peu ou pas étudiées dans le monde. L'intérêt de ce choix était non seulement de faire une comparaison entre les espèces, sous espèces et variétés mais aussi de pouvoir détecter de nouvelles compositions chimiques ou une originalité pouvant distinguer les espèces de notre région et intéresser le marché mondial des huiles essentielles. Cette approche a été réalisée, en optimisant tout autant l'étape de préparation de l'échantillon, qui est une étape déterminante pour que ce dernier soit représentatif des propriétés et de la composition chimique d'une huile essentielle, que l'étape de l'identification proprement dite, ainsi et pour mieux montrer la spécificité que peuvent avoir nos échantillons, nous avons développé une méthodologie de travail basée sur un échantillonnage rigoureux donnant la possibilité d'avoir des échantillons représentatifs des différents climats et régions de l'Ouest Algérien. L'identification de la composition chimique de ces huiles a été réalisée suivant la méthodologie d'analyse des huiles essentielles développée par le laboratoire CPN de Corse, et reproduite au sein du laboratoire COSNA de l'Université de Tlemcen. Les analyses ont été développées par une combinaison de techniques telle que la CPG et CPG/SM, la RMN, mais aussi le fractionnement et la purification sur Colonne Chromatographique (CC). À l'aide de l'outil statistique, nous avons développé des études de la variabilité chimique, permettant d'interpréter les différents résultats trouvés, pour chaque espèce et pouvoir ainsi mettre en place des études comparatives, que ce soit entre les échantillons d'une même espèce, entre les espèces d'un même genre, ou avec les résultats trouvés dans la littérature.

Dans le volet appliqué de notre travail, nous avons cherché à mettre en évidence les activités biologiques des matrices étudiées. En effet, les huiles essentielles contiennent des molécules

aromatiques actives, obtenus à partir de matières végétales (fleurs, feuilles, racines, écorces et graines). Cette richesse naturelle, donne un ensemble cohérent et une synergie très précise, c'est cette forme d'intelligence végétale tellement complexe qui nous intéresse pour étudier les propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes qu'elles possèdent, et qui sont actuellement considérées comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses, et aux agents chimiques de conservation des denrées alimentaires et produits cosmétiques.

Avec l'expansion du commerce des plats cuisinés, les services publics de santé autorisent l'ajout de plus en plus d'importants additifs alimentaires. Cependant, leur utilisation dans les formulations doit apporter une valeur ajoutée aux aliments sans être préjudiciable à la santé humaine [9]. Ainsi et afin d'utiliser les huiles essentielles en tant qu'antioxydant alimentaire, il convient d'évaluer l'efficacité antioxydante de ces dernières, afin de limiter leur ajout aux doses strictement indispensables aux objectifs de préservation à atteindre. Pour ce faire nous avons évalué ce pouvoir en utilisant trois différentes méthodes :

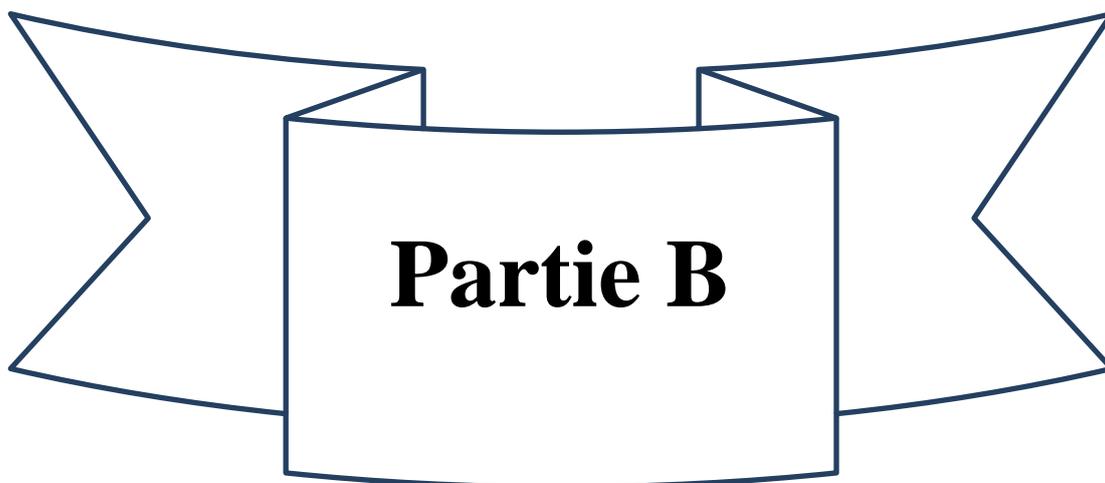
- La méthode de FRAP
- Le test du DPPH

Les huiles essentielles représentent une source de molécules qui peuvent être utilisées telles quelles, on peut donner comme exemple le cas du menthol que l'industrie consomme en grande quantité (en 2010, 12500 tonnes d'origine naturelle contre 6800 tonnes d'origine synthétique) [10], dans cette même optique et afin de mettre en évidence la relation structure-activité, nous avons évalué le pouvoir antioxydant des composés majoritaires purs qui caractérisent nos huiles essentielles. Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans base scientifique précise, aujourd'hui et face à la fulgurante progression des maladies dites « nosocomiales », les agents pathogènes évoluent au fil des générations, leurs gènes subissent des mutations et deviennent donc plus résistant et capable de survivre en échappant à toute tentative de lutte contre ces infections [11], c'est pour cette raison que leur emploi se fait sur des bases scientifiques et plusieurs recherches sont entamées pour étudier le pouvoir antimicrobien des plantes aromatiques. À notre tour, nous avons évalué l'activité antimicrobienne et antifongique de nos matrices volatiles (huiles essentielles, hydrolats et extraits d'hydrolats) sur onze souches de type gram+ et gram- et quatre souches nosocomiales. En industrie, les débouchés des huiles essentielles, outre leur utilisation en parfumerie (fine et fonctionnelle), sont divers. Elles sont largement utilisées en phytothérapie, aromathérapie, en cosmétique, dans l'industrie des arômes...etc., mais face aux exigences des industrielles,

et a ceux qui emploient les huiles essentielles, la demande d'une matière première de qualité constante, de la reproductibilité et de la fidélité du produit par rapport à une odeur définie pour la plante est de plus en plus demandée [12]. Partant de ce concept l'aspect économique que traite cette thèse vise à choisir les meilleures compositions chimiques ayant les meilleures activités biologiques afin qu'elles soient une base d'orientation vers les huiles essentielles qui peuvent intéresser le monde industriel. L'aspect économique de notre thèse vise aussi le secteur de l'agriculture, où l'utilisation des huiles essentielles est encore débutante mais est appelée à se développer. En effet, le regain d'intérêt pour l'utilisation et la consommation des produits « bio » et avec la volonté politique de réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires, le contexte réglementaire actuel incite fortement à développer ces produits d'origine naturelle comme alternative aux moyens de lutte chimique. En outre, la diversité de structure des mélanges complexes des extraits de plantes offre une diversité d'activités (antifongiques, insectifuges, photoprotectrices, phytotoxiques...etc.). Ces substances peuvent se substituer à des pesticides de synthèse et ainsi limiter leur utilisation, elles présentent en effet dans la plupart des cas un avantage en matière de durée de demi-vie assez courte ce qui limite les résidus dans les denrées alimentaires et leur persistance dans l'environnement. Leur utilisation est de plus intéressante dans le cadre de la gestion des résistances car leur mode d'action sont généralement différents de ceux des pesticides de synthèse. Ces éléments qui sont exclusivement issues de production biologique, rentrent dans la thématique du bio-contrôle qui regroupe des moyens de protection de plantes et des cultures qui privilégient la mise en œuvre de mécanismes biologiques régissant les interactions entre les végétaux et les organismes vivants dans l'environnement naturel. À titre d'exemple, en France, les produits de bio-contrôle n'occupent "encore" qu'une portion modeste du marché phytos, avec 5 % de parts de marché d'une valeur de 100 millions € en 2013 mais ce chiffre risque de ne pas en rester là, avec l'objectif d'atteindre, d'ici 2018, 15 % de la parts du marché français des phytosanitaires [13]. En Algérie le concept des produits Bio, commence à trouver sa place et des demandes de plus en plus persistantes sont enregistrées. Les sociétés intéressées par ce concept intègrent de plus en plus le marché des produits Bio, on peut citer dans ce sens le cas de la société BIOSOURCE, membre du CONSORTIUM PPAM&HE ALGERIA.

Par ailleurs cette grande ampleur que prennent les produits bio a conduit les scientifiques à s'intéresser aux huiles essentielles qui sont actuellement testées sur différentes cibles : les insectes, les champignons, les bactéries, les adventices et également pour la conservation des semences. Afin de mettre en application cette approche nous avons testé les huiles essentielles des différentes espèces étudiées dans cette thèse sur quatre souches infectant les champs agricoles spécialement les arbres fruitiers.

Dans ce manuscrit de thèse, après ce passage consacré à l'introduction générale de notre travail ainsi que la problématique de recherche dans cette partie **A**, nous nous proposons dans la partie **B**, une étude bibliographique des différentes espèces, puis dans la partie **C**, une présentation de la méthodologie d'analyse des mélanges complexes des volatils des plantes. La partie **D** sera consacrée aux résultats les plus pertinents des analyses des compositions chimiques des volatils de nos plantes (huiles essentielles, hydrolats, extraits d'hydrolats), et ensuite nous proposerons dans la partie **E**, les résultats des activités biologiques obtenues. Enfin une discussion de l'intérêt économique de nos huiles et leurs plus-values sur l'économie de notre pays sera présentée dans la partie **F**.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Famille des Lamiacées

Les Labiées ou Lamiacées regroupent des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres [14]. Abondantes dans la région méditerranéenne dont 146 espèces en Algérie [15], nombreuses sont regroupées sous le nom d'herbes aromatiques. Dans cette famille, un même nom vernaculaire fait souvent référence à un très grand nombre d'espèces appartenant toutes au même genre, comme par exemple pour les menthes, les lavandes, et les basilics [9]. La famille des Lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [16]. Les huiles essentielles caractérisent cette famille. Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridoïdes glycosylés et composés phénoliques [17]. Cette famille est une importante source d'huiles essentielles, utilisées en aromathérapie, et en parfumerie, même si les parfums de synthèse tendent à remplacer ces essences, la parfumerie de luxe continue à utiliser ces plantes en les distillant, afin d'en extraire le précieux parfum qu'elles contiennent et de perdurer la qualité de ses produits. L'industrie des cosmétiques utilise également les Lamiacées pour leurs propriétés hydratantes et souvent antiseptiques [18].

1.1. Genre *Mentha*

Certains produits, pour être utilisés dans l'industrie notamment l'industrie aromatique, doivent être optiquement purs. Les produits de synthèse sont souvent des racémiques, si non la technologie de leur préparation est compliquée et le coût est élevé. Par contre les produits naturels sont souvent optiquement purs ou au moins avec un excès énantiomérique important. Ils sont recherchés entre autres pour cette qualité [19]. Les menthes font parties de ce cortège de substances, ce sont des plantes appartenant à la famille des Labiées (*Lamiaceae*). Au sein de cette famille, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate. La menthe est une plante herbacée vivace, dicotylédone et gamétopétale, susceptible de se reproduire par des rhizomes, par marcottage ou par bouturage. Elle apprécie les situations fraîches, moyennement éclairées, des sols riches en éléments nutritifs, affectionnant un pH plutôt neutre [20], [21]. Il existe de très nombreuses variétés dont la « menthe verte » et la « menthe poivrée » sont les plus connues. La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents. Les huiles essentielles de menthes font parties des huiles les plus produites dans le monde dont la valeur commerciale s'élève à plus de 400 millions de \$US/an. Les États-Unis occupent une position dominante et

sont les plus gros producteurs d'huile essentielle de menthe, suivi par l'Inde et la Chine. Les menthes sont utilisées en médecine traditionnelle dans les pays producteurs [20].

L'industrie agroalimentaire est le principal consommateur : liquoristerie, confiserie ainsi que l'industrie des tabacs et la parfumerie. La valeur commerciale des huiles essentielles de menthes, leurs facilités de propagation et de clonage, a poussé les recherches vers une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des monoterpènes caractéristiques des menthes. Afin de répondre à cette forte demande, de nombreuses espèces font l'objet de mise en culture.

Nous citons dans notre travail, quatre des menthes les plus répandues, deux entre elles poussent à l'état spontané (*Mentha pulegium* et *Mentha rotundifolia*) et les deux autres (*Mentha spicata* et *Mentha pipérita*) sont cultivées.

1.1.1. *Mentha pulegium* (menthe pouliot)

Mentha pulegium (Linné, 1753). Appelée *Menthe pouliot*. Famille des Lamiacées (*Lamiaceae*) ou Labiées (*Labiatae*), vivace, pubescente, couchée, parfois dressée de petite taille à taille moyenne (10 à 30 cm de haut, 45 de large) radicante, généralement poilue, à tiges florifères dressées, fortement aromatique à odeur piquante avec des petites feuilles étroites elliptiques à ovales, à peine dentées, à pétiole court, souvent poilues au revers avec des bractées foliacées. Elle possède des fleurs lilas, de 4,5 à 6 mm de long, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, parfois rose et d'autres fois blanches échelonnées le long de la tige. Sa floraison étant de juillet à octobre [22]. *M. pulegium*, très répandue dans l'aire méditerranéenne, est connue sous le nom de *Fliou* en berbère. Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelle pour la sphère respiratoire (tropisme sphère rhinopharyngée et les poumons), contre les bronchites, les rhumes et les sinusites (en nettoyant toute la sphère digestive), ainsi que contre les troubles digestifs et l'insuffisance biliaire [23].



Figure 1 : Représentation schématique et en photo de *Mentha pulegium*

Elle est toxique à forte dose et peut provoquer l'avortement. cette plante a aussi la particularité d'être insecticide puisqu'elle a été déjà utilisée pour faire éloigner les insectes [22]. L'huile essentielle de la menthe pouliot est utilisée traditionnellement en phytothérapie pour aider à la digestion et à soulager la dyspepsie flatulente et les coliques intestinaux, et aussi pour les inflammations aiguës ou chroniques des muqueuses avec hypersécrétion des glandes de la région enflammée.

Plusieurs travaux ont rapporté la composition chimique des huiles essentielles de *M. pulegium* dans différentes régions du monde, ou elle a été caractérisée par la présence majoritaire du pulégone (58-90%) [23]–[32], dans la plupart des études à l'exception de deux études qui ont rapporté la présence de la pipériténone (97,2%) et la pipéritone (70%) [33], [34]. La littérature rapporte aussi les différentes activités biologiques faites sur cette espèce.

1.1.2. *Mentha rotundifolia* (menthe des champs)

La menthe à feuilles rondes ou *Mentha rotundifolia* est une plante vivace, que l'on trouve fréquemment au bord des chemins, dans les fossés ou autres lieux humides ; elle appartient à la famille des labiées. Elle ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes, épaisses et ridées avec des tiges, typiques des labiées, est à section carrée. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher ; comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme. Les petites fleurs sont rassemblées en épis terminant les rameaux. La hauteur de la plante est de 25 à 80 cm, avec une fleur de 5 mm de long. La floraison est de juillet à septembre [35]. Les menthes s'hybrident avec une grande facilité, de nombreux hybrides sont créés en horticulture [12]. *Mentha rotundifolia*, dont le nom vernaculaire est *Timarssat* en berbère ou *Domrane* en arabe, est un hybride de *Mentha longifolia* et de *Mentha suaveolens* [36], alors que d'autres références disent que *Mentha rotundifolia* et *Mentha suaveolens* correspondent à la même espèce [37].



Figure 2 : Représentation schématique et en photo de *Mentha rotundifolia*

Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle des pays du Maghreb pour ces propriétés : digestive, antiseptique, expectorante, antispasmodique et tonique en hiver, elle est aussi utilisée pour calmer les douleurs rhumatismales et des piqûres d'insectes.

L'huile essentielle de cette plante est utilisée pour calmer les palpitations cardiaques (quelques gouttes d'huile essentielle avec eau chaude).

Sur le plan économique l'huile essentielle de cette plante n'apparaît pas sur le marché mondial des huiles essentielles, ou la plante est seulement vendue en vrac.

Comparée à d'autres espèces de menthes, *Mentha rotundifolia* n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études, en effet ça a été démontré que ces huiles sont caractérisées par une forte variabilité chimique, ou les composés majoritaires changent radicalement d'un pays à un autre, voir même au sein d'un même pays. En somme les composés majoritaires qui caractérisent ces huiles sont : la pulégone, le menthol, l'oxyde de pipériténone et la carvone [31], [37]–[47].

1.1.3. *Mentha pipérита* (la menthe poivrée)

Mentha pipérита de non vulgaire (*Naânaâ ftour*) a été reconnue et décrite en 1696, aux environs de Londres à Mitcham, où cet hybride est apparu, d'où son deuxième nom : menthe anglaise. Cultivée elle est rarement rencontrée à l'état spontané [48].



Figure 3 : Représentation schématique et en photo de *Mentha pipérита*

La menthe poivrée est inscrite à la 10^{ème} édition de la pharmacopée française, elle est un hybride entre la menthe aquatique (*Mentha aquatica*) et *Mentha spicata*, rare en Algérie, seulement cultivée [49]. La menthe poivrée est une plante indigène cultivée de la famille des Labiées, herbacée à végétation vigoureuse, son odeur pénétrante spéciale et une saveur aromatique, brûlante mais laisse une sensation de fraîcheur [21]. C'est une herbe annuelle, semblant pérenne en se reproduisant à partir de nombreux stolons, traçants, rampant, chevelu, aériens ou souterrains, à

racines adventives [49]. *Mentha piperita* est caractérisée par des tiges quadrangulaires le plus souvent violacées [50]. L'huile essentielle de cette plante est utilisée, diluée, en inhalation ou pour des massages légers sur la poitrine, ou en cas d'identifications bronchiques. La plante entière est efficace en cas de gastroentérites [28]. *M. piperita* donne l'huile essentielle de « peppermint » ou il a été démontré par les études faites qu'elle est composée de menthol, du menthone et d'acétate de menthyle [52]–[58]. Sur le plan économique l'huile essentielle de *M. piperita*, est la troisième saveur la plus importante dans le monde avec une production mondiale de 4000 tonnes/année [59].

1.1.4. *Mentha spicata* (menthe verte)

Les origines de *Mentha spicata* sont incertaines. Selon certains botanistes, elle serait le résultat d'une hybridation très ancienne entre *Mentha rotundifolia* et *Mentha longifolia*. Il semblerait que la menthe verte soit originaire de l'Amérique du nord [60].



Figure 4 : Représentation schématique et en photo de *Mentha spicata*

La menthe verte a pour nom latin *Mentha spicata* Huds ou *M. viridis* L., et de nom vulgaire (*Naânaâ*). C'est une plante vivace, robuste, de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave très pénétrante. Les feuilles sont opposées persistantes, sessiles, lancéolées-aiguës, dentées en scie, vertes sur les 2 faces, glabres ou presque glabres. Les fleurs poussent en grappe à l'aisselle de la feuille. La fleur présente une bractée qui dépasse les pièces florales.

La Menthe verte est réputée pour soigner de nombreux troubles dont les plus courants : affections dermatologiques, troubles digestifs variés, spasmes du colon, colites, troubles fonctionnels digestifs d'origine hépatique, rhume, nez bouché, affections de la bouche et de l'oropharynx et bien plus encore. La menthe verte est aussi utilisée en agroalimentaire dans différents produits

du quotidien, comme par exemple les chocolats à la menthe, les dentifrices et lotions pour bain de bouche, ou encore dans certaines liqueurs. On l'utilise principalement car elle contient du menthol qui donne une sensation de fraîcheur [60].

De nombreux travaux ont fait l'objet d'étude de l'huile essentielle de *M. spicata* ou leurs compositions chimiques étaient dominées par la présence de la carvone (> 50%) [65]–[75], dans la majorité des études à l'exception de quelques travaux qui étaient marqués par la présence du menthol, pulégone et menthone [61]–[64].

1.2. Genre *Thymus*

L'utilisation du thym dans la vie humaine date depuis très longtemps, il était dédié à Vénus parce qu'il apportait de l'énergie vitale pour le corps. Aetius, est un célèbre médecin grec du V siècle, recommandait le thym pour les sciaticques, les douleurs des reins et de la vessie, la colite et les ballonnements, pour les mélancoliques et ceux qui un esprit troublé [65]. Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées [66]. Selon Dob et al. [67], il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. Les thym (Thymus) sont des plantes basses sous-ligneuses, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont re-couvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose [68]. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Algérie, Maroc, Tunisie, et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Éthiopie et d'Arabie du sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Égypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya. Selon une étude menée par Nickavar et al, (2005) [69], environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela qu'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre. En Algérie, il est représenté par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination. Citant ainsi quelques espèces connues en Algérie : *T. capitatus*, *T. commutatus*, *T. ciliatus*, *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. algeriensis*, *T. hirtus* et *T. fontanésii* [70]. Toutes les espèces du genre *Thymus* produisent des huiles essentielles, et plusieurs d'entre elles sont utilisées en gastronomie dans toutes les parties du monde. À ce jour, les huiles de 162 taxons du genre *Thymus* ont été étudiées chimiquement révélant au total environ 360 composés volatils et un large polymorphisme de l'huile essentielle [71]. Sur le plan économique l'huile essentielle de thym est considérée parmi les huiles qui sont très demandées sur le marché mondial, spécialement celles à chémotype thymol.

1.2.1. *Thymus ciliatus*

Thymus ciliatus (Desf.) Benth, est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Les épis florifères sont larges de 16-20 mm. Les fleurs sont plus grandes a corolle plus longuement exserte, rencontrée dans les broussailles, ma-torrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés, cette plante endé-mique sur le nord de l'Algérie et connue sous le nom « Djertil » comprend trois sous-espèces: la ssp. *eu-ciliatus* Maire, la ssp. *coloratus* (Boiss et Reut.) Batt. et la ssp. *munbyanus* (Boiss et Reut.) Batt. [70]. La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* a fait l'objet de huit publications, ou ces dernières étaient caractérisées par la présence majoritaire du thymol ou du carvacrol [72]–[79].



Figure 5 : Représentation schématique et en photo de *Thymus ciliatus*

1.2.1.1. *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus*

Thymus ciliatus ssp *eu-ciliatus* est un arbrisseau de petite taille avec des fleurs très grandes, rouges ou violacées, dépassant 1cm de long. Les feuilles sont linéaires ciliées sur les marges, les florales largement ovales, vertes. Rencontré dans les broussailles et les pelouses, cette plante est commune dans toute l'Algérie [70]. Cette herbe aromatique est utilisée dans la médecine populaire pour son effet anti-spasmodique, diaphorétique et stimulant. Une seule étude de la composition chimique de cette sous espèce a été réalisée, elle a révélé la présence du carvacrol comme composé majoritaire [71].



Figure 6 : Photo de *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus*

1.2.1.2. *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*

Appelée aussi *Tymus coloratus*, la ssp *coloratus* est une plante aromatique endémique qui se trouve à l'état spontané sous forme d'un sous-arbrisseau très ramifié à la base et très feuillu présentant un polymorphisme remarquable et pouvant atteindre 40 centimètres de hauteur [80]. Elle est constituée de petites feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Cette espèce pousse autour du bassin méditerranéen et dans le Nord de l'Algérie [70]. Elle est rencontrée dans les pelouses, les rocailles et dans toutes les régions montagneuses [81]. Les études de la composition chimique de l'huile essentielle faites sur cette sous espèces ont démontré la présence du bornéol (44.8%), et du thymol (33.39%), comme composés majoritaires dans cette huile [82], [83].



Figure 7 : Photo de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*

1.2.1.3. *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus*

Appelée aussi *T. munbyanus*, la différence que présente la sous espèces *Munbyanus* par rapport aux autres sous espèces c'est qu'elle est caractérisée par des feuilles florales vertes [70]. Dans la médecine traditionnelle, *T. munbyanus* est utilisée comme un remède contre la toux, le rhume,

la grippe et dépuratif. Elle est également utilisée pour traiter les maux de gorge, les ballonnements abdominaux et les maladies du système endocrinien[83]. Toutes les études qui ont traité de la composition chimique de l'huile essentielle de *T. munbyanus* ont été caractérisées par la présence majoritaire des deux chémotypes thymol et carvacrol [84]–[87].



Figure 8 : Photo de *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus*

1.2.2. *Thymus inodorus* (*Micromeria inodora*)

Classée définitivement comme une espèce à part et appelée *Micromeria inodora*, elle vient d'être introduite dans le genre *Micromeria* Benth., qui appartient à la famille des *Lamiaceae* et contient environ 70 espèces avec une gamme de distribution s'étendant de la région himalayenne à l'archipel macaronésien (avec Madère, le Cap-Vert et les îles Canaries) et de la Méditerranée à l'Afrique du Sud et à Madagascar [88], [89].

En Algérie, on révèle la présence de quatre espèces de *Micromeria* : *M. fontanessi*, *M. pulmosa*, *M. nervosa*, et *M. inodora* « *M. inodora* (Desf.) Benth. (= *Satureja fontanesii* Briq. = *Micromeria barceloi* Willk. = *Satureja barceloi* (Willk. Pau) = *Thymus inodorus* (Desf.) ». D'autre part, une étude récente fondée par Jean-Paul Peltier [90], qui concerne la biodiversité végétale du sud-ouest marocain à révéler l'existence de cinq espèces de *Micromeria* endémique du Maroc et de l'Algérie : *M. arganietorum*, *M. debilis*, *M. hochereutineri*, *M. macrosiphon*, et *M. monantha*. Deux autres espèces ont été identifiées par J.A. Battandier (1897) [91], il s'agit de *M. microphyla* et *M. graeca*. Au total onze espèces de *Micromeria* ont été recensées sur le territoire algérien.

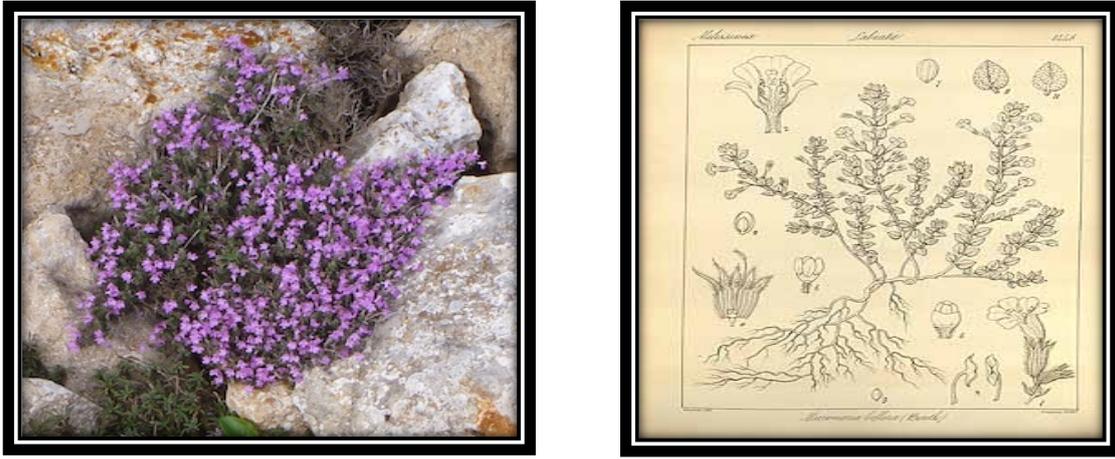


Figure 9: Représentation schématique et en photo de *Micromeria inodora*

Micromeria inodora (Deaf.) Benth., est une plante inodore qui s'étend sur les rochers calcinés, elle est connue par la population ancienne sous le nom de «*Tazir ahmeur*» en berbère ou «*Zaeter el Hamir* » en arabe. C'est un sous-arbrisseau éricoïde à tiges dressées très ramifiées, de 10-50 cm. Calice glabrescent de 4 mm. Corolle rose foncé, grande (10-12 mm) à lèvre inférieure large de 6-7 mm. L'espèce est localisée en particulier, sur le littoral ouest-méditerranéen, spécialement le sud de l'Espagne, l'ouest de l'Algérie, le Maroc et les îles Baléares. À Tlemcen *M. inodora* est identifiée tout le long du littoral du Marsa Ben M'Hidi jusqu'à Rechgoun [92]. Les espèces du genre *Micromeria* sont généralement consommées comme tisane et à des fins médicinales populaires contre les rhumes. Elles sont également utilisées contre les troubles cardiaques, les maux de tête, les plaies et les infections cutanées [93]–[95]. À la suite d'études récentes, il a été démontré que les huiles essentielles des espèces du genre *Micromeria* présentent des activités biologiques antimicrobiennes [94], [96], [97], antibactériennes et antioxydantes [98]. Sur le plan chimique les huiles essentielles de la plupart des espèces du genre *Micromeria* ont été caractérisées par l'abondance des monoterpènes oxygénés tel que : la pipéritone, la pipériténone, l'oxyde de pipéritone, le linalol, le thymol, le limonène, la verbénone, l' α -pinène le camphène la pulégone et le bornéol [99], [100].

Il est à noter que l'huile essentielle de l'espèce *M. inodora* n'a jamais été décrite dans la littérature.

2. Famille des Astéracées

Les astéracées (famille des composés), est la répartition cosmopolite la plus importante des angiospermes, la plus distribuées, et la plus large, elle contient environ 13 tribus [101], 1600 genres et 25000 espèces [2]. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces [70]. Une des propriétés typique de la famille des composés et sa richesse, en composés naturels divers, on y trouve en effet, des terpénoïdes divers, des flavones, des flavonols et des alcaloïdes [14]. Dès 1964, Ha-

gnaur démontra que l'étude taxonomique de cette famille est basée sur ses caractères phytochimiques [101]. Une étude faite sur des espèces de cette famille a montré qu'elle est largement utilisée en médecine traditionnelle et phytothérapie [102]. Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: Laitues (*Lactuca*), Endives, Chicorée (*Cichorium*), artichauts (*Cynara*), salsifis (*Tragopogon*). Le tournesol (*Heliantus annuus*) est cultivé pour son huile riche en acide gras. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie : Le Semencontra (*Artemisia cina* Berge), l'Arnica (*Arnica montana* L.), la Chamomille (*matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antenaria dioica* gartn) [103] [104]...etc. Plusieurs molécules isolées ces dernières années de divers astéracées montrent des potentialités pharmacologiques intéressantes, deux seulement sont actuellement produites industriellement, l'artémisinine et la silymarine. L'artémisimine, extraite d'*Artémisia annua* L, est une lactone sesquiterpénique employée, ainsi que ses dérivés hémi synthétique dans le traitement de certaines formes de paludisme. D'autre astéracées sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de forme galénique simple (arnica, artichauts, piloselle, etc...) [105].

2.1. Genre *chrysanthemum*

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille des composées (Astéracées), sous famille tubiflore et tribu anthémideae, il comprend environ 300 espèces, distribuées dans deux centres principaux, l'un dans la région méditerranéenne, l'autre en Chine et au Japon [106]. Le genre chrysanthème est largement répandu dans le monde entier à cause de ses propriétés ornementales et cosmopolites. Ses espèces sont souvent cultivées dans les jardins pour leurs qualités décoratives en variétés de couleurs. L'origine géographique du genre *Chrysanthemum* est imputée à l'Europe et l'Asie mais celui-ci est également largement distribué en Afrique [107].

En Algérie, le genre comprend 20 espèces avec 8 endémiques [108]. Les deux mot grecs, dont dérive le nom générique « Krusos » : or et « anthemon »: fleur, font allusion à la couleur souvent éclatante des chrysanthèmes spontanés [109]. Utilisé depuis longtemps dans la médecine populaire, Le chrysanthème est connu comme une plante efficace possédant de nombreuses vertus médicinales. Parmi ses diverses propriétés, le chrysanthème est utilisé pour traiter les infections, les problèmes oculaires, pour abaisser la pression artérielle, les maux de tête et les rhumes. Une infusion chaude de fleurs de chrysanthème peut être utile pour soulager la fatigue oculaire, une vision floue et les yeux secs. Les fleurs de thé chrysanthème étaient utilisées pour soulager le corps de l'accumulation de l'excès de toxines dans le sang [110]. Les chrysanthèmes sont cultivés depuis fort longtemps, notamment en Chine ou on les connaît depuis trois siècles avant J.-C. De nos jours, on peut trouver de nombreux cultivars de Chrysanthème [111].

2.1.1. *Chrysanthemum coronarium*

Les Anthemideae est une tribu importante de la famille Asteraceae, il comprend 12 sous-tribus, 108 genres et 1741 espèces. *Chrysanthemum coronarium* L., qui appartient à cette tribu, a suivi la taxonomie actuelle qui a entraîné de nombreux bouleversements. En effet Le Chrysanthème à couronne: *Chrysanthemum coronarium*, a été transféré dans le genre *Glebionis*, créé en 1826 par Alexandre de Cassini, devenu *Glebionis coronaria*, mais ce nom générique a été récemment revenu en utilisation après la conservation de *Chrysanthemum* [112].



Figure 10: Représentation schématique et en photo de *chrysanthemum coronarium*

C'est une plante annuelle, de nom vernaculaire arabe « *Mourara* » ou « *Rezaima* » et nom vernaculaire français « Chrysanthème des jardins ». Elle croit dans les terrains cultivés, les friches et elle est aussi commune dans le Tell, sa période de floraison est du mois de février jusqu'à le mois de Juin [70]. Cette espèce est largement distribuée dans la région Méditerranéenne, l'ouest de l'Afrique et en Asie [113]. C'est une plante non visqueuse, à ligules entièrement ou seulement partiellement jaunes, avec un akène du rayon triquètres aux trois arêtes ailées; ceux du disque ailés sur un côté. Les feuilles sont bipinnatifides, les inférieures pétiolées, les supérieures auriculées-embranchées. La plante est glabre, puissante, à gros capitules avec des bractées de l'involucre largement scarieuses [70]. Il existe deux variétés de l'espèce *Chrysanthemum coronarium* : la différence entre eux est que la variété *coronarium* est caractérisée par des fleurs uniformément jaunes [114], et la variété *discolor* par des fleurs périphériques à ligules blanchâtres à base jaune [109]. *Chrysanthemum coronarium* est fréquemment utilisée dans l'industrie alimentaire dans les pays asiatiques, comme le Japon et la Chine, comme antioxydant, antibactérien et additif alimentaire antifongique [115]. En Jordanie, les fleurs de la plante sont utilisées comme pansements pour les maladies dermiques et comme vermifuge [116].

Les composés volatils issus de *C. coronarium*, ont fait l'objet de plusieurs travaux, mais seule la variété *coronarium* a été citée. Les composés majoritaires qui ont caractérisé l'huile essentielle

de cette espèce étaient : le camphre (15.7-29.2%), l' α -pinène (15-38.6%), le myrcène (31.9-36.7%), et l' α -humulène (25.5-26.8%) [115], [117]–[122]. L'huile essentielle de cette espèce présente des propriétés insecticides contre les ravageurs des produits alimentaires stockés [123]. Ainsi Plusieurs études ont rapporté les activités : antioxydante, antibactérienne et antiproliférative [116], [124]–[127] de l'huile essentielle de *C. coronarium* var *coronarium*. Il est a noté qu'aucune référence bibliographique ne traite de la composition chimique de l'huile essentielle de la variété discolor.

2.2. Genre *Inula*

Le genre *Inula* appartient à la famille des Astéracées, il comprend une variété d'environ 90 espèces qui sont largement distribuées dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, Italie, France, Grèce ...) [128], en Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie...), et en Asie (Chine, Japon...). Ce sont des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternes, capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées, bractées en plusieurs séries de fleurs à périphériques pistillées, à ligules tridentées, anthères sagittées à la base, à chaînes munies de côtes, aigrettes simples. On les trouve dans les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau et de routes. La médecine traditionnelle a attribué de nombreuses propriétés thérapeutiques aux espèces du genre *Inula* : antiseptiques, antibiotiques, antispasmodiques, anti-inflammatoires, anti-diabétiques, laxative et vulnéraire [129], [130]. Le genre *Inula* est largement réparti dans toute l'Algérie, Quezel et Santa ont révélé la présence de cinq espèces endémique a l'Algérie : *I. graveolens* (L.) Desf., *I. viscosa* (L.) Ait., *I. crithmoides* L., *I. squarrosa* (L.) Bernh. et *I. montana*.

2.2.1. *Inula viscosa*

Inula viscosa=*Dittrichia viscosa* connue sous le nom vernaculaire *magramane* [131], est une plante glanduleuse visqueuse, à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées. Elle est vivace à tige frutescente à la base et de 40-100 cm, à rameaux rougeâtres. Ces feuilles sont entières ou dentées, aiguës, sinuées; les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées. Bractées externes de l'involucre scarieuses de même que les internes [70]. Caractérisée par des fleurs jaunes, cette plante est largement répartition et croit spontanément dans le nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen, les rocailles, carigues les terrains argileux un peu humides, et les bords des routes. On la trouve aussi dans les côtes sud de l'Europe (France, Espagne, Grèce, Italie, Bulgarie et Turquie), le Moyen-Orient (Palestine, Jordanie et Syrie) ainsi que l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Egypte et Libye). Sa floraison commence à partir du mois de Septembre jusqu'au mois de Novembre (selon les lieux).

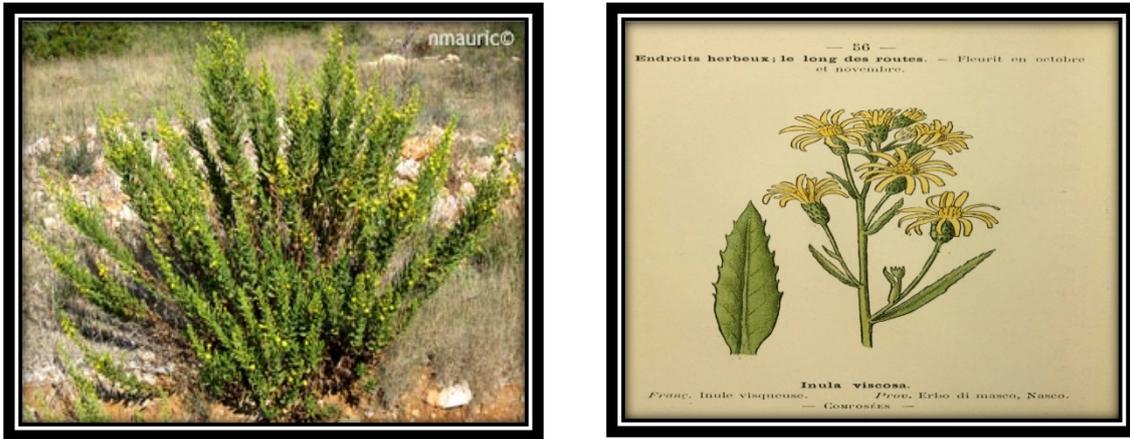


Figure 11: Représentation schématique et en photo de *Inula viscosa*

L'histoire thérapeutique de l'inule visqueuse est très diversifiée et connue depuis longtemps par les guérisseurs. Il a été rapporté qu'elle est utilisée en Italie comme : antipyrétiques, antiphlogistiques et antiseptiques [132]. La partie aérienne de cette plante est utilisée en décoction pour le traitement de la pression artérielle et le diabète, ces feuilles sont utilisées en Maroc en cataplasme pour traiter les abcès, la gale, dermatoses, les ulcères...etc. [133]. En Algérie, l'Inule est utilisée dans la médecine populaire comme antipyrétique en tisanes ou en cataplasme contre les maux de tête et les infections pulmonaires.

La littérature a rapporté l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *I. viscosa* de sept pays où la prédominance des sesquiterpènes oxygénés a été bien marquée : fokiénol (11.8- 38.8%), globulol (15.0%), et trans-nérolidol (8%) [134]–[138]. Plusieurs travaux ont montré le pouvoir antibactérien, antifongique et anti acétylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes de *I. viscosa* [135], [139], [140].

2.2.2. *Inula montana*

L'inule des montagnes de nom commun « *boutlilis* » est une plante à tiges blanchâtres laineuse qui pousse dans les pentes rocailleuses arides des montagnes dépassant les 500m de hauteur ces tiges sont simple, de 15-35 cm. Ces feuilles caulinaires sont toutes simplement rétrécies à la base soyeuses et blanchâtres en dessous, pubescentes en dessus; les inférieures atténuées en pétiole. Ces gros capitules de 4-5 cm à grandes ligules jaunes et linéaires sont solitaires au sommet de la tige [70]. C'est une plante commune en Europe du Sud (France, Espagne, et Italie) et en Afrique du Nord. Elle est parfois appelée "Arnica" en France et utilisée dans la médecine populaire pour son activité vulnéraire [141]. Sa floraison va du mois de mai jusqu'à juillet. *I. montana* est assez commune dans toute l'Algérie et elle est utilisée en médecine traditionnelle pour ces vertus apaisantes et cicatrisantes [70].



Figure 12: Représentation schématique et en photo de *Inula montana*

Il est à noter qu'aucune référence bibliographique ne traite de la composition chimique de l'huile essentielle de *Inula montana*.

2.3. Genre *Asteriscus*

Asteriscus est un genre appartenant au groupe *Inula* d'Asteraceae-Inuleae. Ce genre et les deux autres de la même tribu (*Ighermia* et *Pallenis*) contiennent un total de 15 espèces qui se développent sauvagement dans une variété d'habitats côtiers et désertiques à travers la Méditerranée et le Moyen-Orient [142], [143]. Bien que la plupart des espèces soient endémiques à la région macaronésienne, six espèces sont décrites en Algérie [70]: *A. aquaticus*, *A. maritimus*, *A. pygmaeus*, *A. graveolens* et *Asteriscus spinosus* communément appelé *Pallenis spinosa*. Les espèces de ce genre sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour : le traitement des coliques et des gastralgies, la fièvre, les déséquilibres des tractus gastro-intestinaux, les douleurs céphaliques, la bronchite et comme anti-inflammatoire [144].

2.3.1. *Asteriscus maritimus* (*pallenis maritima*)

Asteriscus maritimus=*Pallenis maritima* (L.) connue en Algérie sous le nom « *kerkeba* » est une espèce qui appartient à la famille des Astéracées, elle est commune dans les zones rocheuses de la partie occidentale du bassin méditerranéen, dans le sud du Portugal ainsi que dans l'ouest et le sud de la Grèce [145]. Sa période de floraison est de avril jusqu'à septembre, c'est une Plante de 5-30 cm, très variable, à souche ligneuse a tiges feuillées, rameuses, en général ascendantes puis dressées, dichotomes. Ces feuilles sont épaisses, entières, pubescentes ou même très velues, spatulées, atténuées en pétiole, obtuses, tronquées ou rétuses [70]. En 1932, un important traité sur la famille des Astéracées a été publié où la plante fut renommée *Asteriscus maritimus* par l'allemand Christian Friedrich Lessing (1809-1862), puis dernièrement en 2011, le botaniste suisse

Werner Rodolfo Greuter a publié un autre traité où il lui a attribué son nom actuel *Pallenis maritima* [146].



Figure 13: Représentation schématique et en photo de *Asteriscus maritimus*

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'*A. maritimus* provenant de la Tunisie, l'Espagne, et l'Italie [143], [145], [147], [148], a révélé la présence de : l' α -pinène (27.5%), le β -eudesmol (24.25%), l'acide hexadécanoïque (30.35%), le β -phellandrene (11.8%) et l'acétate de myrtényle (44.2 %) comme composés majoritaires. En effet la présence d'acétate de myrtényle (44,2%) comme composant principal ainsi que de terpinène-4-ol (4,5%) et de terphényle (17,5%) dans l'huile essentielle de l'échantillon provenant de l'Italie, a été associée à l'activité insecticide de l'huile contre les larves de la chair et les insectes. Également la littérature a rapporté l'étude des activités antibactérienne, antifongique et anti-acétylcholinestérase de l'huile essentielle d'*A. maritimus* de la Tunisie. Il est à noter qu'aucune étude n'a rapporté la composition chimique de l'huile essentielle de cette plante en Algérie.

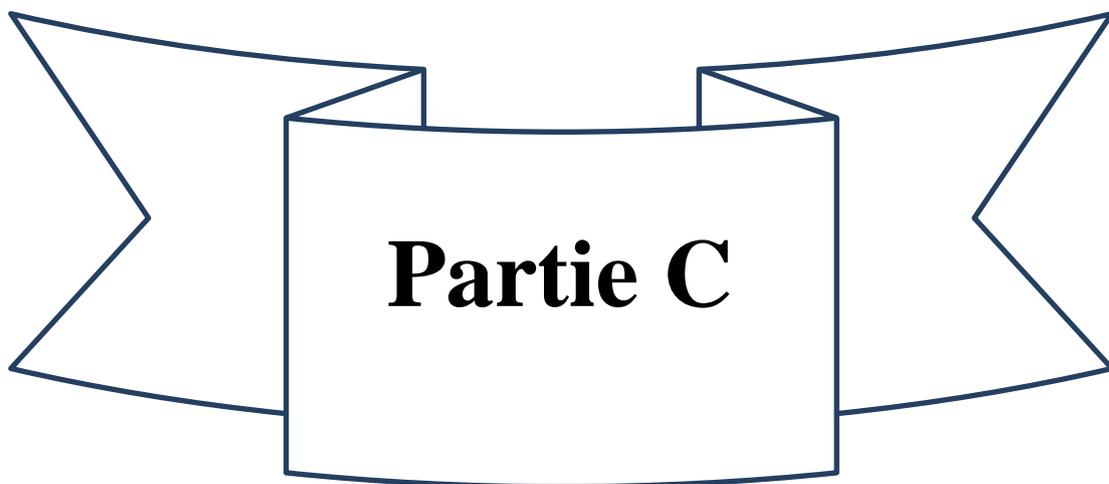
2.3.2. *Asteriscus spinosus* : (*pallenis spinosa*)

Pallenis spinosa = *Asteriscus spinosus* (L.) est une espèce qui appartient à la famille des Astéracées, de la tribu *Inulea*. connue en Algérie sous le nom vulgaire « *Noug* » ou « *Rebian* », cette espèce est commune dans tout le bassin méditerranéen, le moyen orient [149], et l'Europe [70]. *A. spinosus* est une herbacée annuelle ou bisannuelle mesurant environ 50 cm de hauteur. Tiges et feuilles sont recouvertes de poils raides, les tiges sont souvent rouge sombre. L'involucre comporte des bractées externes très longues, dépassant largement les ligules et terminées par une petite pointe. Les bractées internes sont courtes et sans pointe. Les ligules sont jaune claires ou foncé. Les capitules, sans les bractées externes, ont 2 à 3 cm de diamètre. On rencontre cette plante dans les milieux perturbés (cultures abandonnées, terrains vagues...) [70].



Figure 14: Représentation schématique et en photo de *Asteriscus spinosus*

Les fleurs et les feuilles épineuses de la plante ont été utilisées pour soulager l'inflammation associée à une variété de conditions pathologiques y compris la gastralgie, les contusions inflammatoires, les blessures de la peau et les infections de la bouche [150], [151]. En Algérie, la partie aérienne en décoction ou en infusion dans l'eau est indiquée contre le diabète et les douleurs gastriques à raison de prendre deux verres par jour [152]. Sur le plan chimique, des études antérieures faites sur les métabolites secondaires d'*A. spinosus* ont signalé que la plante est riche en sesquiterpènes et sesquiterpénoïdes oxygénés [153], [154]. Néanmoins seulement trois études ont porté sur la composition chimique des huiles essentielles de cette plante et qui ont de même identifié un pourcentage élevé en sesquiterpènes oxygénés tel que : le germacra-1(10),5-diène-3,4-diol, l' α -cadinol (18.4%), le 3-acétoxygermacra-1(10),5-diène-4-ol (13%), le t-cadinol (13.5-19.26%) et le δ -cadinène (5.8-13.93%) [149], [154]. Également une étude portée sur les parties séparées de la plante provenant de la Jordanie a identifié la présence de l'Acorénone B (9.64-33.85%), comme composé majoritaire dans les feuilles et les fleurs d'*A. spinosus* [155]. En Algérie aucune référence bibliographique n'a rapporté la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce.



L'ANALYSE DES MELANGES
COMPLEXES DES VOLATILS DES
PLANTES

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux aromatiques très complexes et très concentrés. Elles peuvent contenir plus d'une centaine de molécules aromatiques dans des proportions très variables. Ce sont ces différentes combinaisons de molécules qui donnent des propriétés si particulières aux huiles essentielles et qui constituent des mélanges complexes responsables de leurs odeurs et activités caractéristiques.

D'une façon générale, pour qu'un composé soit odorant, il faut qu'il possède un poids moléculaire modéré, une polarité faible, une certaine solubilité dans l'eau, une pression de vapeur et un caractère lipophile élevé [156], [157]. Néanmoins, il n'est pas nécessaire qu'il possède des groupes fonctionnels particuliers ou qu'il soit réactif chimiquement.

Les constituants des huiles essentielles possèdent un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou encore aromatique. Ils peuvent posséder toutes les grandes fonctions de la chimie organique [158] : alcools, composés carbonylés (principalement aldéhydes et cétones), esters, phénols et, dans une moindre mesure, dérivés azotés et soufrés. Néanmoins, les terpènes (hydrocarbure en C10 ou C15) et les terpénoïdes (terpènes fonctionnalisés) sont de loin les plus abondants. Les HE peuvent aussi renfermer différents composés volatils issus de la dégradation des acides gras [21]. Cette diversité de compositions entraîne une complexité qui nécessite des procédures analytiques présentant des sensibilités extrêmement élevées [159].

La valorisation des mélanges complexes des volatils des plantes passe nécessairement par une étape de caractérisation chimique. Pour cela, il apparaît que le traitement des échantillons est toujours l'étape limitante de la chaîne analytique, puisqu'il doit être adapté à la nature des constituants de la matrice à étudier. En effet l'action de la lumière, la température, un stress hydrique, une activité enzymatique ou la présence de polluants, la production et l'émission des composés volatils d'une plante peuvent être affectées ce qui introduit des difficultés dans l'analyse. Ainsi ces mêmes conditions peuvent entraîner une instabilité chimique de certaines molécules odorantes, on donne comme exemple le temps de vie d'un monoterpène soumis à une exposition lumineuse qui est estimé entre moins de 5 min pour l' α -terpinène et à 3 h pour l' α - et le β -pinène [160].

Les enjeux analytiques sont majoritairement confrontés à la détection et la quantification de composés traces, ceci nécessite l'utilisation de techniques d'analyse à très haute résolution, qui permettent d'identifier de nouveaux composés présents à l'état de traces ou d'ultra-traces, notamment par couplage des techniques séparatives avec la spectrométrie de masse qui est l'outil de prédilection en la matière pour l'identification des mélanges complexes des composés volatils. Conformément aux modalités d'une thèse soutenue sur article, la partie qui suit la synthèse bibliographique va être consacrée à la discussion des résultats obtenus au cours de mes travaux et qui sont issus de cinq publications présentées en fin du document. Après un bref passage sur les différentes techniques mises en œuvre pour la préparation de l'échantillon et l'analyse des mé-

langes complexes des volatils des plantes, et en tenant compte du volume important des échantillons traités dans cette thèse (483 échantillon), je me propose de présenter dans la partie suivante une synthèse des résultats les plus pertinents des différentes approches traitées dans ce mémoire de thèse à savoir : (i) la séparation et l'identification des composés nouveaux par la combinaison de plusieurs techniques d'analyses, (ii) le développement d'une méthodologie d'analyse basée sur l'étude statistique et la variabilité chimique permettant d'interpréter les différents résultats trouvés et ainsi mettre en place des études comparatives sur plusieurs rangs, (iii) la valorisation des matrices volatils (huile essentielle et hydrolat) en mettant en évidence l'étude des activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, insecticides et larvicides de ces dernières, et enfin (iv) une étude économique visant à sélectionner les meilleures compositions chimiques pouvant intéresser le monde industriel d'une part et le secteur de l'agriculture BIO d'une autre part en mettant l'accent sur le concept du bio-contrôle.

1. Méthodes de préparation de l'échantillon

L'intervention sur l'échantillon avant l'analyse peut se montrer particulièrement efficace pour concentrer un analyte (une famille d'analytes) ou éliminer certains constituants. Cela est réalisé depuis longtemps en se servant des différentes propriétés physico-chimique des constituants et plus particulièrement, de la température d'ébullition (distillation fractionnée), de la polarité (chromatographie sur colonne), de l'acido-basicité (lavages) ou encore de la solubilité (partition). Ces techniques utilisées depuis fort longtemps ont énormément évolué pour pouvoir se miniaturiser (microdistillation), requérir de plus faibles quantités d'échantillon ou s'automatiser (chromatographie sur colonne « flash ») [9]. Les procédés d'extraction sont basés sur la différence de solubilité des composés présents dans un mélange. Nous nous intéressons ici à l'extraction à partir d'un système solide, la plante. Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits à haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques sont variables, selon la partie du végétal traitée, la fragilité de la plante utilisée, et selon ses caractéristiques botaniques. Parmi les techniques utilisées dans l'extraction des huiles essentielles il y'a celles qui peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) tel que l'entraînement à la vapeur, l'enfleurage, et l'hydrodistillation et celles qui sont nouvelles (développées plus récemment), tel que la technique d'extraction par fluide supercritique, la technique d'extraction assistée par micro-onde...etc.

1.1. Hydrodistillation

Concernant les techniques d'extractions utilisées dans le domaine de l'industrie et de la recherche, l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur représentent les techniques de référence dans ce domaine, ils constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic [21].

La distillation à la vapeur d'eau, ou entraînement à la vapeur d'eau, est la technique la plus courante pour l'obtention des huiles essentielles. Cette technique utilise l'entraînement des substances aromatiques par la vapeur d'eau ou les plantes sont disposées entières ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs comme les racines ou les écorces) dans un appareil de type Clevenger ou dans un alambic (obtention à l'échelle industrielle). Pour l'obtention à l'échelle industrielle, un courant de vapeur d'eau traverse l'alambic et sous l'effet d'une source de chaleur, Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique.

Le courant de vapeur ainsi crée permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. Il s'agit plus précisément de la formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange qui permet dans la majorité des cas une volatilisation de ces métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau. Ainsi, des substances possédant des points d'ébullition assez élevés peuvent être extraites. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier. Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au-dessus de la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat). Il est impératif que la distillation soit complète pour que tous les constituants aromatiques de l'HE soient récupérés. Par conséquent, les durées de distillations sont généralement longues. Elles varient en fonction des organes distillés de 1 à 24 heures [161].

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production d'huiles essentielles et elle reste sans doute la plus rentable, l'investissement matériel étant relativement peu important par rapport à celui des autres techniques. Elle peut être utilisée au laboratoire avec un appareil de type Clevenger tout autant qu'à grande échelle (« procédé en continu », « cuve mobile ») [20].

Pour ce qui nous concerne, nous avons opté pour un montage de type Clevenger, la technique la plus adaptée à l'échelle laboratoire.

1.2. Extraction liquide-liquide (Obtention de l'extrait d'hydrolat)

En règle générale, les hydrolats sont riches en composés oxygénés. On y trouve souvent de petits acides organiques volatils, ce qui implique que les hydrolats sont habituellement à pH acide. Cette valeur peut également être contrôlée pour la comparaison des lots. Il faut en outre savoir que l'analyse des hydrolats est assez jeune comparativement à celle des huiles essentielles, et qu'il est donc plus probablement d'y retrouver des molécules inconnues qui ne sont pas incluses dans des bases de données scientifiques ou des publications. Généralement, tout composé fortement hydrosoluble retrouvé à l'état de traces dans les huiles essentielles mais beaucoup plus abondant dans un milieu aqueux pourrait produire un tel résultat. Ainsi, le pourcentage d'identification des composés volatils totaux est généralement plus faible pour un hydrolat que pour une huile essentielle.

Pour un volume donné d'hydrolat, la quantité de composés organiques volatils est très petite comparativement à une huile essentielle pure. L'analyse d'hydrolat implique donc la plupart du temps une étape de pré-concentration. La solution aqueuse est mise en contact avec un solvant organique non-miscible. La plupart des composés organiques de l'hydrolat ont plus d'affinité pour le liquide organique, et quittent l'eau pendant cette extraction liquide-liquide. Le solvant est ensuite évaporé doucement, voir à basse pression, laissant un « concentré » d'hydrolat dépourvu d'eau.

Les extraits d'hydrolats peuvent être analysés presque de la même manière que les huiles essentielles. Il existe cependant une grande différence entre une huile essentielle pure et un extrait d'hydrolat : ce dernier est résultant d'une solution aqueuse. Cela implique quelques précautions spécifiques pour son analyse en Chromatographie en phase gaz [162].

2. Les méthodes d'identification des constituants des mélanges complexes des volatils

La technique appliquée dans l'analyse des mélanges complexes des volatils est celle développée dans le laboratoire CPN (Chimie des produits Naturels) de l'Université de Corse (France), et adaptée au laboratoire COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) de l'Université de Tlemcen, qui s'effectue classiquement par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la SM ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). Cette procédure est privilégiée lors de la réalisation d'analyse « de routine » d'un échantillon dont les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification [163], [164]. Dès lors que l'étape d'identification se complexifie, la procédure nécessite un fractionnement de

l'échantillon par chromatographie liquide sur colonne (CLC) ou mieux encore en utilisant la chromatographie flash automatisée (CFA), qui peut se poursuivre jusqu'à la purification d'un constituant. L'objectif étant d'aboutir à son élucidation structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : RMN-¹H et ¹³C, SM, IRTF, etc.

2.1. Chromatographie en phase gazeuse « CPG »

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse par séparation des composés gazeux ou vaporisables par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'examen de mélanges pouvant être très complexes et dont les constituants diffèrent tant par leur nature que par leur volatilité [12]. L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc.), ils peuvent donner aussi une information sur la nature des molécules, et les aires des pics fournissent une quantification relative. Ainsi des méthodes de quantification réelle avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agroalimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique [165].

Chaque constituant est caractérisé par ce qu'on appelle un indice de rétention. En effet une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation de ces indices, mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires. Le calcul peut se faire pour une expérimentation à température constante par interpolation logarithmique: indices de Kováts (IK) [166], ou en programmation de température par interpolation linéaire indices de rétention ou indices de Van Den Dool et Kratz (IR). Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent fortuitement co-éluer et présenter des indices de rétention identiques. Par ailleurs, on observe fréquemment pour un même composé des écarts d'indice de rétention pouvant atteindre 10 et même 20 unités, entre les données de la littérature et celles du laboratoire surtout sur colonne polaire et ce pour les molécules les plus polaires qui sont éluées en dernier [167]. De meilleurs résultats sont obtenus quand les produits de référence et les mélanges naturels à analyser, sont traités rigoureusement dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire lorsque les indices des composés de référence sont mesurés au laboratoire [17]. La CPG est préférentiellement utilisée dans le cas des molécules volatiles comme celles qui sont présentes dans les huiles essentielles (mono et sesquiterpènes, certains diterpènes, phénylpropanoïdes, molécules linéaires,...etc.). La CPG, est aujourd'hui, un outil incontournable pour

l'analyse des composés volatils en mélange, et elle peut même être utilisée avec des molécules plus lourdes (stéroïdes, triterpènes,...), en utilisant une température isotherme élevée (CPG haute température CPGHT).

2.2. Chromatographie en phase gazeuse /spectrométrie de masse (CPG/SM)

La complexité des mélanges à analyser dans les domaines aussi différents que ceux concernant l'analyse de polluants atmosphériques, de coupes pétrolières ou dans le domaine de l'agroalimentaire (aliments, eau), et les produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine) [168], a conduit au développement de techniques de couplage de plus en plus sélectives pour permettre la caractérisation de composés souvent présents à l'état de traces. En effet le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence en analyse de routine dans le secteur particulier des huiles essentielles [169], [170]. Le principe de la spectroscopie de masse consiste à bombarder, à l'aide d'électrons, une molécule préalablement éluée sur la colonne capillaire qui sera ensuite fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de la molécule. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents et dont les applications n'exigent pas une haute résolution pour l'analyse des huiles essentielles, sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge m/z [171], [172]. Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les chalcotrons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs [173].

Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux des composés contenus dans des bibliothèques de spectre informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales [174]. En fait, dans le cas des mélanges complexes des huiles essentielles, l'utilisation conjointe de la SM (utilisation simultanément de bibliothèques de laboratoire et de littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de leurs constituants [175]–[178]. Néanmoins dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, des problèmes d'identification peuvent persister en utilisant la SM(IE) associée aux indices de rétention

mesurés sur deux colonnes de polarité différent. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec les techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) [179] .

2.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non destructive, extrêmement riche et puissante qui permet de sonder la matière à l'échelle nanométrique et d'extraire des informations structurales très locales qui caractérisent un système. Elle consiste à observer, dans un champ magnétique intense, la réponse de certains atomes à un champ radio fréquence. Elle s'applique à des domaines aussi variés que la chimie organique, les polymères, les matériaux inorganiques ou hybrides et les échantillons biologiques. Dans le droit fil des travaux précurseurs de Formàcek et Kubeczka dans le domaine des huiles essentielles [180], [181], la plupart des études continuent à utiliser la RMN comme méthode de confirmation plutôt que méthode d'identification. Complémentaire des techniques conventionnelles développées, la RMN du carbone-13 constitue de nos jours un véritable outil d'analyse des mélanges complexes naturels.

Le spectre du RMN du carbone-13, présente dans la très grande majorité des cas, autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule [182]. De plus, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible aux variations électroniques et stériques, la moindre modification structurale se traduit par une variation plus ou moins importante mais toujours mesurable de tous (ou presque tous) les carbones de la molécule [183]. Ainsi, il est possible d'identifier par RMN du carbone-13 la plupart des molécules organiques, même dans le cas où les molécules ont des structures très proches.

3. Méthodologie d'analyse

L'identification des constituants d'une huile essentielle ou de la fraction volatile extraite d'une matrice d'origine végétale est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles. Celle-ci est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE [159].

Le mélange complexe des volatils (fractionné ou non dans le cas des huiles essentielles) est analysé simultanément par CPG/Ir et CPG/SM-IE. Le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui, à l'aide d'un logiciel, sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, dont une élaborée au laboratoire et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [Jennings et Shibamoto [184] Joulain [163], [185], Wiley [186], [187], Adams [174], Nist [188]]. Afin de rendre performante l'identification, il est préconisé de posséder une bibliothèque riche mais surtout adaptée au domaine d'investigation

[164]. La bibliothèque « Arômes » construite au laboratoire CPN et reproduite partiellement au laboratoire COSNA, est élaborée à partir de spectres de masse enregistrés dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, assurant ainsi une fiabilité accrue dans l'identification. Elle contient actuellement les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes et les spectres de masse de plus de 1300 composés volatils dont plus de 900 molécules terpéniques. Cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par héli-synthèse et dans tous les cas, identifiées par RMN.

Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, les indices de rétention du constituant proposé sont comparés à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans les bibliothèques commerciales [Jennings [184], Joulain [163], [185], Adams [174]], ou encore répertoriés dans la littérature. Toutefois, se limiter à la note de concordance n'est pas suffisant; il faut systématiquement procéder à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse moléculaire, fragmentations caractéristiques ou encore mise en évidence de co-élutions. A ce stade, trois approches différentes (**a**, **b**, et **c**) sont envisagées (figures 15 et 16) :

- **(a)**, le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé présent dans la bibliothèque élaborée au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Cette démarche est systématiquement mise en œuvre quel que soit la nature du mélange complexe (huile essentielle, extrait au solvant ou fraction volatile (cas d'un fractionnement sur colonne).
- **(b)**, les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé de la bibliothèque du laboratoire mais correspondent à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas nous vérifions, par l'étude des fragmentations principales, si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la structure de ce dernier. Cette approche mécanistique peut être complétée, lorsque cela s'avère possible, soit par une étape d'héli-synthèse suivie de l'exploitation de l'analyse du composé synthétisé, soit par le recours à la RMN ^{13}C dans le cas de l'analyse d'une huile essentielle
- **(c)**, les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé d'aucune bibliothèque. Dans ce cas deux stratégies, uniquement envisageables pour l'analyse des constituants d'une huile essentielle, sont imaginables :
 - soit le composé est présent dans les bibliothèques RMN ^{13}C (auquel cas il est identifié sans ambiguïté),

- soit le composé est absent des bibliothèques RMN ^{13}C , auquel cas nous n'avons d'autre ressource que le schéma classique de purification du constituant dans l'optique d'une étude structurale.

Cette méthodologie est celle mis en œuvre pour l'analyse des différentes huiles essentielles citées dans ce manuscrit de thèse. L'analyse des échantillons a été réalisée en suivant deux voies : (i) une voie « de routine » qui a eu recours seulement à l'analyse par CPG et CPG/SM et cela concernant les volatils qui n'ont pas présenté de difficulté majeurs en vue de leurs identification. C'est dans cette optique et en tenant compte du volume des échantillons traités et qu'on n'a pas pu les analysés au laboratoire CPN de Corse, que nous avons essayé de développer la même technique (et dans les mêmes conditions) au laboratoire COSNA de l'université de Tlemcen, dans une thématique de transfert technologique qui permettra par la suite de faire une analyse complète et fiable des huiles essentielles au sein du laboratoire COSNA. (ii) la deuxième voie a été réalisée par combinaison des techniques associe le pouvoir de séparation des techniques chromatographiques (CLC, CPG) à la puissance d'identification des techniques spectroscopiques (SM et RMN) dans le but d'optimiser la performance de notre méthodologie d'analyse. Cette combinaison est généralement mise en œuvre pour l'analyse des huiles essentielles dont l'identification des constituants est difficile, notamment lorsque les limites d'identification de la bibliothèque du laboratoire sont atteintes. A travers plusieurs exemples, nous illustrerons les démarches analytiques complémentaires basées sur l'utilisation conjointe de la chromatographie sur colonne (CLC), et la RMN du carbone-13 afin d'identifier les composés absents de nos bibliothèques.

Figure 15 : Identification des constituants de mélanges complexes de volatils par combinaison des techniques CPG et CPG/SM

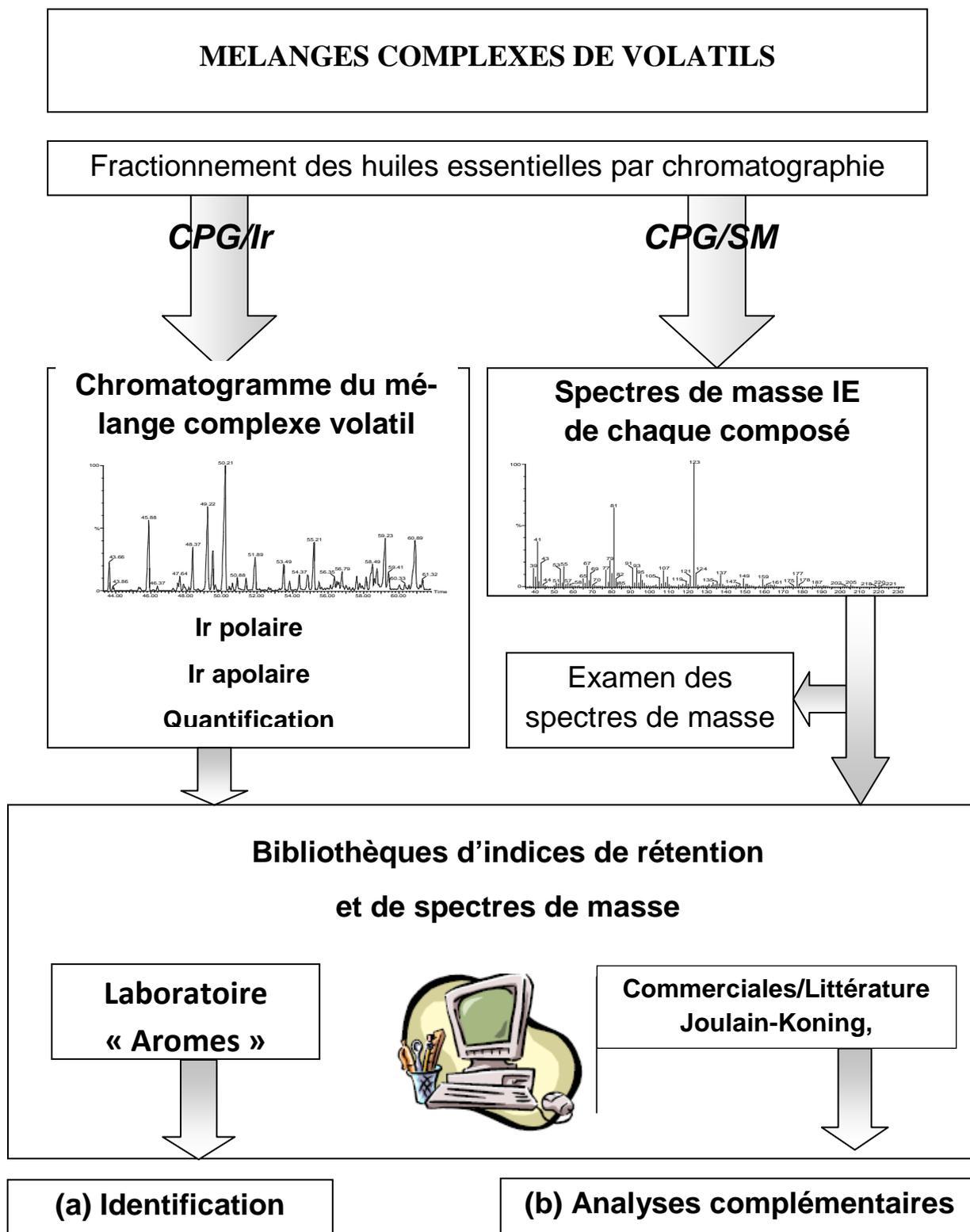
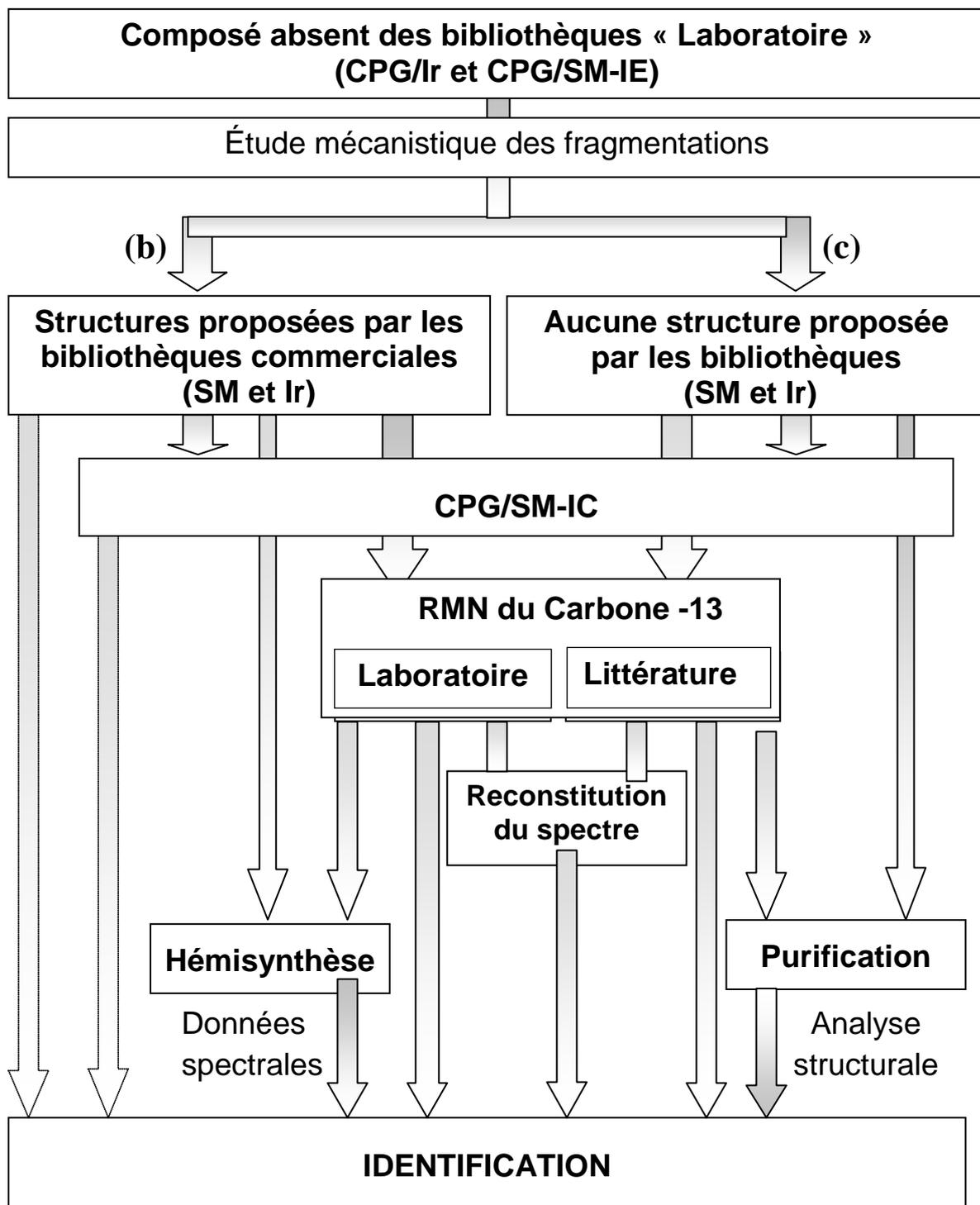
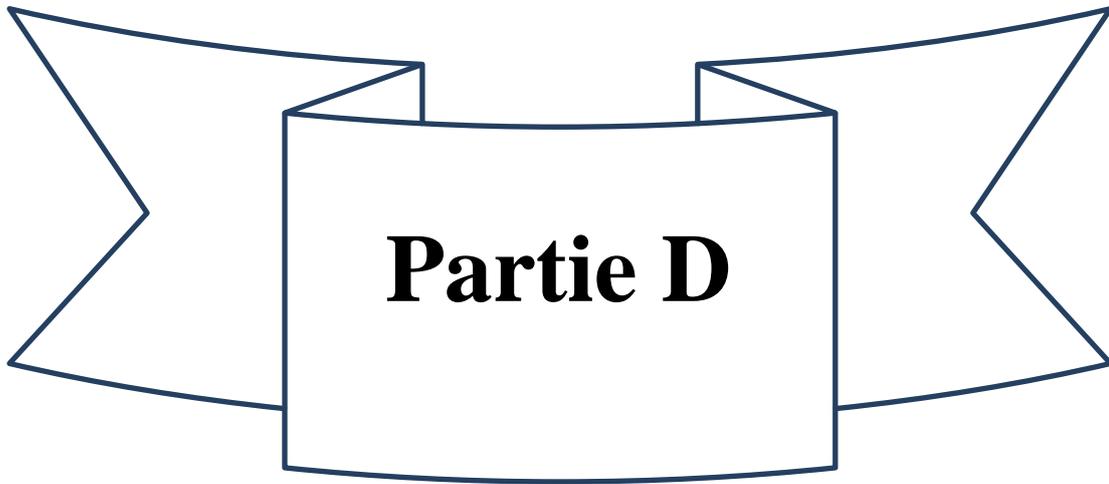


Figure 16 : Analyses complémentaires mises en œuvre pour l'identification des constituants d'une huile essentielle.





APPROCHE METHODOLOGIE -
RESULTATS

Dans cette partie nous présentons l'apport de chaque technique décrite dans la partie analytique, dans l'identification des compositions chimiques de nos différentes huiles essentielles. Les résultats les plus pertinents seront utilisés pour illustrer ces approches, tout en se référant à chaque fois à l'article qui les rapporte plus en détail.

1. L'apport de la Chromatographie Liquide sur Colonne (CLC)

Dans le cas des mélanges complexes des huiles essentielles, le fractionnement par colonne est une technique préparative qui nous permet de séparer ou de purifier les constituants de ces mélanges. Cette séparation permet aussi d'améliorer le rendement quantitatif mais surtout qualitatif de l'identification. En effet grâce à sa grande rapidité et son temps d'action réduit la CLC flash est une méthode qui est utilisée de manière fréquente au laboratoire, elle utilise le plus souvent le mélange binaire n-pentane/éther diéthylique, pour le fractionnement des huiles essentielles. Concernant les huiles essentielles des différentes espèces étudiées dans cette thèse, nous avons opté pour un fractionnement de la majorité d'entre elles et cela pour une ultime séparation des deux fractions hydrocarbonée et oxygénée (cas des menthes, des thyms, et des chrysanthèmes), La chromatographie sur colonne permet aussi de simplifier le mélange complexe initial en concentrant soit les composés majoritaires ou même ceux qui possèdent un faible pourcentage dans les fractions. Ainsi le fractionnement d'une portion de 1,0 g d'huile essentielle collective de *T. inodorus* [A1], par élution avec du n-hexane et l'éther diisopropylique (DIPE,) nous a permis d'obtenir une fraction non polaire et cinq fractions polaires, aussi l'élution avec du n-hexane et du DIPE (95: 5), a permis de concentrer l'hydrate de trans-sesquisabinène (50,3%), hydrate de trans-7-épi-sesquisabinène (1,3%), le viridiflorol (18,8%), le lédol (4,3%), l' α -acorénol (1,5%) et le β -bisabolol (8,2%), dans la fraction oxygénée. Par ailleurs toutes les fractions obtenues ont été analysées par GC et GC-MS, et la fraction polaire FO2 a été analysée par la RMN ^{13}C [A1].

Le fractionnement nous a permis d'identifier et de confirmer cinq nouveaux composés qui sont (l'Hydrate de trans-sesquisabinène, Hydrate de trans-7-épi-sesquisabinène, (Z)-Hex-3-en-1-ol, Camphène et Eicosane) [A1].

Tableau 1 : Identification des constituants de l'HE de *T. inodorus* par la CLC

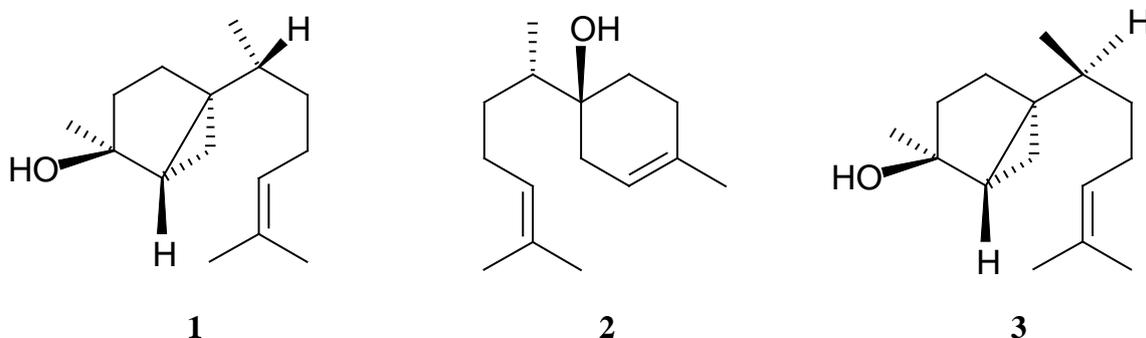
Espèces	Fractions obtenues par CLC	Nombre de composés identifiés et pourcentage d'identification			
		Avant CLC	% avant	Après CLC	% après
<i>T. inodorus</i>	6	78	71,2	83	94,7

2. Utilisation des bibliothèques de données commerciales, un savoir-faire à acquérir

Si les données spectrales du RMN carbone-13 et de la CPG décrites dans la littérature sont enregistrées dans les mêmes conditions expérimentales de celles utilisées au laboratoire, l'identification d'un constituant d'un mélange complexe volatil est réalisée sans ambiguïté, et cela par comparaison de ses indices de rétention et de ses spectres de masse avec ceux de molécules de référence contenues dans la bibliothèque « Arômes ». Par contre l'identification à partir des bibliothèques commerciales nécessite une attention particulière. Les bibliothèques commerciales que nous utilisons présentent un niveau de performance inégal car elles sont construites dans des conditions expérimentales non standardisées (nature du quadripôle, conditions d'ionisation, balayage de masses variables...) et différentes de celles utilisées au laboratoire. Les bibliothèques commerciales informatisées NIST [188] et Wiley [186], [187] sont construites par compilation de différentes collections de données d'origines variées, qui renferment les spectres de masse de plusieurs milliers de molécules organiques dont le taux de répliques relativement important limite inévitablement la pertinence de l'identification [189], [190]. Par contre, les bibliothèques commerciales informatisées Joulain [185], [191] et Adams [174] sont plus performantes et peuvent être directement utilisables. Elles contiennent certes un nombre moindre de spectres de masse (respectivement plus de 1200 et plus de 1600) mais qui correspondent tous à des molécules volatiles identifiées dans des huiles essentielles. De plus, les spectres de masse répertoriés ont tous été enregistrés dans des conditions expérimentales voisines de celles utilisées au laboratoire. Enfin, ces deux bibliothèques présentent l'énorme avantage de lister les indices de rétention des composés mesurés, en programmation de température, sur des colonnes apolaire respectivement de type DB-5 et CpSil 5 : conditions chromatographiques voisines de celles utilisées au laboratoire. Toutefois, c'est l'analyste qui, en dernier ressort, valide la proposition à partir de la note de concordance fournie par le logiciel de comparaison, de la prise en compte des indices de rétention littérature et de l'examen du spectre de masse [192]. Il y a plusieurs exemples dans ce manuscrit de thèse qui illustrent l'utilisation des bibliothèques de données dans l'identification des composés, on peut citer le *shyobunol* qui est le composé majoritaire de l'huile essentielle d'*I. viscosa* et qui a été identifié à l'aide de la bibliothèque de données Joulain. On peut citer aussi le cis-p-menth-2-en-1-ol et le trans-p-menth-2-en-1-ol qui se trouvent dans les huiles essentielles des menthes et des inules et qui sont eux-mêmes identifiés à l'aide de la bibliothèque de données Joulain.

3. La résonance magnétique nucléaire RMN du carbone 13 :

Les huiles essentielles sont des substrats de choix pour mettre en évidence l'efficacité et la spécificité d'une technique analytique ainsi que pour démontrer la complémentarité des différentes techniques. En effet, grâce à sa capacité d'accès aux valeurs des déplacements chimiques de chaque carbone de la molécule, nous avons constaté que ni la complexité de la structure ni la fonctionnalisation ne constitue un handicap pour l'identification des constituants d'un mélange naturel par RMN ^{13}C . Ainsi, cette technique permet d'identifier de nombreux sesquiterpènes ayant des structures voisines, présents dans les huiles essentielles. Nous pouvons citer comme exemple l'huile essentielle de *Micomeria inodora* ou l'identification du composé majoritaire l'hydrate de trans-sesquisabinène ⁽¹⁾, ainsi que deux autres composés (β -bisabolol ⁽²⁾ et l'hydrate de trans-7-epi-sesquisabinène ⁽³⁾ a été réalisée par RMN ^{13}C après un fractionnement par CLC [A1].



4. Outil statistique

De nombreux travaux de recherche ont montré que la composition chimique des huiles essentielles présente des variations induites par une série de facteurs. Ces facteurs sont liés d'une part aux propriétés de la plante et à son environnement de culture, et d'une autre part à toutes les étapes de traitement allant de la récolte de la matière première végétale jusqu'au stockage de l'huile essentielle, qui peut également induire des variations dans la concentration des composés ou même l'apparition de nouvelles molécules. Pour étudier cette variabilité chimique, il est indispensable d'effectuer un traitement statistique de la matrice constituée par les pourcentages normalisés et standardisés des constituants des mélanges volatils. L'étude de cette variabilité chimique est réalisée en utilisant les deux outils les plus fréquents : l'analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) [193]. Ces deux outils permettent d'avoir une vision synthétique, des similitudes ou des différences au sein d'un ensemble d'échantillons. Sans entrer dans les théories régissant les statistiques, nous allons montrer le parti que le chimiste peut en tirer.

4.1. Analyse en Composante Principale (ACP)

L'ACP est un outil permettant de convertir un nuage de points d'un espace multi-varié en un nuage de points dans un espace à 2 dimensions. Les points et les différentes variables de cet espace sont projetés selon les 2 axes perpendiculaires, les plus représentatifs de l'ensemble du nuage [194]. Concrètement, dans notre domaine d'étude, les variables sont généralement les constituants du mélange tandis que les points sont les diverses stations de récolte.

4.2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La CAH est une méthode d'agglomération de différents points dans un espace varié. On établit tout d'abord la dissimilarité entre chaque point via des calculs de distance, ensuite, le système choisi agglomère les points entre eux de façon itérative et abouti à la formation de plusieurs groupes. Les agglomérations successives sont représentées sous forme d'arborescence sur le dendrogramme issu de la CAH. Ceci permet ainsi de regrouper les échantillons selon plusieurs groupes, en fonction de l'importance, de la dissimilarité entre chaque rameau de l'arbre [193].

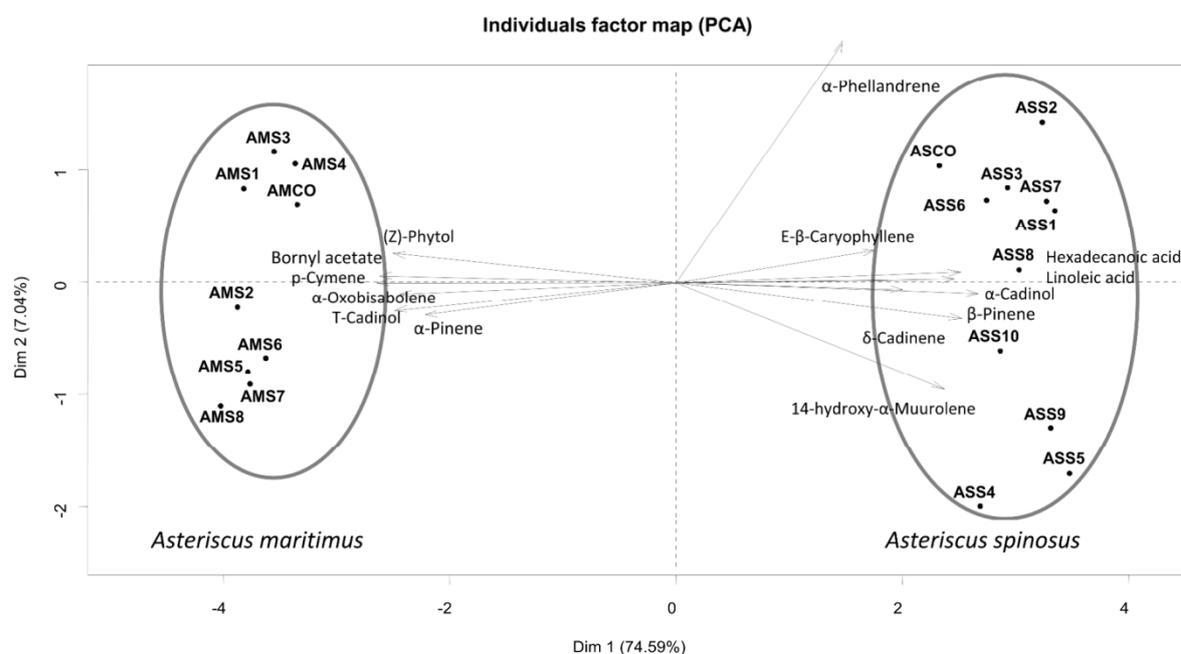
L'utilisateur doit faire preuve de prudence dans les conclusions tirées des représentations issues de son échantillonnage géographique. Dans une ACP, il est important que les deux axes choisis aient un pourcentage de représentation suffisamment élevé pour que l'ACP soit jugée pertinente. Si le pourcentage est trop faible, les conclusions qui découlent de la représentation sont erronées. De même, la CAH, bien que permettant d'établir différents groupes, ne fournit strictement aucune information concernant les affinités de ces groupes avec les diverses variables utilisées

Dans ce manuscrit de thèse, l'interprétation des résultats a été faite d'une façon systématique en établissant une classification des groupes les plus représentatifs en CAH et confirmé ces groupes en ACP, et cela afin d'éviter les aberrations toujours possibles en ACP. Une fois les groupes et leur composition fixés, les affinités de chaque groupe avec les composés discriminants ont été déterminées par ACP. En effet l'étude de la variabilité chimique en utilisant l'outil statistique peut nous procurer des informations qui peuvent être très utiles dans l'interprétation de la longue liste des facteurs pouvant influencer la composition chimique d'une huile essentielle. On peut ainsi envisager de contrôler ceux qui le permettent (irrigation, période de récolte, méthode d'extraction..) mais aussi d'anticiper la composition de l'extrait obtenu. Ce qui intéresse tous les consommateurs d'huiles essentielles, l'industrie qui cherche de bons rendements dans l'extraction de molécules spécifiques ou une composition chimique stable, ou l'aromathérapeute qui souhaite une huile exprimant son plein potentiel d'efficacité.

À titre d'exemple, une représentation d'une ACP dans la figure ci-dessous, montre l'intérêt de l'utilisation de l'outil statistique pour faire une analyse comparative entre les deux espèces du

genre *Asteriscus* (*Asteriscus maritimus* et *Asteriscus spinosus*) [A5]. Cette approche sera donnée plus en détail dans la partie E pour montrer toute son importance dans la sélection des meilleurs chémotypes chimiques qui intéresseraient les industriels.

Figure 17: La représentation des échantillons d'huiles essentielles des deux espèces du genre *Asteriscus* par ACP.



5. Compositions chimiques des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle dépend tout d'abord d'une série de facteurs propre à la plante et à son environnement de culture. Que cela soit pour des raisons de sécurité de transport, de stockage, ou pour la sécurité des consommateurs, mais également pour assurer des échanges commerciaux honnêtes, la détermination de la qualité des huiles essentielles est capitale, ceci passe par plusieurs étapes et doit surtout tenir compte de toutes les données que peut fournir la botanique de la plante.

5.1. Variabilité Chimique (Nombre des échantillons)

Comme on a déjà cité dans les paragraphes ci-haut, plusieurs facteurs peuvent influencer la composition chimique d'une HE, c'est pour cette raison qu'avoir un nombre important d'échantillons peut nous procurer un spectre élargie d'informations dans l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles. Dans notre travail de recherche nous avons récupéré 483 échantillons de différentes stations de la région Ouest de l'Algérie. Le nombre d'échantillons de chaque espèce étudiée, est mentionné dans le tableau 2.

Tableau 2 : Nombre des échantillons des différentes espèces récoltées

Genres	<i>Mentha</i> (245)				<i>Thymus</i> (90)				<i>Chrysanthemum</i> (57)		<i>Inula</i> (28)		<i>Asteriscus</i> (18)	
Espèces	M.PI	MPU	MR	MS	T.I	TH1	TH2	TH3	CC	CD	IV	IM	ASM	ASS
Nbr échantillons (483)	30	53	83	79	24	23	35	8	35	22	22	8	8	10

MR : *Mentha rotundifolia* ; **MPI** : *Mentha piperita* ; **MPU** : *Mentha pulegium* ; **MS** : *Mentha spicata* ; **TH1** : *Thymus ciliatus ssp eu-ciliatus* ; **TH2** : *Thymus ciliatus ssp coloratus* ; **TH3** : *Thymus ciliatus ssp munbyanus* ; **CC** : *Chrysanthemum coronarium var coronarium* ; **CD** : *Chrysanthemum coronarium var discolor*. **IV** : *Inula viscoa* ; **IM** : *Inula montana* ; **ASM** : *Asteriscus maritimus* ; **ASS** : *Asteriscus spinosus*.

5.2. Séchage de la plante et détermination de la teneur en eau

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau qui est vitale pour la vie de la plante. Cependant, la quantité d'eau que peut contenir une espèce peut indiquer des modifications considérables, particulièrement sur le plan quantitatif, dans la phase de l'extraction des huiles essentielles. C'est pour cette raison que passer par l'étape de séchage est nécessaire pour déterminer la teneur exacte en huile essentielle d'une plante.

Des études ont montré que l'augmentation de la teneur en huiles essentielles avec le séchage suggère la continuité et l'accélération de la biosynthèse des huiles essentielles après la récolte du matériel végétal [195]. De plus, au niveau industriel la technique du séchage, est considérée comme très rentable, car elle permet d'améliorer la qualité des produits en évitant leur contamination, de conserver leurs principes actifs, d'augmenter leur durée de vie, et de diminuer leurs poids afin de faciliter leur transport et de diversifier leur utilisation [196] [197]. Néanmoins, lors du séchage, une plante aromatique pourrait perdre une partie de son huile essentielle par volatilisation et par entraînement avec la vapeur d'eau éliminée.

Ces pertes sont d'autant plus importantes si la température du séchage est longue ou la température est trop élevée. C'est pour cette raison que cette opération doit être faite dans des conditions bien définies. Pour ce qui nous concerne nous avons opté pour un séchage naturel de nos différentes espèces à l'abri de la lumière, dans l'herbier de l'Université de Tlemcen, par la suite nous avons déterminé la teneur en eau en utilisant la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans les parties aériennes sèches de la plante et qui représente la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'abri de la lumière. On peut donner l'exemple de l'espèce *M.rotundifolia* qui a présenté le taux d'humidité le plus élevé par rapport aux autres espèces et qui a été estimé à 79,39%, ce qui offre à la plante un caractère humide très puissant. Il est à noter qu'un intervalle important a été enregistré entre le rendement des HE de la plante fraîche et la

plante sèche, ou ce dernier a été estimé à 0.87 et 1.53 respectivement pour la même masse de plante distillée.

5.3. Espèces, sous-espèces et variétés

5.3.1. Espèce

Si on considère que l'espèce n'est pas réellement un facteur de variation de la composition chimique des huiles essentielles, citons tout de même l'importance de l'identification de la plante utilisée par une nomenclature correcte. La multitude des noms vernaculaires que peut avoir une espèce et qui changent d'un pays à un autre, rend l'utilisation du nom scientifique de la plante indispensable pour éviter tout risque de confusions lors de la commercialisation, ainsi la désignation d'une éventuelle variété et du premier descripteur sont également considérés comme des informations qui permettent de verrouiller ce risque de confusion. En effet, on cite parmi les facteurs qui augmentent ce risque le phénomène d'hybridation, le terme « hybridation » évoque une fécondation qui ne suit pas les lois naturelles : ce qui consiste à croiser deux espèces, races ou variétés distinctes. Les hybrides ainsi formés peuvent être fertiles et donner lieu à la formation d'une nouvelle espèce.

Les menthes sont classées parmi les genres les plus connues pour avoir un grand pouvoir d'hybridation. Il suffit de planter deux plants de menthes différentes côte à côte pour voir apparaître une nouvelle forme intermédiaire, une nouvelle composition chimique d'huile essentielle et même de nouveaux chémotypes. L'exemple le plus pertinent qu'on peut donner à ce propos est celui des résultats très variables qui ont caractérisé la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* de l'Ouest Algérien. Selon la littérature, cette espèce est issue d'un hybride de *Mentha longifolia* et de *Mentha suaveolens* [198], alors que d'autres références disent que *Mentha rotundifolia* et *Mentha suaveolens* correspondent à la même espèce [199]. Cette espèce a été caractérisée par une forte variabilité chimique, ou les composés majoritaires (la pulégone, le menthol, l'oxyde de pipériténone, la carvone... etc.), changent radicalement d'un pays à un autre. Cette multitude de composition nous a poussé à faire une étude statistique de la variabilité chimique de l'huile essentielle de cette espèce. L'analyse de 83 échantillons de *M. rotundifolia* faite par CPG et CGP/SM nous a décelé la présence du Pulégone (2.3-40.1%), Menthone (5.3-38.1%), Oxyde de pipériténone (8.2-49.3%), comme composés majoritaires formant trois groupes présentés dans le tableau ci-dessous. Par ailleurs l'analyse de l'extrait d'hydrolat de *M. rotundifolia* a été caractérisée par l'abondance du pipériténone contrairement à l'huile essentielle, ainsi que la présence de l'acétate de carvone, jamais décrit dans la littérature comme composé dans l'huile essentielle.

Tableau 3: Pourcentages des composés majoritaires de 83 échantillons de *M. rotundifolia*

Composés majoritaires	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3	
	% min	% max	% min	% max	% min	% max
Pulégone	1,2	39,8	0,1	0,9	0,1	1,6
Menthone	5,1	37,6	0	0	0	0
Iso-menthone	2,6	25,3	0	0	0	0
Néo-menthol	1,6	16,2	0	0	0	0
Oxyde de piperitenone	0	0	8,2	42	32,9	49,3
Z- oxyde pipéritone	0	0	10,8	12,5	0	0
E- oxyde pipéritone	0	0	9,8	13,7	0	0
E-β-Caryophyllène	0,1	2,8	1,5	3,3	8,5	11,5
Terpinène-4-ol	0,5	12,5	0,1	3,1	9,3	15,2

5.3.2. Sous-espèces

Comme nous l'avons déjà cité plus haut, ce qu'on appelle une certification botanique est parmi les critères qui désignent la qualité d'une huile essentielle, cette certification doit tenir compte de l'appellation de la plante en précisant le genre, l'espèce, la sous-espèce, le cultivar afin d'éliminer le risque d'erreur issu de noms vernaculaires locaux, en effet durant nos investigations faites au cours de ce travail de thèse nous avons rencontré ce genre de confusion botanique entre trois sous-espèces de *Thymus ciliatus*. La cueillette réalisée sur les monts de la wilaya de Tlemcen nous a permis de récupérer trois sous-espèces de *Thymus ciliatus* qui sont quasiment identiques, ou il était impossible de les différencier à l'œil nu. Par la suite, l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des trois sous-espèces nous a révélé la présence de trois profils chimiques différents, et c'est à partir de là qu'on a procédé à une nouvelle cueillette en collaboration avec les botanistes pour pouvoir identifier : le *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* (Carvacrol (61,6-70,9%)), *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus* (Acétate d' α -terpényle (49,6- 51,39%)) et le *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* (Camphre (15,7-21,5%)) [A3].

5.3.3. Variétés

Trop souvent, on retrouve des huiles essentielles pour lesquelles l'organe producteur, la variété de la plante ou l'origine géographique ne sont pas précisés. Il est pourtant très utile de les inclure dans la dénomination de l'huile essentielle puisque nous verrons que ce sont les premiers facteurs de variation de la composition d'une huile essentielle. L'exemple que nous présentons ici illustre bien ce facteur puisque l'espèce *chrysanthemum coronarium* présente deux variétés qui au niveau morphologique changent seulement dans la coloration des fleurs, qui sont jaunes dans la variété *coronarium* et blanches dans la variété *discolor*. Néanmoins l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des deux variétés a présenté une différence dans l'abondance des composés majoritaires de ces dernières. Par ailleurs l'étude statistique a révélé la présence de deux groupes caractéristiques de chaque variété : un groupe majoritaire qui regroupe 35

échantillons de la variété *coronarium* caractérisé par la forte abondance du myrcène (25,2-36,4%) et une faible abondance en camphre (5,5-15,2%), ainsi qu'un groupe de 22 échantillons de la variété *discolor* caractérisé par des pourcentages plus importants en camphre (14,2-27,5%), mais toujours avec une forte abondance en myrcène (15,1-28,1) (Tableau 2).

Tableau 4: Pourcentages des composés majoritaires de 57 échantillons des deux variétés de l'espèce *C. coronarium*

Composés majoritaires	Groupe 1 (var <i>coronarium</i>)		Groupe 2 (var <i>discolor</i>)	
	% min	% max	% min	% max
Myrcène	25,2	36,4	15,1	28,1
Camphre	5,5	15,2	14,2	27,5
Cis acétate de chrysanthényl	0,8	7,1	2,1	12,9
Trans acétate de chrysanthényl	1,5	5,2	0,8	4,3
Acétate de lyratyl	2,4	7,1	4,6	6,8
Z- β -ocimène	0,9	5,5	2,7	13,6
E- β -ocimène	0,2	4,5	0,8	2,9

5.4. Partie de la plante utilisée

En tenant compte des exigences provoquées de plus en plus par les consommateurs, le producteur d'une huile essentielle se trouve devant l'obligation, de donner des informations plus précises pour justifier la qualité de son huile essentielle, parmi les informations qu'il peut fournir il convient de préciser si la totalité de la plante a été distillée ou si ce n'est pas le cas, de quelle partie de la plante est-elle extraite. En effet, l'organe producteur influe sur le rendement d'extraction. Parfois, l'aspect de l'huile essentielle est très dépendant de son organe producteur et porte des désignations complètement différentes. Lors de nos travaux de thèse, nous avons effectué une étude d'organes séparés de deux genres : les menthes et les chrysanthèmes. L'exemple qu'on cite ici illustre bien l'influence de ce facteur sur le changement des caractéristiques de l'huile essentielle vis-à-vis : le rendement, l'aspect, la couleur et même la composition chimique de cette dernière. Les deux variétés de l'espèce *chrysanthémum coronarium* (var *coronarium* et var *discolor*) étudiées ont montré des différences remarquables au niveau de la couleur de l'huile essentielle qui était jaune dans les feuilles et les tiges et bleu marine dans les fleurs, ainsi le rendement élevé obtenu à partir des fleurs (0.42-0.61) pour la variété *discolor* et *coronarium* respectivement, nous donne une information supplémentaire sur l'organe responsable de la production de l'huile essentielle. Concernant la composition chimique, cette dernière a été marquée par la présence du Chamazulène, un composé qui a été complètement absent dans les feuilles et les tiges et présent à un pourcentage important dans l'huile essentielle des fleurs. En effet la présence de ce composé justifie la

coloration bleue obtenue lors de la distillation des fleurs des deux variétés de l'espèce *coronarium*.

5.5. Cycle végétatif de la plante et sa période de récolte

Si on étudie la composition chimique des huiles essentielles provenant d'une même plante mais produite à deux moments différents, elle ne sera pas la même pour les deux extraits. On aura probablement des différences même vis-à-vis aux rendements. C'est à partir de la que la connaissance des variations au cours du cycle végétatif de la plante peut nous permettre de sélectionner le moment le plus opportun pour la récolter. Chez les Lamiacée les poils sécréteurs d'huiles essentielles se trouvent à la surface du végétale, ceci augmente l'influence du facteur climatique sur ces espèces, c'est le cas des menthes qui ont montré des variations très importantes par rapport aux rendements des huiles essentielles (Figure 18), (Tableau 5) et même à l'abondance des composés majoritaires.

Tableau 5 : rendements des quatre espèces de menthes

Espèces	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
<i>M. spicata</i>	0,91	0,63	0,68	0,25	0,09	0,14
<i>M. piperita</i>	1,33	0,85	0,45	0,26	0,57	0,62
<i>M. rotundifolia</i>	2,31	1,72	0,66	0,71	0,41	0,83
<i>M. pulegium</i>	1,69	1,44	1,2	0,29	0,71	0,65
Espèces	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre
<i>M. spicata</i>	0,42	0,69	1,41	1,45	1,73	1,96
<i>M. piperita</i>	0,38	0,65	0,98	1,02	1,28	1,82
<i>M. rotundifolia</i>	1,2	2,4	2,61	2,65	2,92	3,01
<i>M. pulegium</i>	0,42	0,93	1,2	1,32	1,45	1,75

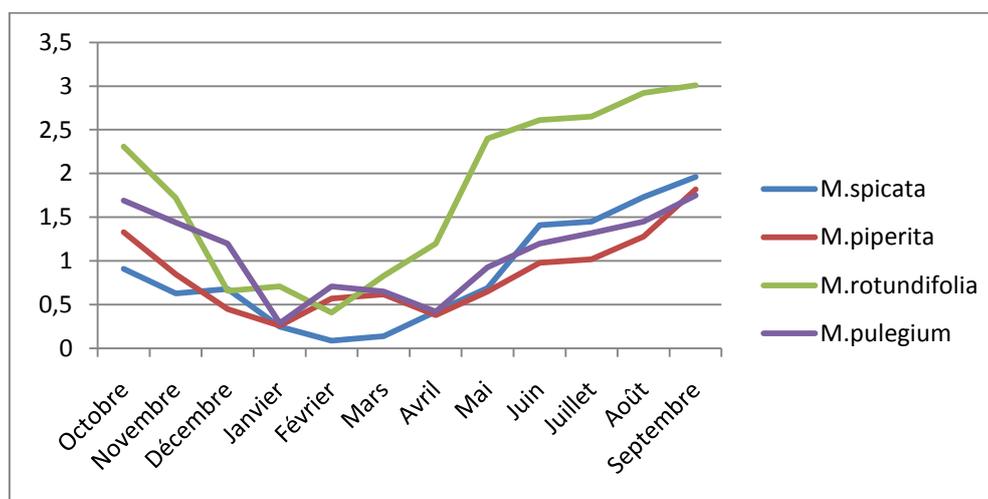


Figure 18 : Courbe de l'influence du cycle végétatif sur les rendements en huiles essentielles

À partir des courbes d'évolutions des rendements des quatre espèces de menthes nous pouvons conclure, que ce dernier est influencé tant par les périodes de froid que les périodes de chaleurs. En effet, les états de variations les plus importantes ont été signalées en périodes de pluie et froid (décembre, janvier, février, mars), ou les rendements ont chuté brusquement pour atteindre le rendement le plus faible de 0.09 pour *M. spicata*, cependant cette chute a été de nouveau signalée en périodes où les températures ont été très élevées (juillet et début Août).

Pour les quatre espèces de menthes étudiées, le rendement moyen est de l'ordre de 0.6%, il atteint son minimum pendant la période végétative de la plante, puis augmente progressivement pendant la phase initiale de floraison et atteint son maximum à la pleine floraison, en fait les résultats trouvés sont très compatibles avec la règle générale, qui dit que la formation des huiles essentielles s'améliore à des températures plus élevées, bien que les jours très chauds peuvent conduire à une perte physique excessive d'huile, ainsi que la pluie continue peut entraîner la perte d'huiles essentielles des feuilles et des racines par lessivage [200].

La période du cycle végétatif joue également sur la proportion de chaque composé chimique qui compose son huile essentielle. En effet, l'étude de l'influence du facteur climatique sur la production d'huile essentielle nous a permis également d'observer que tous les composés sont susceptibles de voir leur concentration varier à travers les saisons. Nous prenons comme exemple pour ça la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* qui a montré des variations très importantes en termes de pourcentages des composants de l'huile essentielle (Tableau 6) (Figure 19).

Tableau 6 : l'influence du climat sur l'abondance des composés majoritaires dans l'HE de *M.pulegium*.

Composés	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
Eucalyptol	32,7	30,5	25,9	18,7	16,9	12,1
Menthone	23,1	27,2	29,8	30,5	32,5	34,2
Néo-menthol	19,8	22,9	32,5	35,8	25,5	23,7
Pulégone	5,9	6,5	9,1	12,9	15,8	15,9
Composés	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre
Eucalyptol	6,7	3,5	2,1	1,9	0,8	28,2
Menthone	36,6	40,5	39,8	32,4	29,6	25,1
Néo-menthol	20,9	14,8	10,3	9,8	7,3	15,4
Pulégone	17,9	21,2	28,6	32,8	40,7	17,3

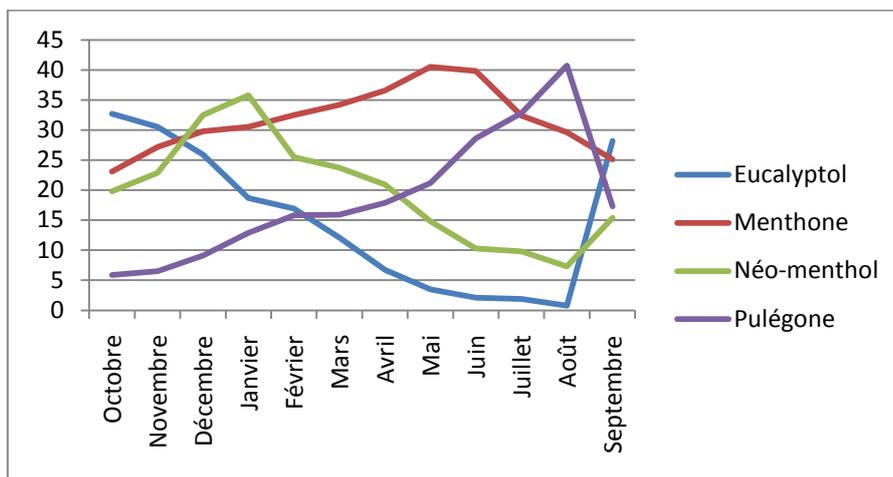


Figure 19 : influence du cycle végétatif sur l'abondance des composés majoritaires

La majorité des travaux réalisés sur la composition chimique de l'huile essentielle de *M. pule-gium* ont montré que celle-ci est caractérisée par la prépondérance du pulégone accompagné d'autres cétones mono terpénique tel que : menthone, isomenthone, pipériténone [201]. En effet la présence du pulégone comme composé majoritaire rend cette huile toxique ce qui limite son utilisation dans l'industrie. Néanmoins l'étude de la variation de la composition chimique de cette espèce selon son cycle végétatif procure une utilisation envisageable grâce à l'abondance de deux composés très recherchés par l'industrie des arômes et parfums: l'Eucalyptol et la Men-thone. À partir des résultats obtenue nous pouvons déduire que la meilleure période de cueillette desti-née à l'obtention d'un meilleur pourcentage en Menthone est celle du printemps (Avril-Mais), par contre le pourcentage élevé en Eucalyptol sera meilleur vers le mois d'Octobre, ainsi la période de froid et pluie est favorable en terme d'augmentation en pourcentage de Néo-menthol. Ces observations montrent qu'il est possible d'étudier et de connaître les variations dans la composition chimique d'une huile essentielle, à travers les saisons et donc de définir le meilleur moment pour la récolte, par le meilleur compromis entre rendement et composition chimique, et même s'il est difficile d'expliquer l'origine de ces variations au fil des saisons, elles sont bien connues et permettent donc d'adapter la période de récolte selon l'intérêt que l'on porte à l'huile essentielle et l'utilisation finale que l'on souhaite en faire. Néanmoins et afin de pouvoir maîtriser ces variations, il est impératif de faire un travail expérimental d'optimisation suivant la région dans laquelle la plante est cultivée. C'est cette méthodologie que nous mettons en avant dans cette approche.

5.6. Facteurs environnementaux

Il existe une multitude de facteurs extérieurs à la plante qui sont susceptibles d'influencer son développement : pluie, température, humidité, cycle de vie, ensoleillement, vents, nature du sol... Ces facteurs peuvent ainsi faire grandement varier d'une façon quantitative et qualitative l'huile essentielle produite, ce qui peut avoir des répercussions importantes sur le marché mondial.

Les métaux lourds (Plomb, cadmium, mercure, zinc, nickel, cuivre...) sont également à prendre en compte car ils peuvent jouer sur le développement de la plante et poser des problèmes de qualité finale en se retrouvant dans l'huile essentielle extraite [202]. Ainsi une baisse de l'humidité dans l'environnement de la plante diminue sa croissance et entraîne d'importantes modifications biochimiques et métaboliques, affectant la qualité de l'essence. C'est le cas de la menthe poivrée qui a été depuis longtemps le sujet de nombreuses études ou il a été démontré l'effet des agressions extérieures sur le développement de cette espèce. En effet, Eugène Charabat a décrit en 1908 dans *Le parfum chez la plante* les conséquences du parasitisme par un acarien dans les champs de menthe poivrée (*Mentha piperita* L.) des environs de Grasse (Alpes-Maritimes). Il y détaille les transformations morphologiques des plants touchés mais également les conséquences sur l'essence. Celle-ci y est plus abondante mais décrite comme de moindre qualité. Chez les plantes touchées (dites « basiliquées » en raison de leur morphologie), l'essence est enrichie en éther mais les cétones (menthone) n'y sont plus qu'à l'état de traces, lorsqu'elles sont détectables [74]. Concernant la menthe poivrée algérienne, la nature du sol, le climat méditerranéen et les conditions environnementaux nous ont permis la caractérisation d'un nouveau chémotype riche en linalol et acétate de linalyle, qui sont des composés très recherchés par l'industrie des parfums pour leurs odeurs caractéristiques, ainsi et dans ce même contexte d'influence des conditions environnementales sur l'huile essentielle, l'étude que nous avons effectué sur les changements des pourcentages des composés majoritaires selon le climat a montré que ces deux derniers varient beaucoup jusqu'au moment où l'acétate de linalyle devient majoritaire à la place du linalol (Tableau 7), Ceci affirme l'influence de ce facteur sur la variabilité de la composition chimique d'une huile essentielle.

Tableau 7 : l'influence des conditions environnementales sur l'abondance des composés majoritaires de l'huile essentielle de *M. piperita*.

Composés	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
Eucalyptol	3.7	2.9	1.5	3.7	5.1	5.6
Linalol	51.3	50.9	44.2	40.2	34.7	30.9
α -terpinéol	8.9	7.6	7.1	6.9	2.7	3.3
Acétate de linalyle	17.9	18.2	19	20.1	38.5	39.2
Composés	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre
Eucalyptol	6.4	7.5	4.3	4.0	3.9	3.9
Linalol	30.8	39.6	50.2	52.1	53.4	59.4
α -terpinéol	5.1	6.2	8.1	9.2	10	9.1
Acétate de linalyle	40.6	35.2	15.4	14.1	12.4	17.3

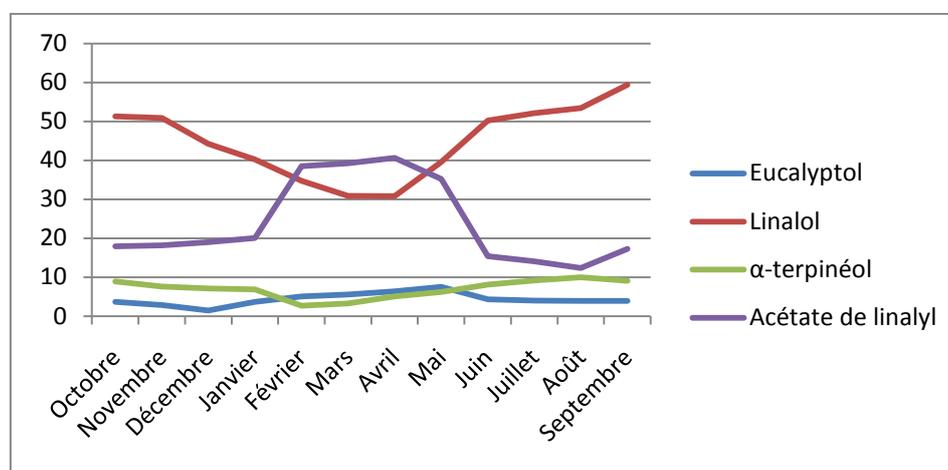


Figure 20 : influence des conditions environnementales sur l'abondance des composés majoritaires de l'HE de *M. piperita*

Ainsi pour l'industrie des parfums il serait intéressant d'avoir une huile essentielle riche en acétate de linalyle, ce qui induit une récolte et une distillation de cette plante entre février et avril.

6. Étude de la composition chimique des hydrolats

Considérée par l'industrie comme une eau florale, l'hydrolat contient en petite quantité des composés volatils semblables à ceux présents dans l'huile essentielle, ainsi on pourra même retrouver des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile. La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles : les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps quasi absents. Certains hydrolats présentent une plus grande proportion de molécules lipophiles comme ceux de *Mentha piperita* ou *Melissa officinalis* [203].

Afin de pouvoir effectuer l'analyse de la composition chimique des hydrolats par CPG/GC-MS, il est nécessaire de concentrer l'hydrolat avant l'injection, en procédant à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique (l'éther diéthylique). L'analyse des extraits d'hydrolats des différentes espèces étudiées a donné un profil chimique proche à celui de l'huile essentielle et parfois même plus intéressant, c'est le cas de l'hydrolat de *M. spicata* qui a présenté un profil chimique riche en carvone et ces dérivés qui étaient absents dans l'HE (carvone (41%), le dihydrocarveol, le néo-dihydrocarveol (17,71%), le Z et E-dihydrocarvone (14,35%) et le trans carvéol (10%). Ainsi on note la présence de certains composés qui étaient totalement absents dans les HE des espèces *M. rotundifolia*, *M. pulegium*, *M. piperita*, et *chrysanthemum coronarium* tel que : l'acétate de carvone (8.4%), la verbénone (8.5%), l'elemol (12.5%), et le yomoji alcool (2.5%) respectivement (figure 21).

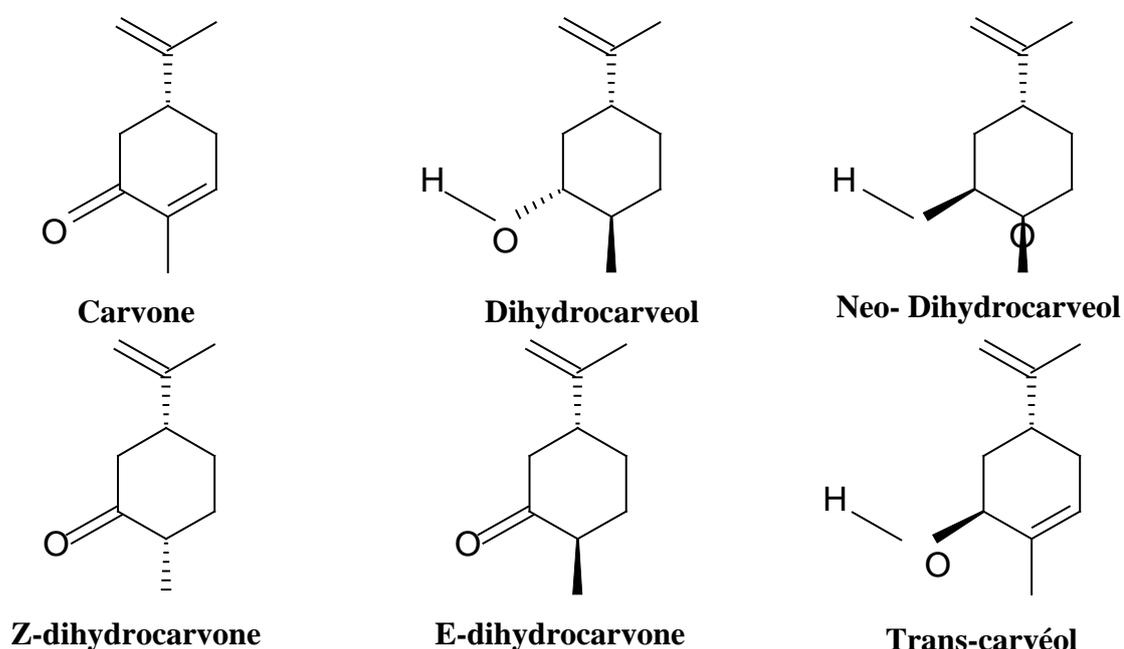
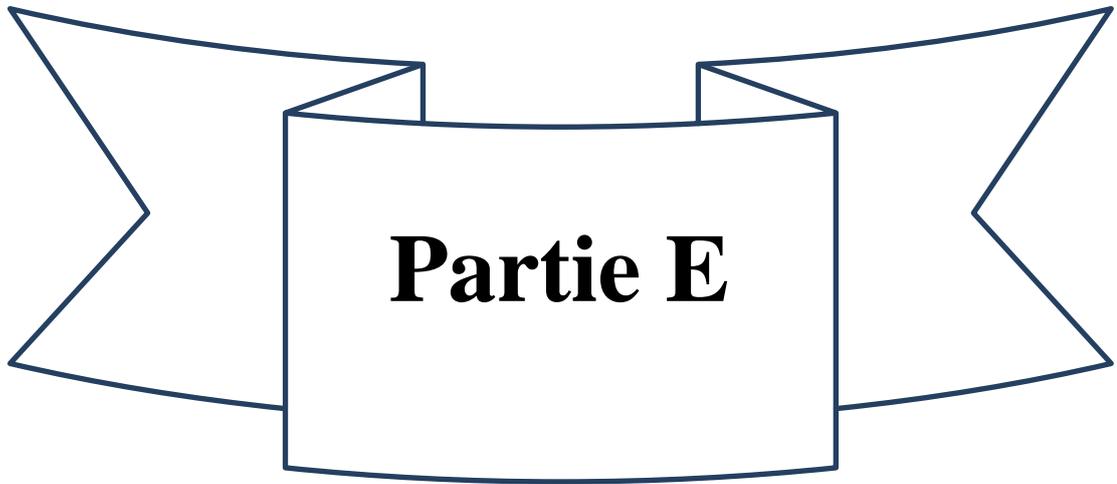


Figure 21 : les dérivés de la carvone présent dans l'hydrolat de *M. spicata*



VALORISATION DES HUILES ES-
SENTIELLES
ACTIVITES BIOLOGIQUES

« *Malheureusement, aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique produit le principe actif par synthèse chimique et le vend plus cher, malgré le pharmacien. Pourtant, parfois l'expérience nous montre que la molécule synthétisée n'est pas aussi efficace que le mélange de substances extraites, car il existe une espèce d'émulation entre les différents produits. En plus, elle risque d'entraîner une résistance des bactéries, alors qu'un assemblage de produits naturels n'en engendre pas.* » Jean-Marie Pelt [204].

Ces dernières décennies, le développement de l'industrie agroalimentaire spécialement le secteur des aliments cuisinés, a poussé les industriels à rechercher de plus en plus des pratiques physiques telles que la conservation par le froid, le conditionnement sous atmosphère inerte, l'utilisation des fongicides...etc., afin de limiter les altérations qui peuvent être causées lors du processus de fabrication et de stockage. Bien que les différentes substances chimiques utilisées pour ces fins leur ont permis de limiter ces pertes de produits finis, l'utilisation de ces substances a aussi un impact sur l'environnement et la santé humaine [205]. Par ailleurs, certains microorganismes ont développé des mécanismes de résistance rendant plusieurs molécules antimicrobiennes inutiles. Enfin, de manière indirecte, certaines substances synthétiques convertissent des matières ingérées en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant l'activité des enzymes microsomaux [206]. Par conséquent, la demande en aliment sans conservateur ou en possédant une faible concentration est de plus en plus importante, ce qui mène l'industrie à rechercher des alternatives plus saines et éco-conçues. Il existe à ce sujet, un intérêt particulier pour les polyphénols et phénols [207], [208], lesquels sont solubles dans l'eau et ont des propriétés de chélation avec les métaux, ce sont des antioxydants ayant des propriétés redox qui leur permettent d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et de capturer les molécules d'oxygènes singulets [209]. Leur importance dans le régime alimentaire humain et leur activité antimicrobienne a été établie durant les vingt dernières années.

Dans ce contexte les HE constituent aussi une source potentielle de ces familles moléculaires, elles font l'objet de nombreuses études concernant leurs éventuelles utilisations en tant qu'antioxydant, antibactérien et antifongique. Le nombre étudié est d'ailleurs inversement proportionnel aux applications que l'on peut trouver à l'échelle industrielle. Formées d'un mélange complexe de molécules, mono, sesqui et parfois di terpénique, les huiles essentielles constituent une véritable source d'agents actifs contre les bactéries et champignons. En effet de nombreuses études démontrent la relation entre la composition chimique des HE et leurs activités sur les microorganismes ainsi que leur effet additionnel en tant qu'antioxydant, ce qui constitue une option polyvalente intéressante pour combattre la détérioration de l'aliment par des microbes ou par les radicaux libres, ainsi leur utilisation en tant qu'antimicrobiens s'inspire de leur rôle au sein de la plante face aux phytopathogènes. En effet plus la complexité moléculaire de l'HE est élevée

plus elle constitue un obstacle important pour l'adaptation pathogène que ne le ferait un mélange simple de monoterpènes.

Les extraits de plantes aromatiques (c'est-à-dire les huiles essentielles et leurs composants, les essences, et les hydrolats) habituellement utilisés en tant qu'arômes alimentaires sont de ce fait également utilisés en tant qu'additifs alimentaires et ce d'autant plus facilement qu'ils sont pour la plupart classés « généralement connue comme sains » et approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration (service du gouvernement américain responsable de la pharmacovigilance, c'est-à-dire des études, du contrôle et de la réglementation des médicaments avant leur commercialisation) [9] [210].

1. Activité antioxydante

Avec l'expansion du commerce des plats cuisinés, les services publics de santé autorisent l'ajout de plus en plus important d'additifs. Cependant, leur utilisation dans les formulations doit apporter une valeur ajoutée aux aliments sans être préjudiciable à la santé humaine. Les antioxydants sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, de retarder la peroxydation lipidique (une réaction qui peut être accélérés par plusieurs paramètres comme la présence de radicaux libres oxygénés (RLO), une température élevée, la présence de lumière solaire ou bien encore la trace de métaux de transition), sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire. L'antioxydant alimentaire idéal devra donc répondre à un cahier de charges relativement complet en étant soluble dans les graisses, efficace à faible dose, non toxique, n'entraînant ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable. Il devra être résistant aux différents processus technologiques susceptibles d'être appliqués au produit alimentaire et, pour terminer, il devra être stable dans le temps [211].

Afin d'utiliser les HE en tant qu'antioxydants alimentaires, il convient d'évaluer l'efficacité antioxydante de ces dernières, afin de limiter leurs ajout aux doses strictement indispensables aux objectifs de préservation à atteindre.

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits d'hydrolats des différentes espèces étudiées dans cette thèse a été réalisé en utilisant trois différentes méthodes :

L'évaluation de l'activité anti radicalaire par (DPPH), la réduction des ions ferreux (FRAP) et le blanchissement du β -carotène.

1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Afin d'étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picrylhydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance [64]. Selon le protocole décrit par Mansouri et al (2005), avec des légères modifications qu'on a apporté, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,6 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Des solutions à différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat ou standard (BHT) sont ajoutées à un volume complémentaire de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{AAR\%} = [\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{48\text{h}} (\text{BHT})] \times 100.$$

Calcul des IC₅₀ :

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (*Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés.

1.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), ainsi la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Le protocole expérimental utilisé est celui de Wang et al 2008 et Oyaiza 1986 avec une légère modification où : 2,5ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 0,5 ml d'une solution tampon phosphate (pH= 6.6) et 0,5 ml d'une solution de potassium ferrocyanide à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1 ml du surnageant sont ajoutés à 0,5 ml d'eau distillée et 0,3ml d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃) à 0.1%.

Après incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [65].

1.3. Test de blanchissement du β -carotène

Ce test est basé sur l'oxydation couplée du β -carotène et de l'acide linoléique solubilisés dans une solution aqueuse de tensioactifs tween-20. Il consiste à mesurer la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique. L'addition d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du β -carotène. Ce test permet de déterminer un pourcentage d'inhibition. Le β -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation. Or l'ajout d'un second antioxydant va permettre sa préservation, et c'est cette protection qui va être mesurée.

La méthode décrite par Tepe et ces collaborateurs (2005) a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 20 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur et 100 ml d'eau oxygénée sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

À 2,5 ml du mélange précédent, 350 μ l de chaque extrait ont été ajoutés (à une concentration de 2 mg/ml dans le méthanol). Les tubes à essai ont été incubés en obscurité à la température du laboratoire. Deux tubes contrôle ont été aussi préparés avec la même procédure, l'un contenant un antioxydant de référence BHT (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol [66].

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{échantillon})/\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{BHT})] \times 100.$$

N.B : le BHT est utilisé comme contrôle positif, dans les deux méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydantes (DPPH et blanchissement du β -carotène), et aux mêmes conditions expérimentales.

Compte tenu de la nature diversifiée des antioxydants, ainsi que de la complexité des processus d'oxydation, les valeurs de la capacité antioxydante d'un composé diffèrent d'un test à l'autre, ce qui rend impossible la comparaison entre les méthodes et, de ce fait, une certaine standardisation. Le plus souvent, pour avoir une indication aussi précise que possible de la capacité antioxydante d'un échantillon, il faudra combiner les réponses des tests susceptibles d'être réalisés. Dans ce contexte nous avons choisis de présenter les résultats les plus pertinents des extraits ayant un pouvoir antioxydant élevé.

L'évaluation de l'activité antioxydante de tous les échantillons traités a été réalisée en utilisant les gammes de concentration avec lesquelles l'activité antioxydante des extraits isolés a été mesurée pour définir leur IC₅₀. Pour ce qui est du genre *Mentha*, la comparaison des résultats a été faite entre les espèces cultivées (*M. piperita* et *M. spicata*) et celle poussant à l'état spontané (*M. rotundifolia* et *M. pulegium*).

Le pouvoir antioxydant le plus élevé a été attribué aux extraits d'hydrolats de *M. rotundifolia* et *M. piperita* qui avaient une concentration minimale inhibitrice contre la formation des radicaux libres de l'ordre de 2.27 µg/ml et 2.47 µg/ml respectivement contre 7.36 µg/ml du control BHT. Ainsi concernant le test de blanchissement du β-carotène, on constate que le BHT et tous les extraits testés inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation (Tableau 8).

Tableau 8 : Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.rotundifolia*.

Échantillons	Activité antioxydante						IC ₅₀
	Concentration de l'extrait (µg/mL)	1	5	15	25	50	
HE <i>M. rotundifolia</i>	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	9.65	11.53	15.23	19.43	66.43	40.87
	Inhibition du DPPH	29.29	36.17	45.44	54.26	79.35	40.90
Ex HY <i>M. rotundifolia</i>	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	49.25	57.33	67.53	77.01	91.54	0.51
	Inhibition du DPPH	45.22	78.26	89.22	91.85	96.85	2.27
HE <i>M. piperita</i>	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	21.74	31.78	39.97	31.78	21.74	33.38
	Inhibition du DPPH	29.23	39.15	49.43	59.83	81.4	17.44
Ex HY <i>M. piperita</i>	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	9.52	19.63	25.19	40.19	70.91	33.14
	Inhibition du DPPH	43.08	53.34	62.07	75.92	86.88	2.57
BHT	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	49.55	55.59	75.36	85.46	98.23	0.62
	Inhibition du DPPH	18.55	30.40	35.95	55.85	64.69	7.36

À partir des résultats cités ci-haut, on remarque que pour les différents tests réalisés, l'activité antioxydante la plus élevée est à chaque fois attribuée à l'extrait d'hydrolat, en la comparant avec l'huile essentielle, ces résultats ouvrent une perspective intéressante pour l'utilisation de ces extraits dans les différents domaines tel que l'agroalimentaire, la cosmétique et dans l'industrie

pharmaceutique dans la mesure où les agents de conservation chimiques pourraient être remplacés par des hydrolats tant que l'impact organoleptique de ceux-ci demeure acceptable.

S'agissant du troisième test utilisé pour la détermination du pouvoir antioxydant, la méthode de FRAP consiste à une réduction du complexe ferrocyanure de potassium en sa forme Fe^{2+} . Ce test est rapide et donne des résultats reproductibles pour des solutions biologiques ainsi que pour des solutions pures d'antioxydants où la réaction est indépendante de la concentration car la réponse est linéaire, ceci est bien illustré dans les résultats obtenue en comparant le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des trois sous-espèces de *Thymus ciliatus*, ou une augmentation de la réduction du fer été proportionnelle aux concentrations utilisées.

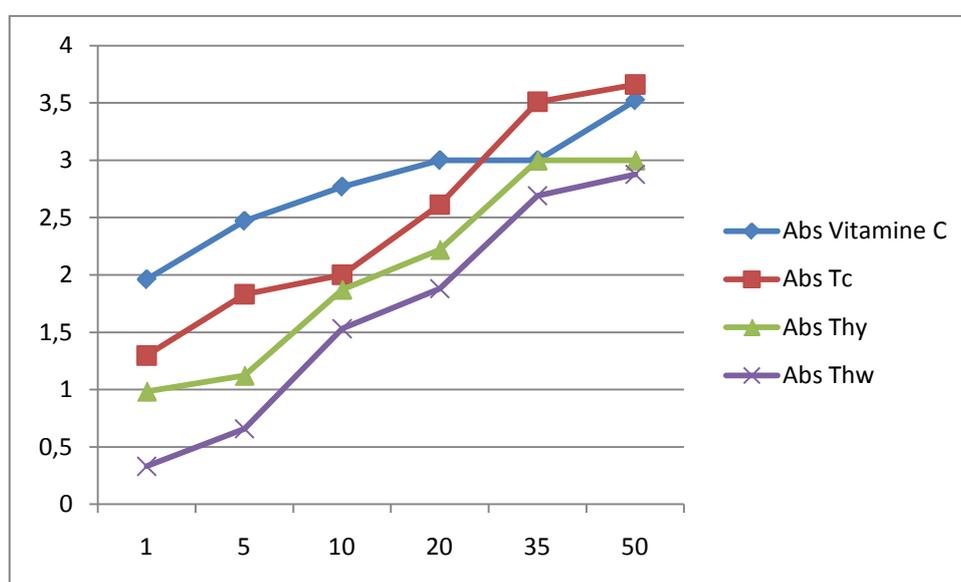


Figure 22 : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP des huiles essentielles des sous-espèces de *Thymus-ciliatus*.

Tc : *Thymus-ciliatus* ssp *eu-ciliatus* ; **Thy** : *Thymus-ciliatus* ssp *munbyanus* ; **Thw** : *Thymus-ciliatus* ssp *coloratus*

Selon les résultats illustrés dans la figure ci-dessus, pour les différentes concentrations des huiles essentielles des trois sous-espèces étudiées, nous observons que l'activité antioxydante augmente avec la concentration utilisée. Néanmoins on a remarqué que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* a chémotype carvacrol a été caractérisée par le pouvoir antioxydant le plus élevé et qui a été même meilleur que celui du témoin acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur important observé pour les différentes huiles testées peut être attribué à la présence du groupement hydroxyle qui peut servir comme donneur d'électron. Quelques études antérieures ont montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle, cependant la synergie entre les différents cons-

tituants de ces huiles peut aussi jouer un rôle très important vis-à-vis de l'action des huiles essentielles comme des réducteurs et inactiveur des molécules oxydantes présentes dans un extrait. Plusieurs études ont été intéressées par l'étude de la relation structure-activité pour essayer de comprendre le mécanisme d'action des molécules responsables de l'inhibition des radicaux libres. À notre tour nous avons essayé d'expliquer cette relation en étudiant le pouvoir antioxydant des composés purs de quelques espèces étudiées (Tableau 9).

Tableau 9 : Concentration inhibitrice du radical DPPH par les composés purs

Composés	Carvacrol	Pulégone	Linalol	Carvone	α -terpinéol	Terpinène-4-ol	BHT
IC50	3.32	5.66	23.2	6.59	8.31	19.72	7.36

Pour des concentrations de (50, 20, 10, 5, 1 μ l/ml), la concentration inhibitrice de 50% du radical libre DPPH a été meilleure pour le carvacrol, pulégone, carvone et le terpinène-4-ol en la comparant avec l'antioxydant de référence le BHT.

À partir de ces résultats on peut suggérer que la présence de ces composés dans nos extraits étudiés (huiles essentielles et extraits d'hydrolats), est responsable du fort pouvoir antioxydant enregistré pour les différentes concentrations utilisées. Il est toutefois important de signaler que ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [212].

2. Activité antibactérienne

Les effets antibactériens de différentes espèces de plantes sont connus depuis longtemps et sont utilisés de façon empirique en désinfection ou pour augmenter la durée de conservation des aliments. Généralement, les propriétés biologiques des plantes sont directement liées à la composition des huiles essentielles qui sont constituées d'un mélange complexes de substances appartenant à diverses classes de la chimie organique. En effet l'activité antibactérienne est le résultat des groupes fonctionnels présents dans ces métabolites et de leurs synergies. Les plus actifs de ces groupes fonctionnels sont : phénols >aldéhydes > cétones> alcools>éthers>hydrocarbures [9].

Le spectre d'action des HE est très étendu, elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est, par ailleurs, variable d'une HE à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre.

La plupart des HE étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Lamiaceae* : thym, origan, lavande, menthe... Cependant le coefficient antibactérien le plus élevé est attribué aux phénols (plus de 90% des bactéries pathogènes y sont sensibles) carvacrol, thymol, eugénol... Ces molécules sont des anti-infectieux puissants et polyvalents, à la fois antibactériens, antiviraux, antifongiques, et immunostimulants [11].

De nos jours, l'étude des activités biologiques des huiles essentielles représente le meilleur moyen pour les valoriser commercialement ou d'expliquer leurs utilisations en médecine traditionnelle.

Les diverses études menées dans ce domaine ont montré la diversité des méthodologies employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des HE. Le choix des techniques utilisées pour déterminer leur activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats. L'insolubilité des constituants des HE dans l'eau et leur volatilité constituent les principales difficultés rencontrées. Les techniques classiques mise en point *in vitro* permettent soit de caractériser le pouvoir antimicrobien soit de le quantifier en terme de concentration minimale inhibitrice. Les différents protocoles peuvent être classés selon la nature de contact de l'HE avec le germe.

2.1. Méthode par diffusion sur milieux solide (méthode des disques)

Il s'agit d'une méthode qualitative permettant de tester la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux HE par contact direct. L'évaluation technique de l'activité antibactérienne des HE est l'aromatogramme, semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotique appelée « méthode des disques ». La suspension microbienne est d'abord inoculée et ensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Un disque de papier-filtre de 6mm de diamètre imbibé d'HE diluée dans le solvant est juste après plaqué sur la surface de la gélose ensemencée et les boîtes de Pétri sont alors incubées dans les conditions optimales de température et de temps du micro-organisme considéré. Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme de colonie visible à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres, incluant le diamètre du disque. Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires : un témoin négatif avec le solvant ayant servi à la solubilisation des HE, et un disque d'antibiotique comme témoin positif.

2.2. Méthode sur milieux liquides

Il s'agit de la méthode en bouillon de culture dans une série de tubes à essais, appelée « méthode de dilutions » dont le but est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien qui

inhibe la croissance de la bactérie testée (la concentration minimale inhibitrice : CMI). Cette technique est appliquée aux micro-organismes considérés ayant présenté une sensibilité aux HE par la méthode précédente.

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension microbienne est testée à des concentrations variables de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture liquide. Une dilution en cascade de l'agent inhibiteur est effectuée directement dans le bouillon qui servira à la culture. La gamme de tubes est ensuite inoculée par le micro-organisme test puis incubée.

Pour les tests standards, nous considérons qu'une huile essentielle, fraction ou molécule est active pour une souche donnée pour une CMI inférieure à 1000 µg/mL [213].

Les activités antimicrobiennes et antifongiques des plantes étudiées dans ce travail de thèse ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec nos collègues microbiologistes du laboratoire CRILOBE de Perpignan (France), et l'équipe du Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement, LAMAABE de l'université de Tlemcen. Les résultats obtenus sont très prometteur pour la plupart des espèces étudiées, le tableau 10 regroupe l'ensemble des huiles essentielles ayant le potentiel antimicrobien le plus fort en comparaison avec le témoin Gentamicine (Figure 23).

Les diamètres d'inhibitions (DI) ainsi que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont présentés dans les tableaux 10 et 11 respectivement.

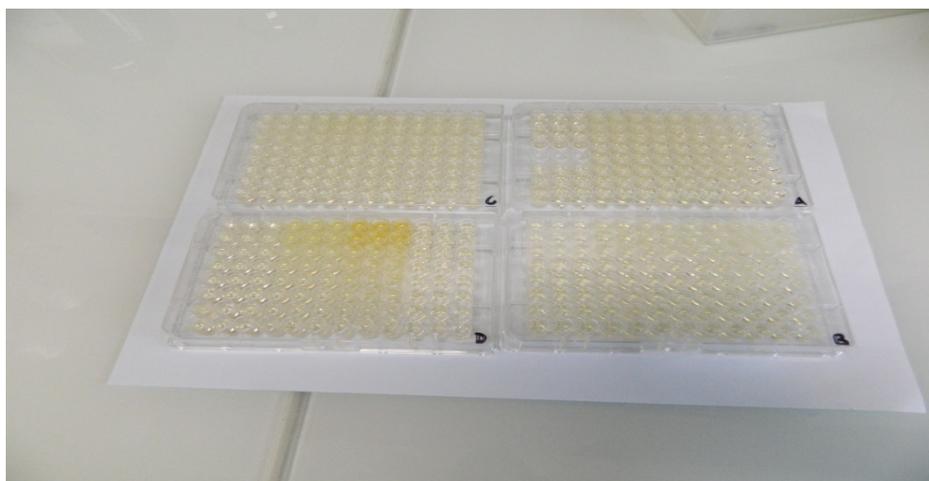


Figure 23 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

Tableau 10: Méthode par les disques (zones d'inhibitions en mm)

	MRO ₁	MRO ₃	MRO ₂	MPI ₁	MPI ₂	MPU ₁	MPU ₂	Gent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	6	6	6	6	6	6	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	8	8	8	10	8	6	8	20
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	6	8	9	10	11	6	19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	28	28	30	18	9	11	21
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	13	14	12	17	12	12	26	20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20	11	10	8	12	20	8	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24	30	30	30	30	18	30	21
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	10	9	18	6	9	11	9	18
	MSP ₁	MSP ₂	TH1	TH2	TH3	CD	CC	Gent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	6	8	6	6	6	6	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	6	8	14	12	6	6	6	20
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	9	8	11	11	10	6	6	19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9	12	32	28	9	6	6	21
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	12	20	30	22	18	10	11	20
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13	13	11	38	11	14	15	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	28	30	30	30	30	18	30	21
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	9	25	18	21	6	6	6	18

MR : *Mentha rotundifolia* ; MPI : *Mentha piperita* ; MPU : *Mentha pulegium* ; MS : *Mentha spicata* ; TH1 : *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* ; TH2 : *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* ; TH3 : *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus* ; CC : *Chrysanthemum coronarium* var *coronarium* ; CD : *Chrysanthemum coronarium* var *discolor*.

MRO₁ (piperitenone) ; MRO₂ (pulégone) ; MRO₃ (menthone) ; MPI₁ (linalol) ; MPI₂ (linalol + linalylacétate) ; MPU₁ (menthone) ; MPU₂ (pulégone) ; MSP₁ (carvone) MSP₂ (limonene) ; TH₁ (carvacrol) ; TH₂ (camphre) ; TH₃ (α -terpenyl acétate).

Tableau 11 : Méthode par les CMI : (Concentrations Minimales Inhibitrices des HE et de la Gentamicine en mg/ml)

	MRO ₁	MRO ₃	MRO ₂	MPI ₁	MPI ₂	MPU ₁	MPU ₂	Gent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	0.004
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	-	-	-	-	-	-	-	0.004
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2	-	2	2	1	-	1	0.004
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	0.0625	0.0625	0.0625	0.125	2	2	0.004
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	0.5	0.25	0.5	0.125	0.5	0.0625	0.5	0.002
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.125	2	2	-	0.5	-	0.125	0.004
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.125	30	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.125	0.002
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	2	-	0.125	-	-	-	2	0.004
	MSP ₁	MSP ₂	TH1	TH2	TH3	CD	CC	Gent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	0.004
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	-	-	0.25	-	-	-	-	0.004
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2	2	1	11	2	-	-	0.004
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	0.5	32	0.0625	2	-	-	0.004
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	0.5	0.125	0.0625	0.125	0.125	2	11	0.002
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.5	0.5	2	0.0625	2	0.25	0.25	0.004
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.125	0.0625	0.002
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	0.125	0.125	0.125	-	-	-	0.004

MR : *Mentha rotundifolia* ; MPI : *Mentha piperita* ; MPU : *Mentha pulegium* ; MS : *Mentha spicata* ; TH1 : *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* ; TH2 : *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* ; TH3 : *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus* ; CC : *Chrysanthemum coronarium* var *coronarium* ; CD : *Chrysanthemum coronarium* var *discolor*.

MRO₁ (piperitenone) ; MRO₂ (pulégone) ; MRO₃ (menthone) ; MPI₁ (linalol) ; MPI₂ (linalol + linalylacétate) ; MPU₁ (menthone) ; MPU₂ (pulégone) ; MSP₁ (carvone) MSP₂ (limonene) ; TH₁ (carvacrol) ; TH₂ (camphre) ; TH₃ (α -terpenyl acétate).

Les huiles essentielles des menthes et des thyms ont présenté des activités microbicides importantes contre les bactéries du genre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 11778, avec des diamètres d'inhibitions allant de 14 jusqu'à 30 mm contrairement aux bactéries du genre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633, qui ont montré une résistance envers toutes les huiles testées. Les deux variétés de l'espèce *chrysanthemum coronarium* ont présenté une activité faible vis-à-vis à toutes les bactéries testées.

Les CMI enregistrées ont été très remarquables pour les espèces de menthes et de thyms en les comparants avec le témoin la Gentamicine (0.004 mg/ml), ou certaines bactéries ont été inhibées à partir de la concentration de 0.0625mg/ml.

En comparant les résultats des activités des quatre espèces de menthes, on remarque que les trois espèces qui ont montré le plus grand pouvoir inhibiteur sont : MRO3, MPI2 et MSP2, ceci est dû à leurs profils chimiques riches respectivement en : Menthone, Linalol, et Limonène. En ce qui concerne les trois espèces de *Thymus ciliatus* étudiées, le meilleur pouvoir bactéricide est attribué à l'espèce qui a comme composé majoritaire le camphre (*Thymus ciliatus* ssp *coloratus*), l'huile essentielle de cette dernière a eu le pouvoir d'inhiber la croissance de six bactéries avec des DI largement supérieur à ceux de la Gentamicine. En plus des tests réalisés sur les bactéries citées ci-haut, l'huile essentielle de l'espèce *M. inodora* (*Thymus inodorus*), a été testée sur deux autres bactéries de types Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) et deux bactéries Gram négatif (*Salmonella enteritidis* ATCC 2453 et *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525), ainsi que deux levures (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP 444). Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *M. inodora* (Desf.) Benth., a une activité intéressante contre les souches Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 33862 et ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, où nous avons enregistré les plus grands diamètres d'inhibition allant de 14 à 23 mm et les plus faibles CMI observées allant de 0,06 mg / mL à 0,5 mg / mL. Cependant, pour les levures, l'huile essentielle de *M. inodora* a montré une

activité modérée contre *Candida albicans* ATCC 10231 et IPP444 avec un diamètre d'inhibition allant de 11 à 13 mm et une CMI qui est égale à 1mg/ml [A1].

L'interprétation des résultats obtenus a eu recours à la littérature où il a été rapporté que le pouvoir antibactérien le plus élevé est attribué aux huiles essentielles contenant des molécules phénoliques tel que : thymol, carvacrol, eugénol... Cependant, d'autres familles de molécules présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes tel que: les alcools, les aldéhydes et les cétones monoterpéniques (ex: géraniol, menthol, terpinéol, myrcénol, citronellal, thujone, camphre, carvone, linalol, etc.), des phénylpropanes (ex: cinnamaldéhyde), et des monoterpènes (ex: γ -terpinène, ρ -cymène) [214].

Cette activité antibactérienne peut aussi être expliquée par l'effet synergique que peut exercer d'autres composés présents dans l'huile essentielle et même si leurs pourcentages sont minoritaires, car l'action du composé testé (huile essentielle dans notre cas) se fait par une pénétration de l'ensemble de ces composés de la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des bactéries en raison de leur caractère lipophile, ce qui engendre une difficulté dans la caractérisation du composé responsable de l'activité antibactérienne de l'HE [215]. Ces composés vont ainsi perturber la structure des différentes couches phospholipides, de polysaccharides et d'acides gras [215], [216]. Chez les bactéries, la perte de perméabilité des membranes est associée à une perte d'ions, à la réduction du potentiel de membrane, à l'effondrement de la pompe à protons ainsi qu'à l'appauvrissement des réserves d'ATP [215], ce qui provoque la destruction de la bactérie et offre un caractère bactéricide à l'huile essentielle testée.

3. Activité antifongique

Une combinaison parfaite d'un mélange de molécules complexes dotées de propriétés antifongiques et antiseptiques redoutables, les huiles essentielles ont constitué depuis les temps les plus anciens des armes très efficaces contre les levures de tout genre. Les huiles essentielles antifongiques luttent contre les infections causées par les champignons (mycoses et autres infections dites fongiques), il existe différents types de champignons dites pathogènes, nous avons ciblé dans ce travail de thèse deux genres d'entre eux :

- Les champignons nosocomiaux du type *Candida albicans* (les résultats sont présentés dans l'article [A1]).
- Les champignons phytopathogène du genre *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* et *Aspergillus niger*.
- La deuxième catégorie concerne les champignons phytopathogène spécialement ceux qui attaquent les arbres fruitiers tel que les *Moniliose*, ainsi que deux autres champignons (*Botrytis cinerea* et *Penicillium digitatum*) réputés pour être responsables de la pourriture des fruits.

La moniliose est le nom générique de diverses maladies fongiques des arbres fruitiers provoquées par diverses espèces de champignon du genre *Monilinia*, dont *Monilinia fructigena* qui s'attaque principalement aux fruits à pépins et *Monilinia laxa* aux fruits à noyaux.

Lorsque les conditions climatiques ou environnementales sont favorables, les monilioses peuvent occasionner une perte importante, ou les dégâts touchent tant les arbres et les fruits dans les vergers, que les fruits en phase de transport et de conservation, causant des pertes économiques significatives en arboriculture fruitière. De même pour *Penicillium digitatum* qui est responsable de la pourriture des agrumes et *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture des fruits, ce dernier est très polyphage, il est capable de provoquer la pourriture grise sur plusieurs centaines d'espèces végétales, il peut être à l'origine de dégâts ponctuellement importants, tant en plein champ que sous abris, en occasionnant des chancres sur les tiges, ainsi que des pertes associées aux pourritures de tissus et notamment sur fruits des espèces économiquement importantes comme la tomate, la fraise ou encore la vigne.

Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, ont été appliquées en utilisant des produits de synthèse à grande efficacité dans la défense des cultures et la protection des récoltes, mais parallèlement à leurs effets bénéfiques, ces produits ont engendré des effets néfastes, scientifiquement démontrés, sur la santé humaine et environnementale [217], [218].

En effet la prise de conscience du coût environnemental de ces pratiques et les craintes des consommateurs du danger que peuvent constituer les résidus de pesticides pour la santé humaine, font naître un intérêt grandissant pour des alternatives de lutte pour la protection des cultures.

De sa part la communauté scientifique s'est donc vue obligée de rechercher de nouveaux produits, aussi efficaces que les produits de synthèse et avec un minimum d'effets sur l'homme et l'environnement. La recherche s'est donc orientée vers les composés naturels issus des plantes comme produits alternatifs. Dans ce même contexte nous avons testé les HE des différentes espèces étudiées dans ce travail de thèse, en utilisant deux méthodes différentes : la fumigation et la diffusion.

3.1. Méthode de diffusion

Cette technique a le même principe que celle qu'on a utilisé dans la méthode de disque pour évaluer l'activité antimicrobienne ou l'HE est déposée sur un disque au milieu d'une boîte Pétri et de part et d'autre sont déposés deux champignons ce qui permet une diffusion de l'HE pour être en contact directe avec les champignons testés (Figure 24).

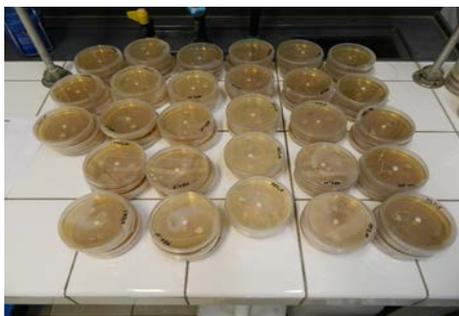


Figure 24 : Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de diffusion

3.2. Méthode de fumigation

L'activité antifongique des huiles essentielles des espèces de menthe, thym, et chrysanthème a été évaluée par la méthode de fumigation en fonction de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne. Après 7 jours de culture, six millimètres de diamètre de bouchons mycéliens de chaque souche fongique ont été placés dans une boîte de Pétri. Les huiles essentielles ont été introduites sur un disque de cellulose de 6 mm placé sur le couvercle de la boîte de Pétri. Un contrôle négatif (disque de cellulose sans huile essentielle) a été réalisé de la même manière. Les boîtes de Pétri étaient alors scellées avec du parafilm et incubées à 23 °C dans l'obscurité.



Figure 25 : Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de fumigation

La croissance radiale mycélienne a été mesurée après 3 à 7 jours d'incubation, et l'index antifongique a été calculé avec la formule comme suit:

$$\text{Indice antifongique(\%)} = 1 - (\text{Dex}/\text{Dc}) \times 100$$

Où Dex est le diamètre de la zone de croissance dans la plaque expérimentale (mm).

Et Dc est le diamètre de la zone de croissance dans la plaque de contrôle (mm).

Après un essai préliminaire pour déterminer l'indice antifongique, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour les huiles essentielles les plus actives. Dans chaque traitement, la CMI a été déterminée, avec deux répétitions pour les essais préliminaires et trois répétitions pour la détermination des CMI. Les résultats les plus pertinents sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Évaluation de l'activité antifongique sur quatre souches phytopathogènes par deux méthodes différentes

HE Souches	MS		MP		MPU		MR		TH		CC	
	D	F	D	F	D	F	D	F	D	F	D	F
<i>Monilinia fructugina</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83	79
<i>Monilinia laxa</i>	100	100	100	100	100	100	0.5	100	100	100	91	72
<i>Penicillium digitatum</i>	64.8	45.3	69	71	69	71	87	32	37	25	47	46
<i>Botrytis cinerea</i>	100	100	87	60	100	100	100	100	84	69	30	28

MS : *Mentha spicata* ; **MP** : *Mentha piperita* ; **MPU** : *Mentha pulegium* ; **TH** : *Thymus ciliatus* ; **CC** : *chrysanthemum coronarium var coronarium* ; **D** : méthode de diffusion ; **F** : méthode de fumigation
Volume HE: 5µl; C= (71× 10⁻³ µl/ml air)

L'activité antifongique réalisée par les deux méthodes (fumigation et diffusion) est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne des quatre souches phytopathogènes testées. Les résultats présentés dans le tableau ci-haut indiquent que pour une concentration de (71× 10⁻³ µl/ml air), toutes les huiles essentielles testées ont inhibé la croissance des deux champignons (*Monilinia fructugina* et *Monilinia laxa*), de même, les huiles essentielles des menthes et des thymes ont présenté une inhibition significative contre *Botrytis cinerea*, en revanche *Penicillium digitatum* est la seule souche qui a montré une résistance envers nos HE [A2].

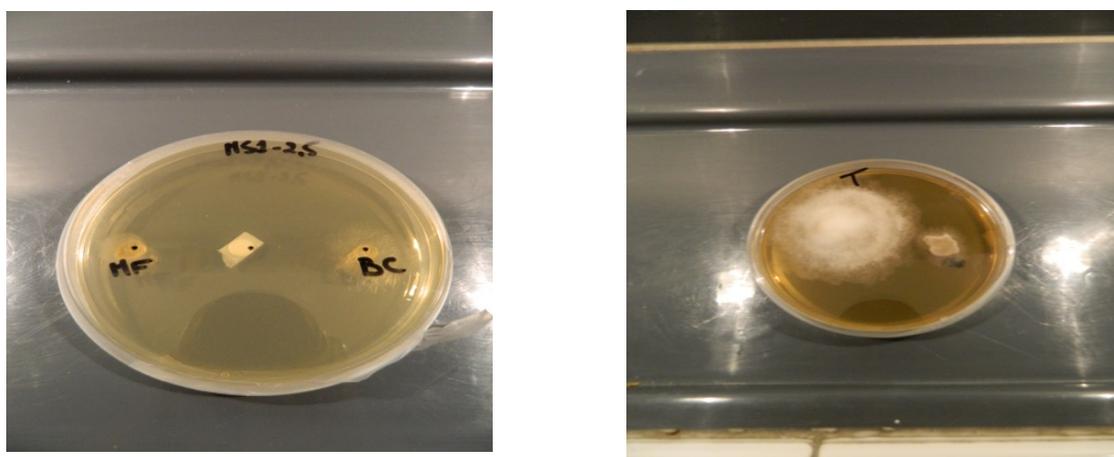


Figure 26 : Exemple d'inhibition des deux champignons *B. cinerea* et *M. fructugina* par l'HE de *M. spicata* en comparaison avec le témoin

Pour les deux concentrations utilisées (71 et $142 \times 10^{-3} \mu\text{l/ml}$ air), nos HE ont présenté une bonne capacité inhibitrice de la croissance mycélienne, cela nous a incité à déterminer la CMI de chacune de ces HE [A2].

La méthode de contact direct (diffusion) nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de nos HE, néanmoins les résultats qui nous ont le plus captivé étaient ceux trouvés par la méthode de fumigation, cette méthode a présenté des résultats très prometteur vis-à-vis de l'utilisation des HE comme des produits de traitement phytosanitaire contre les organismes nuisibles aux arbres fruitiers [A2].

D'une autre part l'HE de *M. piperita* a montré des résultats modérés contre les souches du genre *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum* et *Aspergillus niger*, avec des pourcentages d'inhibitions de l'ordre de 100%, 23% et 14% respectivement [A4].

4. Activité insecticide et larvicide

Depuis toujours les cultures sont attaquées ou concurrencées par divers parasites et ravageurs, insectes, champignons, bactéries, virus et adventices (appelées plus communément « mauvaises herbes »). Les solutions de protection des plantes, qu'elles soient d'origine naturelle ou issues de la chimie de synthèse, sont indispensables pour sécuriser les rendements et la qualité des productions. En revanche l'importance des désordres écologiques observés au cours des dernières années suite à l'utilisation abusive des produits phytosanitaires organiques de synthèse, a mis en évidence l'intérêt d'une réflexion sur des approches alternatives ou complémentaires, pour le développement durable de l'agriculture, et cela afin de contribuer à relever l'un des défis majeurs de notre siècle : offrir une alimentation saine et accessible pour tous.

Pour se faire, les agriculteurs ont eu recours aux agents phytosanitaires qui ont été utilisés depuis les temps les plus anciens et se retrouvent parmi les différentes civilisations qui en faisaient usages pour leurs propriétés médicinales et de conservations, cette pratique empirique s'est perpétuée à travers les âges.

De nos jours, ces produits sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) et présentent de nombreux avantages. Ils peuvent être aussi bien utilisés en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique, certains permettent aux plantes de résister à des stress abiotiques et d'une manière générale, ils sont moins toxiques que leurs homologues chimiques.

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ce qu'on appelle les bio-insecticides qui peuvent se définir au sens large comme des pesticides d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers, et plus généralement, tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la synthèse chi-

mique [219]. Sous ce vocable, les bio-pesticides comprennent les agents de contrôle des insectes (auxiliaires) comme les arthropodes entomophages...etc., ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures.

À notre tour nous avons choisi de tester une matrice volatile (huile essentielle) connue pour être un ensemble de molécules chimiques utilisé par les plantes aromatiques pour éloigner les maladies, et les parasites qui peuvent nuire à leur développement. Pour ce faire nous avons ciblé un ravageur qui fait des dégâts important au niveau de l'olivier : *Bactrocera oleae* sous ces deux formes (larve et mouche). Cet insecte connu sous le nom « mouche de l'olive » est responsable de dégâts substantiels dans le bassin méditerranéen et dans les zones du monde à climat méditerranéen où cette culture a été introduite. Cette mouche ne parasite que les oliviers. À une température moyenne de 25 °C, la larve éclot au bout de deux à trois jours. Cette larve est blanche dans les olives jeunes (vertes) et acquiert une teinte vineuse dans les olives mûres (noires). Elle creuse une galerie dans la pulpe de l'olive en restant à l'intérieur. L'olive attaquée vire au noir et peut tomber au sol [220] . À l'état adulte, les mouches mesurent 4 à 5 mm de long, elle perce la peau des olives pour déposer son œuf lorsque l'olive mesure 7 mm à 9 mm [221]. Le trou est peu visible à l'œil nu mais la mouche dépose une marque odorante sur l'olive où elle ne pond qu'un œuf. Elle peut ainsi piquer jusqu'à 400 olives. Plusieurs femelles peuvent piquer la même olive en cas de pullulation de l'insecte. Le cycle annuel peut recommencer dès que les jeunes olives peuvent nourrir une larve (Figure 27).

Les dégâts engendrés par la mouche de l'olive sont à la fois d'ordre quantitatif et qualitatif, néanmoins des études antérieurs ont rapporté que la puppe et la mouche sont très résistantes aux produits insecticides et aux conditions climatiques [222] .

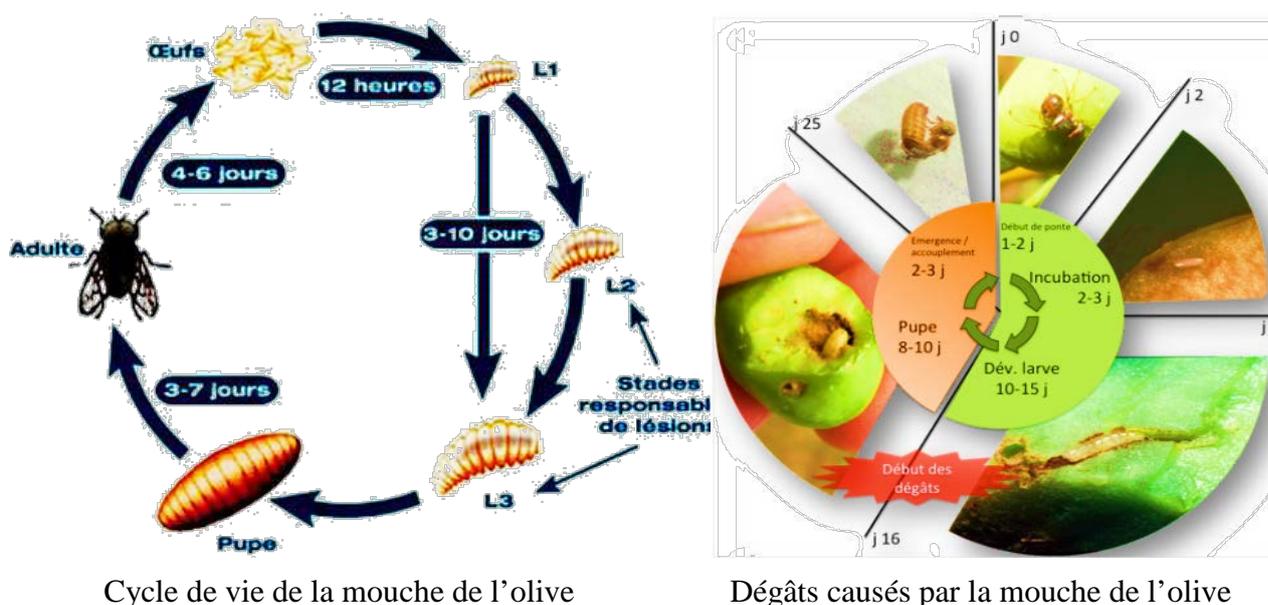


Figure 27 : cycle de vie et les dégâts causés par les différentes étapes de développement de la mouche de l'olive.

Dans le contexte de proposer des alternatives de bio-insecticide pour une agriculture saine, nous avons testé l'effet des HE des quatre espèces de menthes étudiées contre *Bactrocera oleae* par la méthode de fumigation, l'efficacité des huiles essentielles a varié selon l'espèce et selon la concentration utilisée [A4]. Les huiles essentielles de *Mentha piperita* riches en linalol et acétate de linalyle, ont présenté les résultats les plus pertinents parmi les HE testées, sur les différents stades responsables de lésion: La mouche adulte, stade L2 et stade L3 (Tableaux 12 et 13).

Tableau 12 : Taux de mortalité des mouches adultes sous l'effet de l'HE de *M. piperita*

Les concentrations	individus morts/10		
	R1	R2	R3
Tests			
Témoin	0	0	0
15µL/ml	0	1	0
20µL /ml	4	5	4
25µl/ml	9	8	8
30µL /ml	9	9	9
35µl/ml	10	10	10



Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus sont très prometteurs car on a enregistré que pour une concentration de 35µl/ml, le taux des individus morts été de 10 sur 10 mouches adultes testées. Il est a noté qu'une dose de 0,2µl de l'HE pure a donné 100% de mortalité, (10 mouches mortes sur 10) au bout des premières 5 minutes d'incubation. Ainsi, et afin de déterminer la concentration létale (CL50), nous avons fait une dilution de notre HE par le DMSO en choisissant différentes doses. Les meilleurs résultats ont été enregistrés pour les deux espèces *M. spicata* et *M. piperita* avec des CL50 de l'ordre de 0.22 et 0.27µl/L aire respectivement [A4].

Concernant l'activité larvicide, encore une fois le meilleur résultat est attribué à *M. piperita* ou le taux de mortalité des larves a atteint les 5 individus sur 10 pour les larves en stade L2 et 6 individus mort pour les larves stade L3 (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des tests de l'HE de *M. piperita* sur les larves stade L2 et L3

Concentrations $\mu\text{l/ml}$	Individus morts /10	
	Larve stade L2	Larve stade L3
Témoin	0	0
30	4	4
50	4	4
100	4	4
150	5	6

5. Activité antifongique des hydrolats :

Compte tenu des dégâts que peuvent causer les ravageurs de fruits tel que les champignons du genre *Penicillium*, les agriculteurs utilisent différents produits pour s'en débarrasser, allant des pesticides chimiques jusqu'à l'utilisation des conservateurs post-récolte pour éviter toute perte qui peut être engendrée par les champignons lors du stockage, néanmoins ces produits utilisés pour la conservation des fruits sont jugés de plus en plus néfaste pour la santé de l'homme. Dans le but de présenter des alternatives efficaces, naturelles, et surtout saines pour l'humanité, nous avons testé nos hydrolats sur quatre souches du genre *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Oryza*, *Penicillium italicum* et *Penicillium Fusarium solani* qui sont le plus souvent responsables de la pourriture des oranges, ces souches ont été utilisées séparément, et sous forme d'un mélange de ces quatre souches, le protocole expérimentale suivie été celui de Tian et al [223], avec de légères modifications, ce test repose sur deux principes (i) la protection des oranges inoculées (ii) la prévention des oranges non-inoculées, pour chaque test 5 oranges saines, de même taille et même apparence ont été sélectionnées, et partagées sur quatre groupes : un groupe de témoin positive qui contient des oranges saines non inoculées, un groupe de témoins négatifs inoculé avec le mélange de souches, le troisième groupe s'agit des oranges non inoculées lavées a l'hydrolat et le quatrième groupe est celui des oranges inoculées et lavées a l'hydrolat. Le lavage des oranges a été fait par une solution diluée d'éthanol (pour éliminer tous résidus présents sur la peau d'orange), et après séchage, les oranges ont été blessées avec un clou stérilisé à la flamme à une profondeur uniforme de 3 mm, par la suite les fruits ont été placés dans des boites en plastique et conservés a une température ambiante de 25°C. On présente dans la figure ci-dessous le résultats le plus pertinent qu'on a obtenue et qui a été enregistré par l'hydrolat de l'espèce *M.rotundifolia*, ou on a observé que dans la température ambiante de 25°C aucune incidence de la maladie n'a été remarquée après 10 jours d'incubation, pour l'ensemble des souches utilisées séparément alors que pour le mélange des souches injectées dans les oranges traitées par l'hydrolat, la contamination a été remarquée mais elle est beaucoup moins importante par rapport au témoin négatif (non traité). (Figure 28, 29).

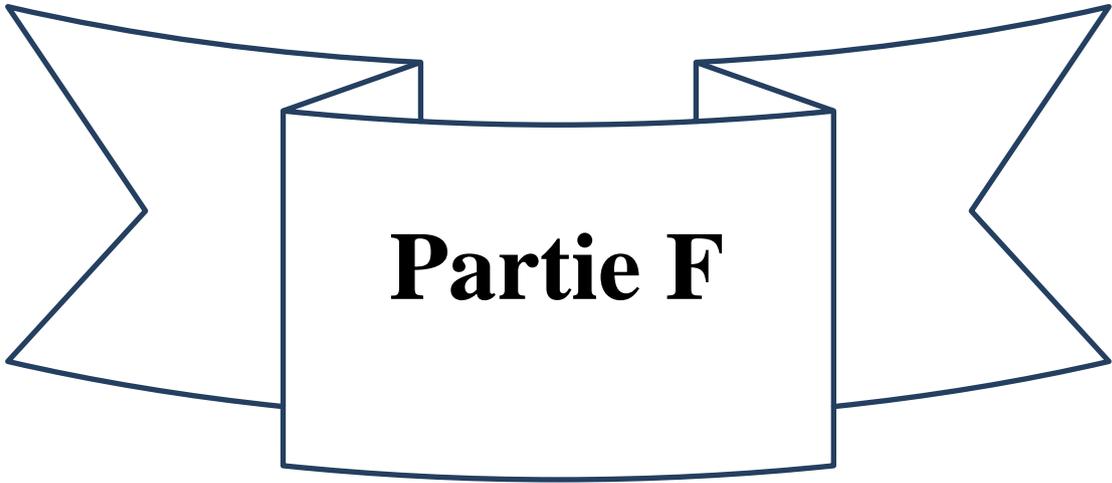
Il est a noté qu'un témoin traité à l'hydrolat a été placé à une température basse (4°C) dans une chambre froide est resté intacte sans aucune contamination pour une durée qui a dépassé les 3 mois. Cette révélation appréciable de l'activité antifongique de l'hydrolat contre les agents pathogènes qui causent la pourriture des oranges, nous procure une opportunité prometteuse vis-à-vis de l'utilisation de cette matrice comme conservateur naturel des aliments.



Figure 28: Oranges contaminées par le mélange des souches non traitées par l'hydrolat (témoins)



Figure 29: Oranges traitées par l'hydrolat et contaminées par le mélange des souches maintenus pendant 15 jours à la température ambiante.



ASPECT ECONOMIQUE

1. Contexte général

Nous avons élaboré tout au long des parties précédentes, la démarche faite pour l'analyse et l'identification d'une sélection d'huiles essentielles présentes dans notre région sur la base de l'étude de leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques.

Ce travail ne serait être complet si aucune indication ne sera donnée sur l'importance ou l'utilité que peut apporter le développement de certaines de ces espèces à l'échelle industrielles pour créer de la plus-value socio-économique.

Notre recherche bibliographique nous a permis de constater la quantité des travaux réalisés sur les huiles essentielles en Algérie. Ainsi une simple recherche bibliographique dans les cinq plateformes les plus importantes dans le domaine scientifique (ScienceDirect, Springer, Taylor and Francis, Wiley et ACS), représentant entre eux quelques 70% de la production scientifique dans le monde, nous a permis de trouver **19568** publications scientifiques traitant des huiles essentielles en Algérie, dont **13952** parues seulement dans les 15 dernières années !

Les statistiques du marché mondial des huiles essentielles, données chaque année par l'IFEAT (International Federation Of Essential Oils and Aroma Trades) et l'ITC (International Trade Centre), rapportent que durant l'année 2016, le marché mondial (Import/Export) a dépassé les 9,3 milliards de \$ en huiles essentielles brutes, et plus de 232 milliards de \$ en huiles essentielles de première transformation, avec une croissance de plus de 14,7% en 2016. L'ITC la même décrété comme le marché qui a la plus grande croissance mondiale, surtout le marché des huiles essentielles BIO qui a atteint une croissance de plus de 24% en 2016.

Pour ce qui est de l'Algérie, les statistiques de la Direction Générale des Douanes : Centre National de l'Informatique et des Statistiques (CNIS), ainsi que ceux de la Directions Générale des Forêts (DGF) et l'International Trade Centre (ITC) de 2016 révèle que l'Algérie a importé pour 21 millions de \$ en huile essentielle brute et 360 millions de \$ en huile essentielle de première transformation.

Au même titre, l'Algérie a exporté en 2016 pour 1000 \$ d'huile essentielle brute et 1,56 millions de \$ en huile essentielle de première transformation.

Ces chiffres enregistrés dans l'export ne reflète ni le potentiel dont recèle notre pays, ni la quantité importante des travaux scientifiques réalisés dans ce domaine. Néanmoins une question importante se doit d'être posée par les scientifiques dans ce domaine : Comment la recherche scientifique peut s'adapter à la réalité du marché et de l'économie algérienne et la demande des industriels dans le domaine des huiles essentielles ?

C'est à cette question qu'on a essayé de répondre dans cette thèse, et la réponse était : la recherche utile.

Ainsi l'objectif n'est plus de faire une recherche fondamentale ou une recherche appliquée, mais plutôt faire une recherche qui permet de résoudre une problématique pour le secteur socio-économique. C'est d'ailleurs dans cette thématique que le Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique vient de mettre en place les projets de recherche dans le cadre des laboratoires universitaires de recherches.

La problématique dans le cas des huiles essentielles c'est que la recherche actuelle n'est pas adaptée à la réalité du marché algérien, ou l'objectif n'est plus seulement de trouver de nouvelles molécules dans les huiles, ou identifier de nouvelles compositions, mais surtout, voir l'urgence, serait de comment aider les industriels à rechercher les meilleures huiles essentielles qui seront facilement vendus dans le marché mondial.

Pour y répondre, le volet économique de mon travail de thèse rentre dans l'objectif de répertorier et classer les meilleures compositions chimiques des différentes espèces ciblées, sur la base de l'étude de leur variabilité chimique, afin d'identifier celles présentant des compositions intéressantes l'industrie et le marché mondial des huiles essentielles et donc pouvant faire l'objet de développement à l'échelle industrielle en Algérie.

L'intérêt de cette approche est de déceler toutes spécificités pouvant être liées à notre région et ainsi donnant une originalité à ces huiles et une importance dans leur commercialisation à l'échelle industrielle.

2. Approche Intérêt Économique / Recherche Scientifique

Avec le regain d'intérêt croissant qu'ont connu les produits naturels auprès des consommateurs, au cours des dernières années, le marché mondial des huiles essentielles marque une très forte hausse de sa valorisation. La demande croissante d'arômes et de parfums provenant de diverses applications, y compris les soins personnels, les soins à domicile, les aliments et les boissons, l'aromathérapie, etc., a suscité la demande d'huiles essentielles comme ingrédients clés dans les parfums et les saveurs. On s'attend à ce que de nombreuses autres propriétés avantageuses du produit telles que antiseptique, aphrodisiaque, anti-inflammatoire, antidépresseur, antispasmodique, diurétique et tonique stimulent la demande d'huile essentielle dans des applications industrielles, médicinales et domestiques.

Le marché devrait continuer à enregistrer une croissance élevée au cours des prochaines années, grâce à l'expansion de la base d'applications de l'huile essentielle, de l'industrie des cosmétiques et des aliments et boissons aux secteurs de l'aromathérapie et des produits pharmaceutiques. Selon un nouveau rapport de Grand View Research, Inc., la demande mondiale du marché des

huiles essentielles brutes était de 178,8 kilotonnes en 2015 et devrait dépasser les 370 kilotonnes d'ici 2024. Selon le même rapport, les huiles essentielles de l'orange, la menthe, l'eucalyptus, la citronnelle, la menthe poivrée, le citron, les thym, la menthe verte, la lavande, le romarin et le géranium constituent le segment clé du marché des huiles essentielles. L'huile de menthe est l'un des produits à la croissance la plus rapide.

À l'égard de son classement comme un secteur porteur de croissance économique, et malgré les fortes potentialités que possède notre pays, la filière des huiles essentielles occupe une place très marginale en Algérie. En effet, si on prend en considération les importations croissantes d'huiles essentielles et d'extraits de plantes, nous trouvons très important d'engager cette filière dans la voie d'un développement durable qui veut concilier progrès économique, et cela en créant une relation directe entre les différents domaines de la recherche scientifique et le monde industriel. À cet effet, une approche a été développée dans ce travail de thèse, afin de mesurer le potentiel et la plus-value économique de quelques huiles essentielles jamais décrites dans la littérature, et d'autres décrites.

2.1. Huiles Essentielles jamais décrites dans la littérature

2.1.1. Cas de *Thymus inodorus*

L'huile essentielle de *Thymus inodorus* (*Micromeria inodora*) n'a jamais fait l'objet d'étude, ainsi c'est le premier rapport de la composition chimique de cette huile. Suite à notre étude il s'avère que l'huile est caractérisée par l'hydrate de trans-sesquisabinène comme composé majoritaire, ainsi que l'acétate d' α -terpényle. En vue de la littérature, c'est le premier report d'une huile essentielle avec un composé majoritaire qui est l'hydrate de trans-sesquisabinène [A1].

2.1.2. Cas d'*Inula montana*

Cette espèce est endémique à notre pays et n'a jamais fait l'objet d'étude que ce soit en Algérie ou dans le monde, la composition chimique de son HE a été caractérisée par l' α -cadinol comme composé majoritaire.

Le choix de cette espèce est porté par le fait que les huiles essentielles des espèces du genre *Inula* sont très recherchés dans l'industrie pharmaceutique, vu leur richesse en nouveaux sesquiterpènes oxygénés. C'est d'ailleurs le cas d'*Inula viscosa*, qu'on a aussi étudié dans cette thèse et qui est très utilisée en industrie pharmaceutique.

La difficulté du genre *Inula* c'est qu'il présente des huiles essentielles très complexes en terme de composition chimique, avec souvent des huiles essentielles visqueuse.

L'article sur l'étude comparative entre les deux espèces d'*Inula* est en cours de rédaction.

2.2. Huiles essentielles jamais décrites en Algérie

2.2.1. Cas de *Thymus ciliatus* ssp *manbyanus*

Cette espèce endémique de l'ouest algérien a présenté une composition chimique originale avec la présence de l'acétate d' α -terpényle comme composé majoritaire [A3].

2.2.2. Cas d'*Asteriscus maritimus* et d'*Asteriscus spinosus*

Les deux *Asteriscus* choisis dans cette thèse n'ont jamais fait l'objet d'étude en Algérie. Au même titre que les *Inules*, les *Asteriscus* sont aussi des espèces qui intéressent beaucoup l'industrie pharmaceutique. Le choix de ces deux espèces était fait pour une étude comparative entre les compositions décrites dans la littérature et celles qu'on vient de décrire pour la première fois en Algérie [A5]. Ainsi l'étude de la composition chimique des HE des genres *Asteriscus* et *Inula*, nous a permis d'identifier des familles de composés connue pour être des marqueurs d'HE tel que, les silhiperfol et les Shyobunones. En effet, cette diversité de résultats montre que les HE deviennent donc une source inépuisable de matières premières naturelles de qualité destinée à plusieurs industries (parfum, cosmétique, pharmaceutique...etc.).

2.3. Huiles essentielles décrites en Algérie et dans le monde

Les espèces sélectionnées dans cette partie étaient toutes décrites dans la littérature, en Algérie et dans le monde, mais c'était surtout des espèces très demandées dans l'industrie, au même titre, la littérature donnait des compositions chimiques parfois très différentes. C'est dans cette optique que nous avons sélectionné des espèces de menthes, de thym et de chrysanthèmes.

Il est à noter que les *Asteriscus* et les *Inules* étaient considérées comme des sous-branches de la grande famille des Chrysanthèmes, dont les botanistes ne cessent de modifier et de décomposer en nouveaux genres, ces dernières années.

L'objectif dans l'étude des menthes, des thym et des chrysanthèmes était de récupérer le maximum d'échantillons possible, afin de sélectionner les espèces ayant des compositions chimiques pouvant intéresser l'industrie des HE. À partir de là, nous avons récupéré 392 échantillons. Nous avons par la suite procédé à l'hydrodistillation de tous ces échantillons par un montage type Cle-venger, ce qui nous a permis de récupérer leurs huiles essentielles. L'identification des compositions chimiques par les différents types d'analyses (CC, CPG, CPG/SM, RMN), nous a permis de déceler des différences qualitatives dans certaines des huiles essentielles d'une même espèce, ou elles ont présenté des profils chimiques complètement différents. Au même titre, d'autres espèces n'ont présenté que des différences quantitatives dans l'abondance de leurs composés majoritaires.

Cette approche nous a permis de mettre en évidence la variabilité chimique au sein de chaque espèce, ainsi :

- *Mentha piperita* a présenté deux profils chimiques qui se différencient quantitativement dans les pourcentages de leurs composés majoritaires qui sont le linalol et l'acétate de linalyle. À noter que la littérature ne donne que rarement ces deux composés comme des majoritaires dans *Mentha piperita*.
- *Mentha pulegium* a présenté trois profils chimiques qui se différencient quantitativement dans les pourcentages de leurs composés majoritaires qui sont la pulégone, la menthone et le néo-menthol : le groupe 1 était caractérisé par un pourcentage élevé en pulégone, le groupe 2 était caractérisé par un pourcentage quasi-égal entre la pulégone et la menthone, et le groupe trois était caractérisé par un pourcentage élevé de la menthone et du néo-menthol (ce composé était très faible dans les deux premiers groupes).
- *Mentha spicata* a présenté deux profils chimiques qui se différencient quantitativement dans les pourcentages de leurs composés majoritaires qui sont la carvone et le limonène.
- *Mentha rotundifolia* est celle qui a présenté des différences qualitatives et quantitatives des compositions, ainsi quatre profils se distinguent. C'est en accord avec ce que rapporte la littérature qui indique la grande variabilité chimique trouvée dans cette espèce, mais c'est la première fois qu'on rapporte que dans une même région, on peut trouver tous ces chémotypes et qu'on peut aussi les différencier [A2].
- *Thymus inodorus* (*Micromeria inodora*) a présenté deux profils chimiques qui se différencient quantitativement dans les pourcentages de leurs composés majoritaires qui sont l'hydrate de trans sesquisabinène et l'acétate d' α -terpényle.
- *Thymus ciliatus*, présent avec trois sous-espèces dont chacune d'entre elles a présenté un profil chimique différent : la ssp. *eu-ciliatus* était caractérisée par le carvacrol, la ssp. *coloratus* était caractérisée par le camphre et le myrcène et la ssp. *munbyanus* par l'acétate d' α -terpényle.
- *Chysanthemum coronarium* est présente dans notre pays avec deux variétés (*coronarium* et *discolor*). Les deux variétés ont présenté deux profils chimiques qui se différencient quantitativement dans les pourcentages de leurs composés majoritaires qui sont le myrcène et le camphre. Il est à noter que la variété *discolor* n'a jamais fait l'objet d'étude ni dans notre pays ni dans le monde.

Une fois toutes ces compositions chimiques identifiées, et dans le cadre du projet structurant porté par l'Université de Tlemcen, par l'intermédiaire du Bureau de Liaison Entreprises Université (BLEU) et le Consortium PPAM&HE Algeria (Groupement des producteurs et transforma-

teurs des huiles essentielles en Algérie), nous avons communiqué ces résultats aux responsables du Consortium qui les ont à leur tour communiqué à des professionnels et des sociétés de négociation dans le commerce des huiles essentielles afin de nous indiquer celles qui intéresseraient le marché mondial et nous aider à orienter les agriculteurs dans le choix des espèces à cultiver. Sur l'ensemble des compositions décrites, quatre ont présenté un intérêt (deux espèces appartenant au genre *Mentha*, et deux au genre *Thymus*).

- *Mentha piperita* : le groupe caractérisé par la présence de l'acétate de linalyle comme composé majoritaire intéresserait l'industrie des parfums de luxe ainsi que celle des cosmétiques.
- *Mentha rotundifolia* : le chémotype riche en oxyde de pipériténone intéresserait l'industrie pharmaceutique qui utilise cette molécule comme un précurseur de synthèse d'hétérocycles de quelques principes actifs. Au même titre cette molécule présente des propriétés olfactives intéressantes [223].
- *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus* : cette espèce endémique à l'ouest de l'Algérie, a présenté un profil chimique très original avec la présence de l'acétate d' α -terpényle comme composé majoritaire, cet ester caractérisé par une odeur très agréable rentre dans la composition chimique de plusieurs marques de parfum de luxe, il est très recherché par l'industrie des cosmétiques et parfums.
- *Thymus inodorus* (*microméria inodora*) : étudiée pour la première fois, l'huile essentielle de cette espèce a été caractérisée par la domination des sesquiterpènes oxygénés, avec la présence de l'hydrate de trans-sesquisabinène à un pourcentage élevé. Il est à noter que la présence d'un hydrate à un pourcentage élevé procure de l'originalité à cette HE, car la présence de ce genre de molécules est généralement minoritaire dans les volatils des plantes.

Il est à noter que les professionnels ont aussi donné leur avis sur les autres espèces, en termes de choix de la meilleure composition pour chaque espèce, ainsi :

- *Mentha spicata* avec un pourcentage important en limonène lui procuré une odeur citronnée recherchée dans l'industrie ;
- *Mentha pulégium* présentant un pourcentage faible en pulégone (le groupe trois caractérisé par les majoritaires menthone et néo-menthol) était le plus intéressant ;
- *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* a présentée une composition chimique très original ou c'est le premier report du camphre comme composé majoritaire dans le genre *Thymus*.
- L'hydrolat de *Chrysanthemum coronarium* a présenté plus d'intérêt que l'huile grâce à sa richesse en cis et trans chrysanthémyle alcool, qui est une molécule avec un cycle à trois, recherchée comme un précurseur dans la synthèse des molécules anticancéreuses.

- *Inula viscosa* était intéressante mais les industriels l'évitent à cause de sa viscosité et la difficulté à la produire en grandes quantités.
- *Inula montana* a présenté un profil nouveau dont il faut approfondir pour voir ou peut-on l'utiliser.
- Les *Asteriscus* ne présentaient pas un intérêt particulier.

La suite de cette démarche était de prendre contact avec la Conservation des Forêts de la Wilaya de Tlemcen par l'intermédiaire de son parc, le Parc National de Tlemcen (PNT), avec qui l'Université de Tlemcen a une convention de partenariat, afin de solliciter le Parc pour récolter quatre espèces qui ont intéressé les membres du Consortium PPAM&HE Algeria. Ces espèces sont : *Thymus ciliatus ssp munbyanus*, *Mentha piperita*, *Mentha rotundifolia* et *Thymus inodorus*. Ces quatre espèces seront par la suite plantées dans la pépinière de *Timsedart* (Pépinière du Parc National de Tlemcen spécialisée dans la mise en culture des PPAM dans la Wilaya de Tlemcen) afin d'optimiser leur mise en culture. Le but de cette approche était de cultiver ces espèces, à l'origine sauvage, et d'étudier leurs compositions chimiques après culture. Cette approche permet aussi de protéger et faire reproduire ces espèces comme *Thymus ciliatus ssp munbyanus* qui est considérée comme une espèce très rare, voir en voie de disparition. Ainsi cela permettrait non seulement de la protéger, mais aussi de la rendre pérenne par des campagnes de plantation organisées par le Parc et la Conservation des Forêts.

Il est à signaler que le suivi de ce travail se fera dans le cadre d'une thèse de doctorat en Agronomie, assurée conjointement par le département d'Agronomie de l'Université de Tlemcen et le Parc National de Tlemcen afin d'étudier et d'optimiser tous les paramètres de mise en culture, pouvant influencer la composition chimique des huiles essentielles. Notre contribution sera d'étudier à chaque fois les compositions chimiques qui on résulte afin de les comparer avec celles qu'on a déjà trouvé. Ceci permet d'envisager des perspectives intéressantes pour la continuité de ce travail, après soutenance de ma thèse de doctorat.

La finalité de cette démarche est de pouvoir disposer à la fin de plans présentant un intérêt économique pour les producteurs des huiles essentielles en Algérie. La démarche serait que les membres du Consortium PPAM&HE Algeria, disposerait de ces plans et les cultiveraient à grande échelle pour en produire des huiles essentielles avec la certitude que ces huiles ont une plus-value économique dans le marché mondial des huiles essentielles.

Enfin il est à noter qu'une première expérimentation de plantation des PPAM sur une superficie de 20 hectares est en cours de réalisation dans la commune de Sebdou dans le cadre d'un projet expérimental mis en place par l'Université de Tlemcen, en partenariat avec les membres du

Consortium PPAM&HE Algeria et la Conservation des Forets de la Wilaya de Tlemcen, dont la quelle des tests de culture de plantes à parfums aromatiques et médicinales parmi lesquelles certaines espèces étudiées dans mon travail de thèse de doctorat seront mise en culture pour être distillées à l'université de Tlemcen.

CONCLUSIONS

La flore sauvage du bassin méditerranéen dont fait partie l'Algérie, est très riche par le nombre et la variété de ses espèces naturelles endémiques, offertes par son positionnement géographique qui lui confère, une diversification florale très originale. Néanmoins, ces espèces sont soumises à des menaces à cause de la collecte anarchique des plantes aromatiques et médicinales spécialement celles présentant un intérêt commercial.

Ce travail de thèse repose sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de 14 espèces et sous-espèces de cinq genres de plantes présentant un intérêt économique : *Mentha*, *Thymus*, *Chrysanthemum*, *Asteriscus*, et *Inula*. Ce travail de recherche repose sur plusieurs objectifs :

- Aspect scientifique : Le but était d'étudier la variabilité chimique des huiles dont les compositions chimiques (i) ne sont jamais reportées dans la littérature, et pouvant intéresser les industriels par leurs profils chimiques originaux, c'était le cas des espèces comme : *Thymus inodorus*, *Thymus ciliatus* ssp *munbyanus* et *Inula montana*. (ii) étaient déjà décrites mais présentant des compositions chimiques très recherchées par les industriels. L'objectif ici était de trouver une quelconque originalité liée à notre région, c'était le cas des espèces comme *Mentha piperita* ou l'hydrolat de *Chrysanthemum coronarium*.
- Aspect appliqué : i) de mettre en avant les activités biologiques de ces huiles pour mieux les valoriser. C'était le cas des activités liées au bio-contrôle qui ont donné des résultats très prometteurs pour la protection des arbres fruitiers, ii) de trouver des applications directes de nos huiles dans des domaines qui intéresseraient les industriels comme la parfumerie, les cosmétiques ou le domaine pharmaceutique.
- Aspect de développement : de mettre en place une méthodologie de travail basée sur une approche scientifique d'étude de la variabilité chimique pour l'identification et la sélection des meilleurs chémotype, en partenariat avec les industriels, donnant ainsi la possibilité d'aider ces industriels à relancer la filière des PPAM et des Huiles Essentielles en Algérie.

L'étude des profils chimiques des différentes fractions volatiles, nous a permis la mise en œuvre des différentes techniques d'analyses des mélanges complexes: CC, CPG, CPG/SM, RMN, afin d'identifier un nombre important d'échantillons (483 échantillons au total). L'interprétation de ces résultats nous a permis de sélectionner des composés décrits pour la première fois comme

majoritaires dans les espèces étudiées, c'est le cas de l'hydrate de trans-sesquisabinene dans l'huile essentielles de *T. inodorus* et l'acétate d' α -terpényle et le camphre dans *T. ciliatus*.

Parallèlement, nous signalons les différences trouvées dans les compositions chimiques des espèces des menthes et des chrysanthèmes comparées à celles décrites dans la littérature, ces résultats montrent que même face à des huiles essentielles désignées par le même nom botanique, la même origine géographique, ayant la même origine histologique, et le même chémotype annoncé, et extraites selon le même procédé, on peut se trouver en présence de produits très différents, une différence qui peut parfois s'avérer bénéfique, car avantagerait la commercialisation de nos HE, ayant un caractère meilleur par rapport à celles trouvées sur le marché.

L'autre fraction volatile qui a fait l'objet de notre étude était l'hydrolat, les résultats qu'a présentée cette fraction étaient très intéressants, tant au niveau de leurs compositions chimiques qu'à leurs activités antioxydantes qui étaient parfois même plus intéressantes que celles du témoin pour certaines espèces comme (*M. rotundifolia* et *M. piperita*). Cette fraction a présenté aussi des activités très prometteuses au niveau de son utilisation comme agent protecteur des fruits contre les champignons phytopathogènes.

Au niveau des activités biologiques, les huiles essentielles des différentes espèces ont été testées sur des microorganismes impliqués dans les infections nosocomiales, et sur des champignons phytopathogènes affectant les champs agricoles, et les arbres fruitiers. Des résultats très prometteurs ont caractérisé les HE essentielles des espèces de l'ouest algérien, et qui peuvent trouver la voie à leur utilisation comme des produits phytosanitaires, pour la lutte contre les agents nuisibles aux cultures agricoles.

Enfin l'approche méthodologique mise en place pour sélectionner, sur la base de l'étude de la variabilité chimique, des chémotypes qui intéresseraient les industriels dans le domaine des huiles essentielles s'est avérée fructueuse, ou certains de nos échantillons ont présenté un intérêt particulier pour les professionnels du domaine pour de réelles utilisations dans des domaines comme l'agroalimentaire, la parfumerie, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. Cela ouvre la voie à la possibilité de multiplier ce type d'approche dans d'autres sujets de thèses et d'autres universités pour l'études et la sélection d'espèces intéressantes un peu partout sur le territoire national.

REFERENCES

- [1] H. Ilbert, V. Hoxha, L. Sahi, A. Courivaud, C. Chailan. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. *CIHEAM / FranceAgriMer*. 73:222. 2016.
- [2] R. Bessah, et E. H. Benyoussef. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Rev. Energ. Renouvelables*. 18(3):513-528.
- [3] A. Bordas, et E. Bermejo. Les huiles essentielles un nouveau regard sur les plus anciens remèdes et cosmétiques connus. 2012.
- [4] H. Joanna. Le Guide des huiles essentielles et leurs applications thérapeutiques. *Le courrier du livre*. 2012.
- [5] M. Piochon. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : Composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. 2008.
- [6] J. Puig. 1ères rencontres professionnelles de la filière Plantes Aromatiques à Parfums et Médicinales (PPAM) des Pyrénées-Orientales. 2014.
- [7] Z. Bal. Aperçu sur le secteur des plantes aromatiques et médicinales "p.a.m.". *agro-services / APIA*. 2003.
- [8] M. Krausz. Huiles essentielles : un marché mondial en croissance. 2015.
- [9] X. Fernandez et F. Chemat, La chimie des huiles essentielles (Tradition et innovation), *Vuibert*. Paris. 2012.
- [10] D. P. de Sousa. Medicinal essential oils: chemical, pharmacological and therapeutic aspects. Brazil. 2012.
- [11] J. P. Willem. *Huiles Essentielles Antivirales*. Guy Trédaniel. Paris. 2015.
- [12] D. Robin. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. France. 2017.
- [13] A. Fougeroux. Les produits de biocontrôle ont le vent en poupe. France. 2014.
- [14] R. Miller, M. Mc Conville, et I. Woodrow. Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 67(1):43-51. 2006.
- [15] K. Lahrech. Extraction et analyses des huiles essentielles de *mentha pulegium* L. et de *saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques. 2010.
- [16] C. Gherman, M. Culea, et O. Cozar. Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*. 53(1):253-262. 2000.
- [17] F. Benayache. Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Université constantine 1 faculte des sciences exactes. Algérie. 2013.
- [18] H. Lahsissene, A. Kahouadji, S. Hseini. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (maroc occidental). *Lejeunia Rev. Bot*. 2010.
- [19] N. Benayad. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. 2008.
- [20] S. Sutour. Étude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. France. 2011.

- [21] J. Bruneton. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris. 1999.
- [22] L. Bremness. Plantes aromatiques et médicinales. 1^e éd. Bordas. France. 2001.
- [23] N. Beghidja, N. Bouslimani, F. Benayache, S. Benayache, et J. Chalchat. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the east of Algeria. *Chem. Nat. Compd.* 43(4):481-483. 2007.
- [24] A. Ait-Ouazzou *et al.* Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res. Int.* 45(1):313-319. 2012.
- [25] B. Marzouk, M. Ben Hadj Fredj, I. Chraief, M. Mastouri, K. Boukef, et Z. Marzouk. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *WFL.* 6(1):78-82. 2008.
- [26] H. Boukhebt *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Pharm. Lett.* 3(4):267-275. 2011.
- [27] J. C. Chalchat, M. S. Gorunovic, Z. A. Maksimovic, et S. D. Petrovic. Essential Oil of Wild Growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *J. Essent. Oil Res.* 12(5):598-600. 2000.
- [28] L. Cherrat, L. Espina, M. Bakkali, R. Pagán, et A. Laglaoui. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 22:221-229. 2014.
- [29] E. Derwich, Z. Benziane, R. Taouil, O. Senhaji, et M. Touzani. Comparative essential oil composition of leaves of *mentha rotundifolia* and *mentha pulegium* a traditional herbal medicine in Morocco. 4(1):47. 2010.
- [30] A. H. El-Ghorab. The chemical composition of the *mentha pulegium* l. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 9(2):183-195. 2006.
- [31] D. Lorenzo, D. Paz, E. Dellacassa, P. Davies, R. Vila, et S. Cañigüeral. Essential oils of *mentha pulegium* and *mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Technol. Int. J.* 45(2):519-524. 2002.
- [32] J. A. Pino, A. Rosado, et V. Fuentes. Chemical composition of the essential oil of *mentha pulegium* L. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 8(3). 1996.
- [33] C. M. Cook, E. Maloupa, S. Kokkini, et T. Lanaras. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *mentha pulegium* plants from Zakynthos. *J. Essent. Oil Res.* 19(3):239-243. 2007.
- [34] J. H. Zwinging et D. Smith. Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Phytochemistry.* 10(8):1951-1953. 1971.
- [35] M. Benbouali. Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : "*Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*". Hassiba Ben Bouali, Chlef. 2006.
- [36] D. Lorenzo, D. Paz, E. Dellacassa, P. Davies, R. Vila, et S. Canigüeral. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Technol. Int. J.* 45(4):519-524. 2002.
- [37] M. Brada, M. Bezzina, M. Marlier, A. Carlier, et G. Lognay. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol Agron Soc Env.* 11(1). 2007.

- [38] A. Ansari, M. Znini, A. Laghchimi, J. Costa, P. Ponthiaux, et L. Majidi. Chemical composition, adsorption proprieties and corrosion inhibition on mild steel of *Mentha rotundifolia* L. essential oil from Morocco. *Sch. Res. Libr. Pharm. Lett.* 7(6):125-140. 2015.
- [39] E. Derwich, Z. Benziane, et A. Boukir. Antibacterial activity and chemical composition of the leaf essential oil of *Mentha retundifolia* from Morocco. *EJEAFChe E-J Envir Agric Food Chem.* 9(1):19-28. 2010.
- [40] S. Fujita et K. Nezu. Components of essential oils of *mentha rotundifolia* (linn.) huds. ii, studies on the essential oils of the genus *mentha*. *Agric. Chem. Soc.* 59(7): 703-706. 1985.
- [41] S. Kokkini et V. P. Papageorgiou. Constituents of essential oils from *mentha x rotundifolia* growing wild in Greece. *Planta Med.* 54(2):166-167. 1988.
- [42] R. I. Moldovan et R. Oprean. Comparative study of essential oil from two species of mint grown in România. *Farmacia.* 62(1). 2014.
- [43] J. A. Pino, A. Rosado, et V. Fuentes. Chemical composition of the leaf oil of *mentha rotundifolia* (L.) hudson from cuba. *J. essent. oil res.* 11(2):241-242. 1999.
- [44] M. D. P. Raya, M. P. Utrilla, M. C. Navarro, et J. Jiménez. CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytother. Res.* 4(6): 232-234. 1990.
- [45] S. Shimizu et N. Ikeda. The essential oils of *mentha rotundifolia* of european origin. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 22(3):201. 1958.
- [46] S. Shimizu. Studies on the essential oil of *mentha rotundifolia*. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 21(2):107-114. 1957.
- [47] J. Wang, R. Li, J. Tan, et Z.-T. Jiang. Effect of drying on essential oil yields and chemical composition of pineapple mint (*mentha rotundifolia* 'variegata') from China. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 16(5):630-635. 2013.
- [48] F. Baba Aissa. Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). ROUIBA: *Librairie moderne.* 1999.
- [49] S. Korichi. Etude de comportement de la menthe poivrée *Mentha piperita* L sous palmeraie dans la région de Ourgla. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 2006.
- [50] J. Daniel, S. Rodolphe, et S. Vincent. Botanique systématiques des plantes à fleurs (Collection biologique). *PPUR.* 328. 2002.
- [51] P. Iserin. Encyclopédie des plantes médicinales. 70. 2001.
- [52] S. Adilson, M. Ana Lucia, D. Camila, F. Glyn Mara, C. T. D. Marta, et G. R. Vera Lucia. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35(4):275-280. 2004.
- [53] A. Barchan, M. Bakkali, A. Arakrak, et A. Laglaoui. Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. *Phytothérapie.* 14(2):88-96. 2016.
- [54] P. Z. Bedoukian. Occurrence of menthofuran in oil of peppermint (*mentha piperita vulgaris* S. *Am. Chem. Soc.* 70(2):621-622. 1948.
- [55] İ. Gökalp, K. Neşe, K. Mine, et D. K. Fatih. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricol and Food Chemistry.* 50(14):3943-3946. 2002.
- [56] J. Jens Rohloff. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Agric. Food Chem.* 47(9):3782-3786. 1999.

- [57] Z. Li *et al.* MAPK-mediated regulation of growth and essential oil composition in a salt-tolerant peppermint (*Mentha piperita* L.) under NaCl stress. *Protoplasma*. 253(6): 1541–1556. 2015.
- [58] M. J. Saharkhiz, M. Motamedi, K. Zomorodian, K. Pakshir, R. Miri, et K. Hemyari. Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of mentha piperita L. *ISRN Pharm*. DOI : 10.5402/2012/718645. 2012.
- [59] H. MacTavish et D. Harris. A case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs. 2002.
- [60] S. Douay. Monographie de la menthe verte. 2009.
- [61] D. Zhao, Y. W. Xu, G. L. Yang, A. M. Husaini, et W. Wu. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China. *Ind. Crops Prod*. 42:251–260. 2013.
- [62] R. S. Verma, V. Pandey, R. C. Padalia, D. Saikia, et B. Krishna. Chemical composition and antimicrobial potential of aqueous distillate volatiles of indian peppermint (*mentha piperita*) and spearmint (*mentha spicata*). *Herbs Spices Med. Plants*. 17: 258–267. 2011.
- [63] I. Telci, N. Sahbaz, G. Yilmaz, et M. Tugay. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Econ. Bot*. 58(4): 721–728. 2004.
- [64] I. Telci, I. Demirtas, E. Bayram, O. Arabaci, et O. Kacar. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Ind. Crops Prod*. 32(3):588–592. 2010.
- [65] K. Haddouche. Étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*. 2011.
- [66] F. Naghibi, M. Mosaddegh, S. M. Motamed, et A. Ghorbani. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 4(2):63–79. 2005.
- [67] T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, et C. Chelghoum. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int. J. Aromather*. 16(2):95–100. 2006.
- [68] E. A. Soto-Mendivil, J. F. Moreno-Rodríguez, M. Estarrón-Espinosa, J. A. García-Fajardo, et E. N. Obledo-Vázquez. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* AGAINST *Alternaria citri*. *e-Gnosis [online]*. 2006.
- [69] B. Nickavar, F. Mojab, et R. Dolat-Abadi. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem*. 90(4):609–611. 2005.
- [70] P. Quezel et S. Santa. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. 1963
- [71] L. Bousmaha-Marroki, F. Atik-Bekkara, F. Tomi, et J. Casanova. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *thymus ciliatus* (desf.) benth. ssp. *eu-ciliatus* maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res*. 19(5):490–493. 2007.
- [72] M. E. Ajjouri *et al.* Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Bot. Gallica*. 157(2):285–294. 2010.
- [73] F. Amarti *et al.* Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Bio-technol. Agron. Soc. Environ*. 14(1):141–148. 2009.

- [74] S. Amrouni, M. Touati, Y. Hadeif, et A. Djahoudi. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*. 12(5):309-313. 2014.
- [75] S. Belmalha. Caractérisation chimique de certaines espèces de thym Marocain du Moyen Atlas (région de Khenifra). *Science Libvol*. 2014.
- [76] C. A. Jamali *et al.* Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chem. Biodivers*. 9(6): 1188-1197. 2012.
- [77] A. Kabouche, H. Ghorab, Z. Semra, E. Sajjadi, R. Touzani, et Z. Kabouche. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. *Sch. Res. Libr*. 25(1):28-32. 2013.
- [78] A. Kabouche, A. Ghannadi, et Z. Kabouche. *Thymus ciliatus* - The Highest Thymol Containing Essential Oil of the Genus. *ResearchGate*. 4(9):1251-1252. 2009.
- [79] S. Ksouri, S. Djebir, A. A. Bentorki, A. Gouri, Y. Hadeif, et A. Benakhla. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol*. 27(2):245-249. 2017.
- [80] J. Lambinon, J. . De Langhe, et J. Delvosalle. Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines. 1992.
- [81] F. Kholkhal, H. A. Lazouni, M. Bendahou, I. Boublenza, S. D. Chabane, et T. Chaouch. Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*. *Afr. Sci. Rev. Int. Sci. Technol*. 9(1):151-158. 2013.
- [82] S. Nina, R. Seridi, et H. Tarek. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba-Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 40(2):180-185. 2016.
- [83] H. Bendif *et al.* Essential oil of *thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria: Chemotypification and in vitro Biological Activities. *Chem. Biodivers*. 14(3). DOI: 10.1002/cbdv.201600299. 2017.
- [84] K. Abdelmounaïm *et al.* Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants. 2013.
- [85] O. Benchabane, M. Hazzit, A. Baaliouamer, et F. Mouhouche. Analysis and antioxidant activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 15(5):774-781. 2012.
- [86] A. Chikhoun *et al.* In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod. Biomed. Online*. 31(3):411-420. 2015.
- [87] M. Hazzit, A. Baaliouamer, M. L. Faleiro, et M. G. Miguel. Composition of the essential oils of *thymus* and *origanum* species from algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J. Agric. Food Chem*. 54(17):6314-632. 2006.
- [88] K. Kubitzki et C. Bayer. The families and genera of vascular plants. 2003.
- [89] H. Meimberg, T. Abele, C. Bräuchler, J. K. McKay, P. L. Pérez de Paz, et G. Heubl. Molecular evidence for adaptive radiation of *Micromeria* Benth. (Lamiaceae) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. *Mol. Phylogenet. Evol*. 41(3):566-578. 2006.

- [90] K. P. Šavikin *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch., *M. dalmatica* Benth., and *Satureja cuneifolia* Ten. and its secretory elements. *J. Essent. Oil Res.* 22(1):91-96. 2010.
- [91] N. S. Radulović et P. D. Blagojević. Volatil secondary metabolites of *micromeria dalmaticabenth.* (Lamiaceae): biosynthetic and chemotaxonomical aspects. *Chem. Biodivers.* 9(7):1303-1319. 2012.
- [92] A. Medbouhi. Caractérisation Morphologique, Variabilité chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *micromeria inodora* L. de l'ouest algérien (Tazir ahmeur). 2014.
- [93] M. S. Ali-Shtayeh, R. M.-R. Yaghmour, Y. R. Faidi, K. Salem, et M. A. Al-Nuri. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol.* 60(3):265-271. 1998.
- [94] M. E. Duru, M. Öztürk, A. Uğur, et Ö. Ceylan. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 94(1):43-48. 2004.
- [95] I. Telci et M. Ceylan. Essential oil composition of *Micromeria fruticosa* Druce from Turkey. *Chem. Nat. Compd.* 43(5):629-631. 2007.
- [96] C. Formisano *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Micromeria fruticulosa* (Bertol.) Grande (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. *Flavour Fragr. J.* 22(4):289-292. 2007.
- [97] G. Stojanović, I. Palić, et J. Ursić-Janković. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria cristata* and *Micromeria juliana*. *Flavour Fragr. J.* 21(1):77-79. 2006.
- [98] M. Güllüce, M. Sökmen, F. Şahin, A. Sökmen, A. Adigüzel, et H. Özer. Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. *J. Sci. Food Agric.* 84(7):735-741. 2004.
- [99] B. Marinković, P. D. Marin, J. Knežević-Vukčević, M. D. Soković, et D. Brkić. Activity of essential oils of three *Micromeria* species (Lamiaceae) against micromycetes and bacteria. *Phytother. Res.* 16(4):336-339. 2002.
- [100] J. Mastelić, I. Jerković, et D. Kuštrak. Aromatic compounds of *micromeria juliana* (L.) bentham ex reichenb. from Croatia. *J. Essent. Oil Res.* 17(5):516-518. 2005.
- [101] A. Bekkouche. Etude ethnobotanique et chimique d'une plante médicinale *xanthium strumarium*. 2007.
- [102] M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, et C. Delarmelina, anticandida activity of brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97(2):305-311. 2005.
- [103] L. Gaussen. Précis de botanique Végétaux supérieurs. *Elsevier / Masson.* 1983.
- [104] A. Benguerba. Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece *inula crithmoides* L. Algérie. 2008.
- [105] M. A. van Agtmael, T. A. Eggelte, et C. J. van Boxtel. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(5):199-205. 1999.
- [106] T. Lograda, M. Ramdani, P. Chalard, G. Figueredo, Hafsa Silini, et Meriem Kenouf. Chemical composition, antibacterial activity and chromosome number of Algerian populations of two *chrysanthemum* species. *Appl. Pharm. Sci.* 3(8):6-11. 2013.

- [107] N. Boutaghane, A. Kabouche, A. M. El-Azzouny, et Z. Kabouche. Composition of the essential oil of *Chrysanthemum macrocarpum* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.* 44(6): 817-818. 2008.
- [108] N. Benhammou. Variabilité chimique et intérêt économique des huiles essentielles des variétés de l'espèce *Chrysanthemum Coronarium*(Rezaïma) de l'ouest Algérien. 2016.
- [109] NT.WS. Beniston. Fleurs d'Algérie. 1984.
- [110] N. Boutaghane. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Thèse de doctorat, Université de constantine1, Algérie. 2013.
- [111] B. Ouahiba. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique. Thèse de doctorat, Université de Mentouri-Constantine, Algérie. 2011.
- [112] C. Flann, W. Greuter, et D. J. N. Hind. Cassini's Compositae genera: A nomenclatural and taxonomic assessment. *TAXON.* 59(4):1206–1244. 2010.
- [113] Jaime A. et Teixeira. Da Silva. Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr. J. Biotechnol.* 3(12):706-720. 2004.
- [114] P. Sell et G. Murrell. Flora of great Britain and Ireland, *Campunulaceae-Asteraceae.* 2006.
- [115] C. H. Zheng, T. H. Kim, K. H. Kim, Y. H. Leem, et H. J. Lee. Characterization of potent aroma compounds in *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland) using aroma extract dilution analysis. *Flavour Fragr. J.* 19(5):401-405. 2004.
- [116] S. K. Bardaweel, M. M. Hudaib, K. A. Tawaha, et R. M. Bashatwah. Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM.* 2015.
- [117] G. Flamini, P. L. Cioni, et I. Morelli. Differences in the fragrances of pollen, leaves, and floral parts of garland (*chrysanthemum coronarium*) and composition of the essential oils from flowerheads and leaves. *Agric. Food Chem.* 51(8):2267–2271. 2003.
- [118] S. Kim, T. Ha, J. Kim, D. Chang, et K. Kim. Classification of korean *chrysanthemum* species based on volatile compounds using cluster analysis and principal component analysis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57(6):789-796. 2014.
- [119] B. Marongiu *et al.* Chemical and biological comparisons on supercritical extracts of *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir) Sch. Bip. with three related species of *chrysanthemums* of Sardinia (Italy). *Nat. Prod. Res.* 23(2):190-199. 2009.
- [120] F. Senatore, D. Rigano, R. De Fusco, et M. Bruno. Composition of the essential oil from flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae) growing wild in Southern Italy. *Flavour Fragr. J.* 19(2):149-152. 2004.
- [121] D. Haouas, P. L. Cioni, G. Flamini, M. Ben Halima-Kamel, et M. H. Ben Hamouda. Variation of chemical composition in flowers and leaves essential oils among natural population of tunisian *glebionis coronaria* (L.) tzvelev (asteraceae). *Chem. Biodivers.* 13(10):1251-1261. 2016.
- [122] Z. Xiao, B. Fan, Y. Niu, M. Wu, J. Liu, et S. Ma. Characterization of odor-active compounds of various *Chrysanthemum* essential oils by gas chromatography–olfactometry,

- gas chromatography–mass spectrometry and their correlation with sensory attributes. *J. Chromatogr. B.* 1009:152-162. 2016.
- [123] M. P. Perez *et al.* Effects of the essential oil of flower heads of *Chrysanthemum coronarium* L. on white fly and stored product pests. *Investig. Agrar. Prod. Prot. Veg. Espana.* 1999.
- [124] P. P. Alvarez-Castellanos, C. D. Bishop, et M. J. Pascual-Villalobos. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry.* 57(1):99-102. 2001.
- [125] S. Attia, K. L. Grissa, Z. G. Ghrabi, A. C. Maillieux, G. Lognay, et T. Hance. Acaricidal activity of 31 essential oils extracted from plants collected in Tunisia. *J. Essent. Oil Res.* 24(3):279-288. 2012.
- [126] H. Cetin, A. Yanikoglu, et J. Cilek. Larvicidal activity of selected plant hydrodistillate extracts against the house mosquito, *Culex pipiens*, a West Nile virus vector. *Parasitol. Res.* 108(4):943-948. 2011.
- [127] M. P. Pérez, J. A. Navas-Cortés, M. J. Pascual-Villalobos, et P. Castillo. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathol.* 52(3):395-401. 2003.
- [128] S. Pignatti. Flora d'Italia. *Edagricole.* 1982.
- [129] C. A. de la Lustra, A. López, et V. Motilva. Gastroprotection and prostaglandin e2 generation in rats by flavonoids of *dittrichia viscosa*. *Planta Med.* 59(6):497-501. 1993.
- [130] E. Mamoci, I. Cavoski, M. F. Andres, C. E. Díaz, et A. Gonzalez-Coloma. Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and *Ferula communis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 43:101-107. 2012.
- [131] M. G. Munby. Notice sur les noms arabes des plantes d'algerie. *Bull. Société Bot. Fr.* 13(3):217-220. 1866.
- [132] L. Lauro et C. Rolih. Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait. *Boll. Della Soc. Ital. Biol. Sper.* 66(9):829-834. 1990.
- [133] M. Hmamouchi. Les Plantes Médicinales Et Aromatiques Marocaines. 1999.
- [134] M. J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, M. E. Duru, M. Harmandar, et M. C. García Vallejo. Composition of the Volatile Oil from the Aerial Parts of *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Flavour Fragr. J.* 11(6):349-351. 1996.
- [135] D. Silva, E. Denham, L. Faleiro, G. Miguel, C. Cavaleiro, et L. Salgueiro. Antimicrobial activity of the essential oils of *dittrichia viscosa* subsp. *Viscosa* on *helicobacter pylori*. *Int. Soc. Hort. Sci.* 6:147-151. 2005
- [136] M. El Qodat, H. I. Al-Jaber, et A. S. Mayyas. Chemical Compositions of the Essential Oil from the Jordanian Medicinal Plant *Dittrichia Viscosa*. *Jordan J. Chem.* 5(4):343-348. 2010.
- [137] D. L. Nicolino, L. Vincenzo, M. Maria Antonietta, et L. Olimpia. Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, Southern Italy. 44:115-119. 2002.
- [138] A. Camacho, A. Fernández, C. Fernández, J. Altarejos, et R. Laurent. Composition of the essential oil of *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Riv. Ital. EPPOS.* 29:3-8. 2000.
- [139] M. A. Sílvia, L. A. Sofia, M. M. Graça, G. P. Luis, B. José, et A. F. Cristina. Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction

- waters of some aromatic plants – proquest. *Records of Natural Products*. 6(1):35-48. 2011.
- [140] M.-C. Blanc, P. Bradesi, M. J. Gonçalves, L. Salgueiro, et J. Casanova. Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 21(2):324-332. 2006.
- [141] J. Reynaud et M. Lussignol. Note free flavonoid aglycones from *inula montana*. *Pharm. Biol.* 37(2):163-164. 1999.
- [142] J. Peltier. Endemiques macaronesiennes au Maroc: Inventaire bibliographique et problemes taxinomiques. *Monographiae biologicae canariensis*. 134-142. 1973.
- [143] J. Palá-Paúl, J. Usano-Alemaný, et A. C. Soria. Essential oil composition of *Asteriscus maritimus* (L.) Less. from Spain. *J. Plant Biol. Soil Health.* 2(1):4. 2014.
- [144] E. L. Floch. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. *Imprimerie Officielle de la République Tunisienne*. 1983.
- [145] D. Fraternali, L. Giamperi, D. Ricci, et A. Manunta. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Asteriscus maritimus* (L.). *Ital. J. Eppos Thirty*. 11(3232): 33-39. 2001.
- [146] B. Estrada, R. Aroca, C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, et J. M. Ruiz-Lozano. Importance of native arbuscular mycorrhizal inoculation in the halophyte *Asteriscus maritimus* for successful establishment and growth under saline conditions. *Plant Soil.* 370(2) 175-185. 2013.
- [147] S. Medimagh, M. Daami-Remadi, H. Jabnoun-Khiareddine, H. B. Jannet, et M. A. Hamza. Chemical composition, Antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of essential oils from the Tunisian *Asteriscus maritimus* (L.) Less. *Mediterr. J. Chem.* 2(2): 459-470. 2012.
- [148] S. Medimagh, M. Daami-Remadi, H. Jabnoun-Khiareddine, M. Naffati, H. B. Jannet, et M. A. Hamza. Chemical Composition and in vitro Evaluation of Antimicrobial and Anti-acetylcholinesterase Activities of the Root Oil from *Asteriscus maritimus* (L.) Less Growing in Tunisia. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 16(4):443-450. 2013.
- [149] M. A. Al-Qudah, A. M. Saleh, N. L. Alhawsawi, H. I. Al-Jaber, S. A. Rizvi, et F. U. Afifi. Composition, Antioxidant, and cytotoxic activities of the essential oils from fresh and air-dried aerial parts of *pallenis spinosa*. *Chem. Biodivers.* 14(8). 10.1002/cbdv.201700146. 2017.
- [150] A. Agelet et J. Vallès. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 84(2):211-227. 2003.
- [151] S. Chermat et R. Gharzouli. Ethnobotanical study of medicinal flora in the north east of algeria - an empirical knowledge in djebel zdim (setif). *J. Mater. Sci. Eng. A.* 5(2):50-59. 2015.
- [152] S. Adouane. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Algérie. 2016.
- [153] G. Appendino, J. Jakupovic, et S. Jakupovic. Sesquiterpenoids from *Pallenis spinosa*. *Phytochemistry.* 46(6):1039-1043. 1997.
- [154] F. Senatore et M. Bruno. Composition of the essential oil of *Pallenis spinosa* (L.) Cass. (Asteraceae). *Flavour Fragr. J.* 18(3):195-197. 2003.

- [155] A. M. Saleh, M. A. Al-Qudah, A. Nasr, S. A. Rizvi, A. Borai, et M. Daghistani. Comprehensive analysis of the chemical composition and in vitro cytotoxic mechanisms of palmlines spinosa flower and leaf essential oils against breast cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 42(5):2043-2065. 2017.
- [156] G. Ohloff. Scent and Fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives. *Softcover reprint of the original 1st ed.* 1994.
- [157] U. Meierhenrich, J. Golebiowski, X. Fernandez, et D. Cabrol-Bass. De la molécule à l'odeur : les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction - L'Actualité Chimique. *Actual. Chim.* 289:29-40. 2002.
- [158] X. Fernandez, Sè. Kerverdo, E. DuÒach, et L. Lizzani-Cuvelier. Les hétérocycles dans la chimie des arômes. *Actual. Chim.* 4:4-14. 2002.
- [159] N. Djabou. Caractérisation et variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de Corse et de l'ouest algérien. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. 2012.
- [160] F. Augusto, A. L. e Lopes, et C. A. Zini. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Research Gate.* 22(3):160-169. 2003.
- [161] H. Velé. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments. Université d'Anger, 2015.
- [162] M. S. A. St-Gelais. Les-analyses-par-GC-partie-VIII-l'analyse-d'hydrolats. 2015.
- [163] D. Joulain. Method for Analysing Essential Oil. *Modern Analysis Methodologies: Use and Abuse. Perfum Flavor.* 19(2):5-17. 1994.
- [164] P. J. Marriott, R. Shellie, et C. Cornwell. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A.* 936(1):1-22. 2001.
- [165] C. Bicchi *et al.* Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr.* 23(6):382-391. 2008.
- [166] E. Kováts. Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1:229-247. 1965.
- [167] F. Grundschober. The identification of individual components in flavorings and ed foods. *Z Leb. Unters Forsch.* 192(6):530-534. 1991.
- [168] F. W. McLafferty et J. Michnowicz. State-of-the-art GC-MS. *Chemtech.* 1992.
- [169] P. Longevialle et F. W. McLafferty, Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques. Paris: *Masson.* 1981.
- [170] E. Constantin. Spectroscopie de masse. Paris: *Lavoisier Tec & Doc.* 1996.
- [171] E. De Hoffmann, J. Charette, et V. Stroobant, *Spectroscopie e masse.* Paris: Librairie Dunod, 1999.
- [172] F. W. McLafferty, Interpretation of Mass Spectra 4th edition by Fred W. McLafferty, Frantisek Tureek Hardcover. *University Science Books.* 1993.
- [173] J. Paolini. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(ie et ic) et RMN du carbone-13 de cistus albidus et de deux asteraceae endémiques de Corse : Eupatorium Cannabinum subsp. corsicum et doricum corsicum. France. 2005.
- [174] R. P. Adams. III - Operating Conditions Used For Spectra Acquisition in Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy. *San Diego: Academic Press.* 1989.
- [175] A. M. Adio, C. Paul, P. Kloth, et W. A. König. Sesquiterpenes of the liverwort Scapania undulata. *Phytochemistry.* 65(2):199-206. 2004.

- [176] S. Chericoni, G. Flamini, E. Campeol, P. L. Cioni, et I. Morelli. GC–MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem. Syst. Ecol.* 32(4):423-429. 2004.
- [177] Y. Z. Liang, P. Xie, et K. Chan. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B.* 812(1):53-70. 2004.
- [178] J. G. S. Maia, E. H. A. Andrade, et M. das G. B. Zoghbi. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Food Chem.* 85(2):195-197. 2004.
- [179] W. Schultze, G. Lange, et G. Schmaus. Isobutane and ammonia chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flavour Fragr. J.* 7(2):55-64. 1992.
- [180] F. Formáček et K.-H. Kubeczka. Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy. *John Wiley & Sons. Chichester.* 1982.
- [181] F. Formáček et K.-H. Kubeczka, 13C NMR Analysis of Essential Oils in Aromatic Plants : Basic and Applied Aspects. *Ed. Martinus Nijhoff.* La Haye. 1982.
- [182] K. LIU. La RMN du carbone-13, outil d'analyse étude phytochimique de *clinopodium ascendens*, *bupleurum fruticosum* et *santolina corsica*. France. 2008.
- [183] P. Bradesi. Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse des mélanges naturels dans le domaine de l'agroalimentaire: huiles essentielles et autres productions végétales. 1995.
- [184] W. Jennings et T. Shibamoto. Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. New york: Academic Press. 1980.
- [185] D. Joulain et W. König. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, *Hambourg, Ed. E.B. Verlag.* 1998.
- [186] F. McLafferty et D. Stauffer. The Wiley/NBS registry of mass spectra data. *Wiley-Interscience.* New york. 1988.
- [187] F. McLafferty et D. Stauffer. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th Ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM. Newfield. 1994.
- [188] S. G. Johnson. National Institute of Standards and Technology. PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library. *Norwalk, CT: Perkin-Elmer Corp.* 1999.
- [189] P. Ausloos *et al.* The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10(4):287-299. 1999.
- [190] F. W. McLafferty, D. A. Stauffer, S. Y. Loh, et C. Wesdemiotis. Unknown identification using reference mass spectra. Quality evaluation of databases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10(12):1229-1240. 1999.
- [191] W. König, D. Hochmuth, et D. Joulain. Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder. *Institute of Organic Chemistry 2.1.* Hamburg. 2001.
- [192] A. Muselli, Analyse des mélanges complexes de volatils issus des végétaux. *S.l.: Univ Européenne.* 2014.
- [193] R. G. Brereton. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. *John Wiley & Sons.* 2003.
- [194] E. Cicchetti, P. Merle, et A. Chaintreau. Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. *Flavour Fragr. J.* 23(6):450-459. 2008.
- [195] T. Silou, M. Malanda, et L. Loubaki. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet. *J. Food Eng.* 65(2):219-223. 2004.

- [196] M. Bourkhiss, M. Hnach, B. Bourkhiss, M. Ouhssine, A. Chaouch, & B. Satrani. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*. 20(1): 44-48. 2009.
- [197] M. Aghfir, M. Kouhila, A. Jamali, et L. Ait Mohamed. Séchage solaire convectif pour la conservation des feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis*). *JITH*. France. 2007.
- [198] L. Daniel, P. Daniel, D. Eduardo, D. Philip, V. Roser, et C. Salvador. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2002.
- [199] M. Brada, M. Bezzina, M. Marlier, et G. C. Lognay. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *Essent. Oil Res.* 18:663-665. 2005.
- [200] W. C. Evans, D. Evans, et G. E. Trease. Trease and Evans' pharmacognosy. New York: *WB Saunders*. 2002.
- [201] L. Bremness. Plantes aromatique et médicinales. *Nouv. éd. Larousse*. 2001.
- [202] K. H. C. Baser et G. Buchbauer. Éd, Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition. 2 edition. *Boca Raton: CRC Press*. 2015.
- [203] L. Price et S. P. Cert. Understanding Hydrolats: The Specific Hydrosols for Aromatherapy: A Guide for Health Professionals. New York: *Churchill Livingstone*. 2004.
- [204] J. Pelt. Les dons précieux de la nature. *Fayard*. 2010.
- [205] W. S. Hwang *et al.* Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts. *Science*. 308(5729):1777-1783. 2005.
- [206] R. S. Farag, Z. Y. Daw, F. M. Hewedi, et G. S. A. El-Baroty. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *J. Food Prot.* 52(9):665-667. 1989.
- [207] D. Tura et K. Robards. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chromatogr. A*. 975(1):71-93. 2002.
- [208] J. Burns *et al.* Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 48(2):220-230. 2000.
- [209] P. G. Pietta. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(7):1035-1042. 2000.
- [210] M. Karpińska, J. Borowski, et M. Danowska-Oziewicz. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem.* 72(1):5-9. 2001.
- [211] J. Pokorny, N. Yanishlieva, et M. H. Gordon. Antioxidants in food: practical applications. *CRC Press*. 2001.
- [212] Y. Lu et L. Y. Foo. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 75(2) :197-202. 2001.
- [213] B. Benjlali, E. Tantaoui-Elaraki, N. Ismail Alaoui, et A. Ayadi. Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plan Med Phytoth.* 20(2):155-167. 1986.
- [214] J. Brereton. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). *Lavoisier*. 2009.
- [215] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, et M. Idaomar. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-475. 2008.
- [216] R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. j. Coote, et G. J. e. Nychas. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91(3):453-462. 2001.
- [217] G. Lemaire, B. Terouanne, P. Mauvais, S. Michel, et R. Rahmani. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196(2):235-246. 2004.

- [218] H. Saiyed *et al.* Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ. Health Perspect.* 111(16):1958-1962. 2003.
- [219] J. Deravel, F. Krier, et P. Jacques. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique)/Biopesticides, a complementary and alternative approach to the use of agrochemicals. A review – ProQuest. *Biotechnol Agron Soc Env.* 18(2):220-232. 2014.
- [220] I. White et D. Hancock. Cabikey to the Dacini (Diptera, Tephritidae) of the Asian, Pacific and Australasian Regions. *UKCAB Int.* 1997.
- [221] V. T. Phillips. The biology and identification of trypetid larvae. *Mem. Am. Entomol. Soc.* 12:1-161. 1946.
- [222] Y. Kikuchi, M. Hayatsu, T. Hosokawa, A. Nagayama, K. Tago, et T. Fukatsu. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(22):8618-8622. 2012.
- [223] J. Tian, X. Zeng, A. Lü, A. Zhu, X. Peng, et Y. Wang. Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. *LWT - Food Sci. Technol.* 60(1):63-70. 2015.
- [224] S. Ghouli. A. Il Idrissi, et S. Fkih-Tetouani. Synthèse de nouveaux hétérocycles à partir de l'oxyde de pipériténone. *Tetrahedron Lett.* 42(11):2107-2109. 2001.

LISTE DES TRAVAUX

I. PUBLICATIONS DANS LES JOURNAUX INTERNATIONAUX A COMITE DE LECTURE

[A1] : *Micromeria inodora* (*Thymus inodorus*)

F. Z. Benomari, N. Djabou, A. Medbouhi, A. Khadir, M. Bendahou, C. Selles, J. M. Desjobert, J. Costa, A. Muselli. « Chemical Variability and Biological Activities of Essential Oils of *Micromeria inodora* (Desf.) Benth. From Algeria ». *Chemistry and Biodiversity*. 13: 1559-1572. **2016**.

[A2] : Genre *Mentha* (activités biologiques)

F. Z. Benomari, V. Andreu, J. Kotarba, M. A. Dib, C. Bertrand, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Essential Oils from Algerian Species of *Mentha* as New Bio-control Agents Against Phytopathogen Strains ». *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-017-9991-4. **2017**.

[A3] : *Thymus ciliatus* (trois espèces)

F. Z. Benomari, M. Moumani, F. Hassani, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Chemical Variability of Essential Oils of Three Subspecies of *Thymus ciliatus* Desf. from Western Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*. **2017**. Article soumis, en révision.

[A4] : Genre *Mentha* (activité biologiques)

K. Medjdoub, **F. Z. Benomari**, N. Gaouar Benyelles, M. A. Dib, N. Djabou, J. Costa. Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four *Mentha* species. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. **2017**. Article soumis.

[A5] : Genre *Asteriscus*

F. Z. Benomari, M. A. Dib, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Comparative study of chemical composition of essential oils of two species of *Asteriscus* genus from western Algeria ». *Journal of Essential Oil Research*. **2018**. Article soumis.

II. PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS OU COLLOQUES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

1. **F. Z. Benomari**, N. Djabou, M. A. Dib, J. Paolini, B. Tabti, J. Costa, A. Muselli. «Chemical composition, antioxidant and antifungal activities of essential oil and hydrosol extract of *Mentha aquatica* from Algeria», *45th International Symposium on Essential Oils. ISEO*, Istanbul, Turkey, 07-10 Septembre **2014**, Istanbul, **Turkey**.
2. **F. Z. Benomari**, N. Djabou, R. Belabbes, A. Medbouhi, M. A. Dib, A. Muselli, B. Tabti, J. Costa. «Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Mentha aquatica* de l'ouest algérien», *The First International Congress of Nutrition & Food Science from Bench to Bedside*, Novembre 20-22, **2015**, Tlemcen, **Algérie**.
3. **F. Z. Benomari**, R. Belabbes, A. Medbouhi, N. Djabou, M. A. Dib, J. M. Desjobert, B. Tabti, J. Costa, A. Muselli. «Composition chimique, activité antioxydante et antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Mentha aquatica* de l'ouest algérien » *Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique SMAP2015*, 15-18 of Septembre **2015**, Ajaccio – **France**.
4. **F. Z. Benomari**, R. Belabbes, A. Medbouhi, N. Djabou, M. A. Dib, B. Tabti, J. Costa, A. Muselli. «Composition chimique, activités antioxydantes et antifongiques de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Mentha aquatica* de l'ouest Algérien », *La 2eme journée Scientifique des Sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé Tlemcen*, Algérie, 15 Avril **2015**, Tlemcen, **Algérie**.
5. **F. Z. Benomari**, N. Djabou, A. Medbouhi, N. Merad, M. A. Dib, A. Muselli, M. Bendahou, J. Costa. «Chemical variability and biological activities of essential oils and hydrosol of *Mentha rotundifolia* from Western Algeria », *47th International Symposium on Essential Oils. ISEO*, September 11-14, **2016**, Nice, **France**.
6. **F. Z. Benomari**, H. Senouci, N. Djabou, K. Medjdoub, M. A. Dib, N. Gaouar, A. Muselli, J. Costa. «Chemical composition, Insecticidal and Larvicidal activities of Essential oil of *Mentha piperita* from Western Algeria », *47th International Symposium on Essential Oils. ISEO*, September 11-14, **2016**, Nice, **France**.

7. **F. Z. Benomari**, D. Nassim, H. Senouci, K. Medjdoub, M. A. Dib, N. Guaouar, A. Muselli, J. Costa. « Chemical Composition, Insecticidal And Larvicidal Activities Of Essential Oil Of *Mentha Piperita* From Western Algeria », *Natural Product and Biocontrol*, September 21-23, **2016**, Perpignan, **France**.

8. **F. Z. Benomari**, D. Nassim, H. Senouci, K. Medjdoub, M. A. Dib, N. Guaouar, M. Alain, J. Costa. « Composition chimique et activités insecticide et larvicide de l'huile essentielle de *Mentha piperita* de l'ouest algérien », *3ème Salon National des Plantes Aromatique Médicinales & à Parfums, AROMED*, 04-06 Octobre, **2016**, Alger, **Algérie**.

9. A. Tabet, Z. Zatla, R. Belabbes, L. Tabti, M. A. Dib, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, N. Djabou, N. Guaouar. « Contrôle du *Penicillium italicum* et activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Thymus capitatus* L., contre quatre agents phytopathogènes fongiques de *Citrus sinensis* L. ». *The First International Congress of Nutrition & Food Science « from Bench to Bedside*», Novembre 20-22, **2015**, Tlemcen, **Algérie**.

10. A. Medbouhi, N. Djabou, **F. Z. Benomari**, R. Belabbes, A. Muselli, M. A. Dib, J. Costa, B. Tabti. « Variabilité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Micromeria inodora* (Desf.) Benth. De l'ouest algérien ». *The First International Congress of Nutrition & Food Science « from Bench to Bedside* », Novembre 20-22, **2015**, Tlemcen, **Algérie**.

11. M. A. Dib, R. Belabbes, A. Medbouhi, **F. Z. Benomari**, N. Djabou, S. Bouayed Alam, C. Benamar, J. Costa, A. Muselli. « Essential oils as biocides for the control of fungal infections and devastating pest (*Tuta absoluta*) of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) », *The First International Congress of Nutrition & Food Science « from Bench to Bedside*», Novembre 20-22, **2015**, Tlemcen, **Algeria**.

12. R. Belabbes, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, M. A. Dib, A. Muselli, N. Djabou, J. Costa. « Composition chimique, activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des racines de *Carthamus caeruleus* d'Algérie », *The First International Congress of Nutrition & Food Science «from Bench to Bedside* », Novembre 20-22, **2015**, Tlemcen, **Algérie**.

13. A. Medbouhi, **F. Z. Benomari**, R. Belabbes, N. Djabou, M. A. Dib, J. M. Desjobert, J. Costa, B. Tab-ti, A. Muselli. « Variabilité chimique et activité biologique de l'huile essentielle de *Micromeria inodora* (Desf.) Benth., de l'ouest algérien », *Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique SMAP2015* – 15-18 of Septembre **2015**, Ajaccio – **France**.
14. R. Belabbes, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, N. Djabou, J. M. Desjobert, J. Costa, A. Muselli. « Composition chimique et activité antifongique de l'huile essentielle de racines de *Carthamus caeruleus* d'Algérie », *Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique SMAP2015*, 15-18 of Septembre **2015**, Ajaccio – **France**.
15. A. Medbouhi, **F. Z. Benomari**, R. Belabbes, N. Djabou, A. Muselli, M. A. Dib, J. Costa. « Chemical composition and biological activities of hydrosol extract of *Micromeria inodora* (Desf.) Benth., from Algeria », *46th International Symposium on Essential Oils. ISEO*, September 13-16, **2015**, Lublin, **Poland**.
16. R. Belabbes, I. Mami, **F. Z. Benomari**, M. A. Dib, N. Djabou, A. Muselli, J. Costa. « Chemical composition and biological activities of Essential oil and hydrosol extract of *Calendula arvensis* (vaill.) from Algeria », *47th International Symposium on Essential Oils. ISEO*, September 11-14, **2016**, Nice, **France**.
17. D. Nassim, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, M. A. Dib, M. Alain, C. Jean. « Chemical Composition, Antifungal And Antioxydant Activities Of Hydrosol Extract Of *Thymus Inodorus* From Algeria », *Natural Product and Biocontrol*, September 21-23, **2016**, Perpignan, **France**.
18. N. Djabou, L. Tabti, M. A. Dib, R. Belabbes, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, N. Guaouar. « *Penicillium Italicum* Control And Antifungal Activity Of Essential Oil And Hydrosol Extract Of *Thymus Capitatus* L. Against *Citrus Sinensis* L. Fungal Pathogens », *Natural Product and Biocontrol*, September 21-23, **2016**, Perpignan, **France**.
19. M. A. Dib, A. Tabet Zatla, L. Tabti, N. Guaouar, R. Belabbes, **F. Z. Benomari**, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Contrôle du *Penicillium italicum* et activité antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Thymus capitatus* L., contre quatre agents phytopathogènes fongiques de *Citrus sinensis* L. », *3ème Salon National des Plantes Aromatique Médicinales & à Parfums, AROMED*, 04-06 Octobre, **2016**, Alger, **Algérie**.

20. N. Djabou, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, R. Belabbes, M. Bendahou, M. A. Dib, A. Muselli, J. Costa. « Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *Thymus inodorus* de l'ouest algérien », *3ème Salon National des Plantes Aromatique Médicinales & à Parfums, AROMED*, 04-06 Octobre, **2016**, Alger, **Algérie**.

21. R. Belabbes, **F. Z. Benomari**, A. Medbouhi, I. Mami, N. Merad, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou, M. A. DIB. « Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Calendula arvensis* (Vaill.) de l'ouest algérien », *3ème Salon National des Plantes Aromatique Médicinales & à Parfums, AROMED*, 04-06 Octobre, **2016**, Alger, **Algérie**.

ARTICLES SCIENTIFIQUES

[A1] : *Micromeria inodora* (*Thymus inodorus*)

[A2] : Genre *Mentha* (activités biologiques)

[A3] : *Thymus ciliatus* (trois espèces)

[A4] : Genre *Mentha* (activité biologiques)

[A5] : Genre *Asteriscus*

[A1] : *Micromeria inodora* (*Thymus inodorus*)

F. Z. Benomari, N. Djabou, A. Medbouhi, A. Khadir, M. Bendahou, C. Selles, J. M. Desjobert, J. Costa, A. Muselli. « Chemical Variability and Biological Activities of Essential Oils of *Micromeria inodora* (Desf.) Benth. From Algeria ». *Chemistry and Biodiversity*. 13: 1559-1572. **2016**.



Chemical Variability and Biological Activities of Essential Oils of *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH. from Algeria

Fatima Zahra Benomari,^{a,b} Nassim Djabou,^a Ali Medbouhi,^{a,b} Abdelmounaim Khadir,^c Mourad Bendahou,^c Chaouki Selles,^d Jean-Marie Desjobert,^b Jean Costa,^b and Alain Muselli^{*b}

^aLaboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

^bLaboratoire Chimie des Produits Naturels (CPN), UMR CNRS 6134, Université de Corse, Campus Grimaldi, BP 52, FR-20250 Corte, e-mail: muselli@univ-corse.fr

^cLaboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

^dLaboratoire de Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

The chemical composition of the essential oils isolated from the aerial parts of *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH. collected in 24 Algerian localities was investigated from the first time using GC-FID, GC/MS and ¹³C-NMR. Altogether, 83 components which accounted for 94.7% of the total oil composition were identified. The main compounds were *trans*-sesquibabinene hydrate (**1**; 20.9%), α -terpinyl acetate (**2**; 19.8%), globulol (**3**; 4.9%), caryophyllene oxide (**4**; 4.3%), β -bisabolol (**5**; 2.9%) and *trans*-7-epi-sesquibabinene hydrate (**6**; 2.6%). Comparison with the literature highlighted the originality of the Algerian *M. inodora* oil and indicated that **1** might be used as taxonomical marker. The study of the chemical variability allowed the discrimination of two main clusters confirming that there is a relation between the essential-oil compositions and the soil nature of the harvest locations. Biological activity of *M. inodora* essential oil was assessed against fourteen species of microorganisms involved in nosocomial infections using paper disc diffusion and dilution agar assays. The *in vitro* study demonstrated a good activity against Gram-positive strains such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, and *Enterococcus faecalis*, and moderate activity against *Candida albicans*. These results might be useful for the future commercial valorization of *M. inodora* essential oil as a promising source of natural products with potential against various nosocomial community and toxic infections.

Keywords: *Micromeria inodora* (DESF.) BENTH., Essential oils, Chemical variability, Environmental chemistry, Biological activity.

Introduction

Micromeria BENTH. genus as currently understood belongs to the Lamiaceae family and contains about 70 species with a distribution range extending from the Himalayan region to the Macaronesian Archipelago (with Madeira, the Cape Verde and Canary Islands) and from the Mediterranean to South Africa and Madagascar.^[1–3] On the basis of their morphological characteristics and phylogenetic relationships, the species of the genus *Micromeria* are grouped in the sections *Cymularia*, *Eumicromeria* and *Pseudomelissa*.^{[2][3]} *Micromeria* is considered as one of the four sub-genus and/or section of *Satureja* genus (*Micromeria*, *Acinos*, *Clinopodium* and *Calaminatha*)

confirming the nomenclature proposed by botanical data.^[4–6] From the remaining sections, *Micromeria* section includes approximately 50 species of perennial herbs and shrubs based especially in the Mediterranean region.^[6]

Micromeria inodora (DESF.) BENTH. is odorless plant which extends over rocks, limestone in the west-Mediterranean region especially localized in few area of littoral of western Algeria and Balearic islands.^[6] In Algeria, eight species were reported^[4] and among them *M. inodora* (DESF.) BENTH. (Synonyms: *Satureja fontanesii* BRIQ. = *Micromeria barceloi* WILLK. = *Satureja Barceloi* (WILLK. PAU) = *Thymus inodorus* DESF.) is a subshrub with erect and much branched stems 10–50 cm, with 4 mm calyx glabrescent and pink

corolla, large (10 – 12 mm) wide lower lip 6 – 7 mm. In Algeria, this plant is known by the population under the name ‘Tazira hmeur’.^[4]

Micromeria species are generally consumed as herbal tea and for folk medicinal purposes in colds. They are also used against heart disorders, headache, wounds, and skin infections.^[7–9] As a result of recent studies, it has been shown that the essential oil of *Micromeria* species exhibits biological activity such as antimicrobial,^{[8][10–12]} antibacterial,^{[13][14]} and antioxidant.^[11]

Many works deal with the chemical composition of the aerial part essential oils of *Micromeria* genus. To our knowledge the essential oils of *Micromeria* species from North-Africa including Algeria, were never described. In the course of our characterization of Mediterranean aromatic plants, we reported from the first time the chemical composition of *M. inodora* essential oil using a combination of capillary GC(RI), GC/MS and ¹³C-NMR. The chemical variability of the essential oils of 24 specimens harvested in western Algeria was examined using statistical analysis. A comparison with the literature data of *Micromeria* genus was discussed. In addition, the biological activities of the essential oil were assessed against fourteen species of microorganisms involved in nosocomial infections using paper disc diffusion and dilution agar methods.

Results and Discussion

Harvest Locations

Aerial parts of *M. inodora* (DESF.) BENTH. were collected from 24 locations (S1 – S24) widespread in the littoral of Tlemcen Department, Algeria. Sample locations were distributed in two areas noted 1 and 2, as seen in the Fig. 1. Both areas were characterized by brown calcareous soils with 18.6 – 26.7 g/kg of organic carbon^[15] however the vegetation in area 2 is more existing in a climate vegetation (holm oak, Aleppo pine) with a dense undergrowth.

Composition of *Micromeria inodora* Essential Oils

Preliminary analysis of 24 Algerian essential-oil samples showed that the GC chromatograms were qualitatively similar but differed by the abundances of their major components. Therefore, in order to carry out a detailed analysis, all *M. inodora* essential-oil samples were pooled to produce a ‘Collective oil sample’. It was then fractionated using column chromatography (CC) and reanalyzed using GC, GC/MS, and ¹³C-NMR for one of them. The quantification of the ‘Collective

oil’, expressed in normalized% abundances and the maximum and minimum abundances, are listed in Table 1. We checked that the compounds identified in the CC fractions were in the individual oil samples (Supplementary Material¹), by comparing their retention indices (R_{I_a} , R_{I_p}) and their electronic impact-mass spectra (EI-MS).

GC and GC/MS analysis of *M. inodora* ‘Collective oil’ allowed the identification of 83 compounds accounting for 94.7%. ‘Collective oil’ was dominated by oxygenated compounds (78.1%) in which sesquiterpenes (46.9%) were higher than monoterpenes (30.4%). The main components were *trans*-sesquisabinene hydrate (**1**, 61², 20.9%), α -terpinyl acetate (**2**, 42, 19.8%), globulol (**3**, 66 4.9%), caryophyllene oxide (**4**, 65 4.3%), β -bisabolol (**5**, 75 2.9%) and *trans*-7-epi-sesquisabinene hydrate (**6**, 62 2.6%). Their structures were presented in Fig. 2. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library, except hexadecanoic acid identified from literature reference. In addition, the identification of *trans*-sesquisabinene hydrate (**1**, 61), *trans*-7-epi-sesquisabinene hydrate (**6**, 62), viridiflorol (68), ledol (70), α -acorenol (72) and β -bisabolol (**5**, 75) were ensured by the comparison of their ¹³C-NMR chemical shifts acquired in the polar CC-fraction, with those of references^[16–19] (Supplementary Material³).

Comparison with Literature Data

Many works deal with the chemical composition of the essential oils of *Micromeria* genus. Table 2 regroups the literature data regarding essential oil compositions of 32 species including the main components and the origins of the samples. Species studied were most localized in Mediterranean basin: Balkan (10 species), Turkey (10 species and subspecies), Spain (six species), Lebanon (three species) and Italy (one species). The two others were localized in USA. Most of essential oils were characterized by monoterpene compounds with *p*-menthane (pulegone, piperitone, piperitenone, piperitone oxide, linalool, thymol, and limonene), pinane (verbenone, α -pinene) and camphane (borneol) skeletons and a few

¹The detailed essential-oil composition of the 24 *M. inodora* samples can be obtained as Supplementary Materials.

²Italic numbers refer to the entries in Table 1.

³The ¹³C-NMR spectra of the CC-fraction and the chemical shifts values of the compounds can be obtained as Supplementary Materials.

	No ^a Voucher codes	Localities ^b	GPS Coordinates ^c	Yields ^d	Alt. ^e
Area 1	S1 MI-0912-KA1	Rachgoun 1	35°17'33"N; 1°28'45"O	0.42	43
	S2 MI-0912-KA2	Rechgoun 2	35°17'24"N; 1°28'31"O	0.31	12
	S3 MI-0912-KA3	Rechgoun 3	35°17'12"N; 1°29'17"O	0.33	52
	S4 MI-0912-KA4	Zouanif 1	35°16'45"N; 1°30'14"O	0.24	118
	S5 MI-0912-KA5	Zouanif 2	35°16'18"N; 1°28'46"O	0.21	59
	S6 MI-0912-KA6	Zouanif 3	35°17'04"N; 1°29'26"O	0.16	55
	S7 MI-0912-KA7	Sig 1	35°16'53"N; 1°27'43"O	0.34	7
	S8 MI-0912-KA8	Sig 2	35°16'11"N; 1°27'19"O	0.32	13
	S9 MI-0912-KA9	Oulhaça 1	35°16'06"N; 1°30'12"O	0.15	162
	S10 MI-0912-KA10	Oulhaça 2	35°15'03"N; 1°30'27"O	0.32	309
	S11 MI-0912-KA11	Oulhaça 3	35°15'42"N; 1°30'44"O	0.21	145
	S12 MI-0912-KA12	Chehabna 1	35°15'19"N; 1°31'53"O	0.17	290
	S13 MI-0912-KA13	Chehabna 2	35°15'41"N; 1°33'00"O	0.25	172
	S14 MI-0912-KA14	Ourdania 1	35°14'41"N; 1°33'54"O	0.38	151
	S15 MI-0912-KA15	Ourdania 2	35°14'28"N; 1°34'23"O	0.18	45
Area 2	S16 MI-0912-KA16	Ghazaouet 1	35°06'15"N; 1°50'48"O	0.65	66
	S17 MI-0912-KA17	Ghazaouet 2	35°05'49"N; 1°50'02"O	0.66	103
	S18 MI-0912-KA18	Sidi Youcha 1	35°06'55"N; 1°46'37"O	0.71	52
	S19 MI-0912-KA19	Sidi Youcha 2	35°06'03"N; 1°46'43"O	0.80	60
	S20 MI-0912-KA20	Sidi Youcha 3	35°05'51"N; 1°36'45"O	0.74	72
	S21 MI-0912-KA21	Laaricha	35°06'56"N; 1°47'26"O	0.55	178
	S22 MI-0912-KA22	El Bor 1	35°06'36"N; 1°48'21"O	0.51	270
	S23 MI-0912-KA23	Sidi Amar	35°06'28"N; 1°49'49"O	0.55	105
	S24 MI-0912-KA24	El Bor 2	35°06'49"N; 1°49'18"O	0.60	215

^a Sample codes. ^b Harvest localities. ^c Sample positioning. ^d Yields [%] (w/w). ^e Altitudes [m].

Figure 1. Geographical distribution of *Micromeria inodora* samples (S1 – 24) from western Algeria.

Micromeria essential-oil samples were characterized by sesquiterpene compounds displaying caryophyllane ((*E*)- β -caryophyllene and its oxide), germacrene (germacrene D) and aromadendrane skeletons (spathulenol and globulol).

As the genus *Micromeria* is notorious for its taxonomic complexity, the present bibliographic study highlighted the chemical diversity in the essential oils of *Micromeria* species (Table 2). Algerian *M. inodora* essential oil could be drawn near to sesquiterpene-rich species like *M. juliana*, *M. croatica* and *M. parviflora* from Balkan region. However, Algerian *M. inodora* essential oil was distinguished by the occurrence trans-sesquisabinene hydrate (**1**) identified as main component and never reported in *Micromeria* genus. Hence, **1** might be used as discriminant marker for a future classification of the genus *Micromeria*.

Chemical Variability of *Micromeria inodora* Essential Oils

Normalized percentage abundances of all identified components were used for statistical analysis (Table, Supplementary Material). Relationship between the chemical composition of oils and environmental parameters were studied, using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) applied to a matrix linking essential oil compositions and the sample localities (Figs 3 and 4). As shown in Fig. 3, PCA

constructed using axes 1 and 2 accounted for 70.55% of the variance. First dimension (Dim 1) was positively correlated with oxygenated sesquiterpenes and negatively correlated with oxygenated monoterpenes.

The plot suggests that there are two main groups (Fig. 3) in accordance with the general structure of the dendrogram obtained from the CA (Fig. 4): Group I included 15 stations (S1 – S15) and group II included 9 stations (S16 – S24). Sample oils of group I were characterized by higher amount of oxygenated sesquiterpenes (45.6 – 72.8%) than those of group II (35.0 – 52.5%). In contrast, sample oils of group II were characterized by higher amount of oxygenated monoterpenes (28.7 – 43.3%) than those of group I (12.8 – 31.1%) (See Supplementary Material).

The statistical distribution of the oil samples focused on the correlation between the chemical composition of individual oil samples and the geographical distribution as well as the nature of the soils on which the plants grew. Group I regrouped all specimens collected in area 1 and group II included all specimens harvested in area 2. In addition, it clearly appears a difference between the essential oil yields from plants of both areas; specimens from Area 1 exhibited yields comprised between 0.15% and 0.42% while those from area 2 displayed oil yields to 0.51 – 0.80%. The differences can be explained by the nature of the soils of harvest localities. Calcareous soil-humic rich in organic matter characterized areas 1

Table 1. Chemical composition of *Micromeria inodora* essential oils

Entry	Compound name and class ^a	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Collective Oil ^e	Sample oils ^f		Identification ^g
						%	% Min	
1	(Z)-Hex-3-en-1-ol	851	835	1385	tr	tr	0.2	RI, MS
2	α -Pinene	936	931	1025	0.6	0.1	2.3	RI, MS
3	Camphene	950	945	1067	tr	tr	0.1	RI, MS
4	Thuja-2,4(10)-diene	943	947	1124	0.1	tr	0.2	RI, MS
5	Sabinene	973	965	1120	0.2	tr	0.4	RI, MS
6	β -Pinene	978	971	1110	1.1	tr	2.8	RI, MS
7	1,8-Dehydrocineole	980	980	1188	0.2	tr	0.5	RI, MS
8	Myrcene	987	982	1157	0.2	tr	0.4	RI, MS
9	<i>p</i> -Cymene	1015	1012	1265	0.2	tr	0.2	RI, MS
10	Limonene	1023	1021	1197	1.5	0.1	2.9	RI, MS
11	β -Phellandrene	1023	1021	1207	0.2	tr	0.6	RI, MS
12	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1041	1036	1245	0.2	tr	0.4	RI, MS
13	γ -Terpinene	1048	1048	1241	0.1	tr	0.2	RI, MS
14	(<i>E</i>)-Sabinene hydrate	1053	1053	1454	0.1	tr	0.2	RI, MS
15	1-Octanol	1063	1062	1528	0.1	tr	0.4	RI, MS
16	Nonanal	1086	1075	1389	0.1	tr	0.3	RI, MS
17	Linalool	1083	1082	1537	1.2	0.2	2.1	RI, MS
18	Chrysanthenone	1110	1100	1496	0.1	tr	0.3	RI, MS
19	α -Campholenal	1109	1104	1445	0.4	0.2	0.7	RI, MS
20	Nopinone	1111	1108	1572	0.2	0.1	0.6	RI, MS
21	Camphor	1123	1120	1517	0.2	0.1	1.4	RI, MS
22	<i>trans</i> -Pinocarveol	1124	1123	1638	1.5	0.4	5.5	RI, MS
23	<i>cis</i> -Verbenol	1127	1128	1643	1.8	0.5	4.2	RI, MS
24	<i>trans</i> -Verbenol	1136	1138	1665	0.7	0.3	2.7	RI, MS
25	Pinocarvone	1137	1145	1552	0.2	0.1	3.5	RI, MS
26	Borneol	1143	1146	1698	0.2	tr	0.4	RI, MS
27	Lyratol	1150	1155	1777	0.2	tr	0.4	RI, MS
28	Cryptone	1160	1159	1662	0.2	tr	0.9	RI, MS
29	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1169	1160	1830	0.2	tr	0.6	RI, MS
30	Terpinen-4-ol	1164	1166	1590	0.8	0.4	3	RI, MS
31	Myrtenal	1178	1173	1763	0.6	0.2	1.4	RI, MS
32	α -Terpineol	1176	1178	1698	0.7	0.1	2.5	RI, MS
33	Decanal	1188	1184	1496	0.1	tr	0.9	RI, MS
34	<i>trans</i> -Carveol	1196	1197	1830	0.4	tr	0.6	RI, MS
35	<i>cis</i> -Carveol	1208	1211	1861	0.2	tr	0.4	RI, MS
36	Cuminaldehyde	1217	1213	1777	0.1	tr	0.3	RI, MS
37	Carvone	1214	1215	1731	0.1	tr	0.4	RI, MS
38	Linalyl acetate	1239	1236	1556	0.1	0.1	0.4	RI, MS
39	Bornyl acetate	1270	1268	1572	0.1	0.1	1.5	RI, MS
40	Carvacrol	1278	1277	2209	0.1	tr	1.8	RI, MS
41	5-Isopropyl-3-methyl phenol	1297	1304	2254	0.4	tr	0.4	RI, MS
42	α -Terpinyl acetate	1330	1332	1685	19.8	2.5	38.9	RI, MS
43	Isoitalicene	1380	1384	1496	0.3	tr	0.5	RI, MS
44	Cyperene	1406	1403	1525	0.4	tr	0.7	RI, MS
45	Pacificgorgia-1(6)-10-diene	1414	1414	1536	0.4	0.1	0.8	RI, MS
46	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1421	1414	1590	0.7	0.2	1.4	RI, MS
47	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1434	1430	1580	1.1	0.4	1.5	RI, MS
48	Aromadendrene	1443	1446	1613	0.4	tr	0.3	RI, MS
49	(<i>E</i>)- β -Farnesene	1446	1448	1659	0.4	tr	0.6	RI, MS
50	Valera-4,7(11)-diene	1450	1450	1629	1.6	0.5	2.7	RI, MS
51	Alloaromadendrene	1462	1455	1642	2.2	1.4	5.1	RI, MS
52	β -Acoradiene	1459	1460	1649	0.2	0.1	0.2	RI, MS
53	α -Curcumene	1473	1468	1763	1.1	0.2	1.2	RI, MS
54	γ -Gurjunene	1470	1471	1652	0.4	0.1	0.8	RI, MS

Table 1. (cont.)

Entry	Compound name and class ^a	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Collective Oil ^e	Sample oils ^f		Identification ^g
						%	% Min	
55	γ -Muurolene	1474	1472	1683	0.6	tr	0.7	RI, MS
56	γ -Himachalene	1479	1483	1685	0.6	0.1	1.2	RI, MS
57	β -Curcumene	1503	1504	1731	0.8	0.2	1.9	RI, MS
58	Calamenene	1517	1510	1818	0.3	0.1	0.5	RI, MS
59	β -Sesquiphellandrene	1516	1512	1763	0.3	0.1	0.3	RI, MS
60	α -Calacorene	1527	1526	1897	0.1	0.1	0.4	RI, MS
61	<i>trans</i> -Sesquisabinene hydrate	1530	1541	1980	20.9	10.2	27.1	RI, MS, ¹³ C [16]
62	<i>trans</i> -7-epi-Sesquisabinene hydrate	1543	1548	1985	2.6	1.1	4.3	RI, MS, ¹³ C [16]
63	Spathulenol	1572	1556	2101	1.7	0.7	3.8	RI, MS
64	Epiglobulol	1565	1558	2015	0.5	0.2	2.7	RI, MS
65	Caryophyllene oxide	1578	1569	1985	4.3	3.2	7.9	RI, MS
66	Globulol	1589	1581	2066	4.9	1.3	19.8	RI, MS
67	Guaiol	1591	1587	2082	1.1	0.6	2.1	RI, MS
68	Viridiflorol	1592	1590	2068	1.3	0.9	4.2	RI, MS, ¹³ C [17]
69	Copaborneol	1592	1596	2153	0.4	0.1	0.5	RI, MS
70	Ledol	1600	1600	2018	1.1	0.4	3.5	RI, MS, ¹³ C [17]
71	epi-Cubenol	1623	1613	2163	0.4	0.1	0.5	RI, MS
72	α -Acorenol	1623	1617	2114	1.3	0.1	1.8	RI, MS, ¹³ C [18]
73	Cadin-4-en-7-ol	1627	1630	2082	0.4	0.1	0.6	RI, MS
74	Cubenol	1630	1634	2009	0.5	0.3	2.9	RI, MS
75	β -Bisabolol	1653	1654	2134	2.9	1.1	7.3	RI, MS, ¹³ C [19]
76	(<i>Z,Z</i>)-Farnesal	1654	1658	2163	2.1	0.2	5.8	RI, MS
77	Eudesma-4(15)-7-dien-1- β -ol	1671	1676	2334	0.3	tr	0.9	RI, MS
78	Heptadecane	1700	1696	1698	0.1	tr	0.3	RI, MS
79	α -Cuperone	1740	1735	2351	0.2	tr	0.4	RI, MS
80	Hexadecanoic acid	1962	1968	2330	0.1	tr	2.1	RI, MS [20]
81	Heneicosane	2100	2099	2101	0.1	tr	0.3	RI, MS
82	Eicosane	2200	2204	2198	0.1	tr	1.2	RI, MS
83	Heneicosane	2300	2298	2302	tr	tr	0.3	RI, MS
	% Identification				94.7	91.0	95.5	
	Yields ([%], w/w)					0.15	0.80	
	% Oxygenated compounds				78.1	72.3	87.3	
	% Monoterpenes				30.4	12.8	43.3	
	% Sesquiterpenes				46.9	35.0	65.5	
	% no-Terpenic compounds				0.8	0.5	2.2	
	% Hydrocarbon compounds				16.8	8.1	18.2	
	% Monoterpene				4.4	0.3	8.4	
	% Sesquiterpene				12.6	6.1	15.5	
	% no-Terpenic compounds				0.3	0	2.0	

^aOrder of elution is given on apolar column (*Rtx-1*). Bold types refer to main compounds. ^bRetention indices of literature on the apolar column (*IRI_a*) reported from.^[20] ^cRetention indices on the apolar *Rtx-1* column (*RI_a*). ^dRetention indices on the polar *Rtx-Wax* column (*RI_p*). ^eCollective oil: Mixture of all Algerian *M. inodora* essential oils. Quantification was carried out using RFs relative to tridecane as internal standard. %: Normalized Percentages are given on the apolar column except for components with identical *RI_a* (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). ^fSample oils: Minimal and maximal normalized percentages (%) from the 24 sample oils are given on the apolar column except for components with identical *RI_a* (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). The chemical compositions of all individual samples were tabulated in *Supplementary Material*. ^gRI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; ¹³C: ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library, except hexadecanoic acid 80 identified from MS literature data.^[20] The identification of *trans*-sesquisabinene hydrate 61, *trans*-7-epi-sesquisabinene hydrate 62, viridiflorol 68, ledol 70, α -acorenol 72 and β -bisabolol 75 were ensured by the comparison of their ¹³C-NMR chemical shifts with those of references.^[16 – 19]

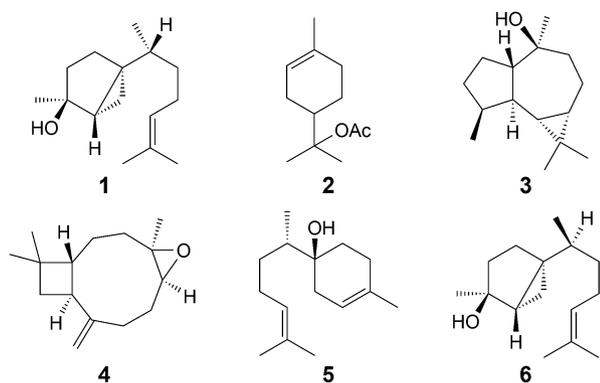


Figure 2. Main components of *Micromeria inodora* essential oils from Algeria, *trans*-sesquisabinene hydrate (**1**, 61, 20.9%), α -terpinyl acetate (**2**, 42, 19.8%), globulol (**3**, 66, 4.9%), caryophyllene oxide (**4**, 65, 4.3%), β -bisabolol (**5**, 75, 2.9%) and *trans*-7-epi-sesquisabinene hydrate (**6**, 62, 2.6%). Italic numbers refer to the entries in Table 2.

and 2 however the vegetation in area 2 is more existing in a climate vegetation (holm oak, Aleppo pine) with a dense undergrowth indicated that soil is rich in bases including Ca^{++} , Mg^{++} and K^{+} .^{[55][56]} Rich-mineral soils seem to further the production of essential oils of *M. inodora*, as reported in literature.^[57]

Growth Inhibition of Bacteria by Essential Oil

The results of susceptibility of Algerian *M. inodora* ‘Collective oil’ testing with the agar diffusion method and minimum inhibitory concentrations are presented in Table 3. The results showed that essential oil of *M. inodora* (DESF.) BENTH., has an interesting activity against Gram-positive strains such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 33862 and ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, where we recorded the largest diameters of inhibition ranging from 14 to 23 mm and the lowest MICs observed ranging from 0.06 to 0.5 mg/ml. Although, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 is the only Gram-positive reference strain resistant to *M. inodora* essential oil. However, for the yeasts, *M. inodora* essential oil showed a moderate activity against *Candida albicans* ATCC 10231 and IPP444 with inhibition diameter ranging from 11 to 13 mm and a MIC equal to 1 mg/ml. Nevertheless, Gram-negative strains such as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 was completely resistant to the essential oil since neither MICs nor inhibition diameter were measured. Whereas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 have shown a very

low activity with inhibition diameter not exceeding 8 mm and MICs ranging from 2 to 4 mg/ml while no MIC was determined for *Salmonella enteritidis*. Our results were in accordance with several previous studies; Gram-positive strains often exhibit more sensitivity towards essential oils than Gram-negative strains.^[58–60] The species belonging to *Pseudomonas* genus is a particular case with increased resistance to antibiotics. In our work, the strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *P. fluorescens* ATCC 13525 have appeared completely resistant to the *M. inodora* essential oil. This resistance can be explained by the barrier effect of the outer lipopolysaccharide membrane of these species, which prevents the diffusion of the oil within the cell.^{[61][62]} According to sensitivity interval proposed in literature,^[63] *S. aureus* was classified extremely sensitive for having a diameter of 20 mm. This species is among the first germs implicated in various nosocomial community and toxic infections.^{[64][65]}

Our results may be explained by the occurrence of several active components reported in the literature such as α -terpinyl acetate (**2**), globulol (**3**), caryophyllene oxide (**4**) and β -bisabolol (**5**). The antimicrobial activity of **2** in *Chamaecyparis obtusa* essential oil^[66] and the antimicrobial activity against *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *E. faecium* of the authentic standard were reported.^[67] As well as, **3** exhibit antifungal activity against a variety of fungal species and against bacteria.^[68] **4** was used as antifungal agent,^[69] and it is responsible to the antimicrobial activity of *Hypericum hyssopifolium* var. *microcalycinum* and *Hypericum lysimachioides* essential oils.^[70] In fine, the antimicrobial activity of **5** was also reported.^[71] To our knowledge no data was established concerning the *in vitro* and/or *in vivo* biological activity of *trans*-sesquisabinene hydrate (**1**).

Conclusions

The present study investigated, for the first time, the chemical composition and the variability of *M. inodora* essential oils from western Algeria. These results provided a better insight in the secondary-metabolite production of the plant. Exemplified by the occurrence of *trans*-sesquisabinene hydrate and α -terpinyl acetate as main components, Algerian *M. inodora* essential oil exhibit an original chemical composition comparing to *Micromeria* species reported in the literature. Statistical analyses highlighted that two chemical composition of the Western Algerian *M. inodora* essential oils were distinguished. The ecological relevance of these results was supported by the

Table 2. Data of previous chemical investigations of essential oils of *Micromeria* genus

Species	Origins	References	Main Components (%)
<i>M. fruticosa</i> (L.) DRUCE subsp. <i>Serpyllifolia</i> (BIEB)	Turkey	[11]	Piperitone (50.6), pulegone (29.2), and isomenthone (3.9)
	Turkey	[21]	Pulegone (33.4), piperitenone (33.1), and piperitone oxide (4.2)
	Egypt	[22]	Pulegone (58.5), isomenthone (3.9), (<i>E</i>)- β -caryophyllene (3.9), <i>p</i> -mentha-3,8-diene (3.7), and isopulegone (3.2)
<i>M. fruticosa</i> (L.) DRUCE subsp. <i>barbata</i> (BOISS) P. H. DAVIS	Turkey	[23]	Pulegone (81.3), piperitone (3.1) and neomenthol (2.0)
	USA	[24]	Pulegone (62.0 – 65.2), iso-menthol (6.9 – 7.3), piperitenone oxide (2.9 – 4.6) and (<i>E</i>)- β -caryophyllene (2.7 – 4.3)
	Turkey	[25]	Pulegone (57.2), isomenthone(21.3) and menthone(8.1)
<i>M. fruticosa</i> (L.) DRUCE subsp. <i>brachycalyx</i> P. H. DAVIS	Turkey	[26]	Pulegone (39.6), menthol (24.3) and menthone (24.2)
	Lebanon	[27]	Menthylactone (10.3 – 33.9), pulegone (13.4 – 30.4), limonene (2.9 – 15.6), piperitone (4.2 – 10.8) and guaiacol (3.7 – 10.0)
<i>M. dalmatica</i> BENTH.	Yugoslavia	[28]	Pulegone (34.8), piperitenone (12.2), menthone (10.2) and isomenthone (6.6)
	Serbia	[29]	Pulegone (26.7), piperitenone oxide (25.4), piperitenone (21.8), limonene (5.7) and germacrene D (5.4)
<i>M. thymifolia</i> (Scop.) FRITSCH	Croatia	[30]	Pulegone (29.6), menthone (11.7), piperitenone (10.8) and piperitone (5.4)
	Macedonia	[31]	Pulegone (35.8), piperitenone (18.6), menthone (15.8), piperitone (8.0) and germacrene D (6.9)
	Yugoslavia	[13]	Piperitenone oxide (41.8), pulegone (15.9), piperitenone (10.2) and limonene (5.8)
	Yugoslavia	[28]	Unknown ketone (42.9 – 47.6), piperitenone (21.3 – 23.6), pulegone (3.0 – 6.3) and piperitone (3.3 – 4.3)
<i>M. thymifolia</i> (Scop.) FRITSCH	Montenegro	[32]	Piperitenone (56.7), pulegone (12.1) and linalool (3.2)
	Greece	[33]	β -pinene (0.9 – 33.9), menthone (tr – 33.3), limonene (4.1 – 25.5), isomenthone (tr – 24.7) and germacrene D (0.2 – 14.6)
<i>M. thymifolia</i> (Scop.) FRITSCH	Serbia	[32]	Piperitone oxide (20.0 – 63.8), pulegone (tr – 37.2), limonene (4.5 – 11.7) and piperitenone oxide (9.2 – 9.8),
	Serbia	[29]	Pulegone (50.4), piperitenone (10.3) and piperitenone oxide (4.3)
	Montenegro	[32]	Pulegone (6.2 – 72.3), piperitenone (4.3 – 28.7), piperitone (0.9 – 24.0), piperitenone oxide (0.9 – 16.0), limonene (3.0 – 8.9)
	Yugoslavia	[13]	Pulegone (32.8), piperitenone (25.7) and piperitone (11.7)
<i>M. juliana</i> L. BENTHAM ex REICHENB.	Finland	[34]	pulegone (62.0 – 76.0)
	Montenegro	[32]	Caryophyllene oxide (15.9 – 18.1), carvacrol (tr – 18.1), <i>p</i> -cymene (tr – 10.8), isomenthone (tr – 10.1) and pulegone (tr – 8.1)
	Albania	[32]	Caryophyllene oxide (20.4), (<i>E</i>)- β -caryophyllene (7.1) and borneol (6.3)
	Macedonia	[31]	Caryophyllene oxide (11.2), unknown (6.9), germacrene D (6.1) and spathulenol (5.6)
<i>M. thymifolia</i> (Scop.) FRITSCH	Serbia	[12]	Verbenol (11.8), geranyl acetate (10.8), caryophyllene oxide (10.5) and borneol (9.3)
	Serbia	[35]	Borneol (9.3), verbenol (8.7), linalooloxide (6.5)
<i>M. thymifolia</i> (Scop.) FRITSCH	Croatia	[14]	α -pinene (7.2 – 10.6), linalool (4.7 – 7.6), β -pinene (4.9 – 7.0), α -gurjunene (2.1 – 6.4), <i>trans</i> -linalool oxide (3.5 – 4.6)

Table 2. (cont.)

Species	Origins	References	Main Components (%)
<i>M. albanica</i> (GRISEB. Ex. K. MALLY) SILIC	Yugoslavia Yugoslavia	[36] [13]	Piperitone oxide (44.0), pulegone (20.7), piperitone oxide (8.9), piperitone (7.5) and limonene (6.0) Piperitone oxide (38.7), pulegone (13.4) and piperitenone (9.7)
<i>M. cristata</i> (HAMPE) GRISEB.	Kosovo Macedonia Macedonia Macedonia Serbia	[32] [31] [31] [31] [32]	Piperitone oxide (36.9), piperitenone oxide (21.9) and piperitenone (10.0) <i>trans</i> -verbenol (16.6), α -cadinol (7.4) and borneol (6.1) α -bisabolol (38.5) and (<i>E</i>)- β -caryophyllene (14.3) Germacrene D (18.5), β -alantol (9.9), α -cadinol (8.8) and α -bisabolol (7.7) Unknown (17.7), spathulenol (11.7), camphor (7.5), globulol (6.0), borneol (5.7), 1,8-cineole (5.0) and bornyl acetate (4.1)
<i>M. croatica</i> PERS. SCHOTT	Serbia Croatia	[32] [37]	Caryophyllene oxide (24.4), γ -cadinene (10.9) and borneol (10.8) (<i>E</i>)- β -caryophyllene (5.7 – 24.5), caryophyllene oxide (10.9 – 22.3), limonene (4.2 – 6.5) and linalool (2.6 – 5.9)
<i>M. parviflora</i> (VIS.) RE-INCHEB.	Montenegro Serbia	[32] [35]	Spathulenol (19.0 – 46.7) and <i>p</i> -cymene (11.5 – 14.6) Spathulenol (29.9), β -bourbonene (7.5), hexadecanoic acid (5.6), pentadecanoic acid (4.2) and caryophyllene oxide (3.8)
<i>M. persica</i> Boiss.	Albania Iran	[32] [38]	Linalool (14.3), spathulenol (12.7) and carvacrol (10.6) Thymol (28.6 – 33.1), γ -terpinene (17.5 – 28.7), limonene (5.0 – 20.7), <i>p</i> -cymene (7.0 – 17.5) and 1,8-cineole (0.2 – 14.2)
<i>M. biflora</i>	Iran	[39]	Linalool (15.2), α -pinene (15.0) and (<i>E</i>)-nerolidol (13.8)
<i>M. biflora</i> subsp. <i>arabica</i> K. WALTH	India Saudi Arabia	[40] [41]	Geraniol (26.7 – 41.3) and nerol (25.3 – 32.2) (<i>E</i>)- β -caryophyllene (43.7), caryophyllene oxide (18.0), spathulenol (8.5), α -humulene (4.6) and germacrene D (3.1)
<i>M. congesta</i> Boiss.	Turkey	[42]	Piperitone oxide (40.0 – 45.0), pulegone (9.7 – 11.8) and verbenone (8.3 – 9.4)
<i>M. varia</i> L.	Spain	[43]	Borneol (19.2), α -pinene (13.9) and (<i>E</i>)-nerolidol (13.1)
<i>M. herpyllomorpha</i> L.	Spain	[43]	α -pinene (9.1 – 9.2), borneol (5.0 – 8.8) and verbenone (2.5 – 5.7)
<i>M. lachnophylla</i> L.	Spain	[43]	Borneol (22.0), bornyl acetate (16.9) and camphor (10.0)
<i>M. hyssopifolia</i> L.	Spain	[43]	Borneol (13.7), α -pinene (8.3) and camphor (5.0)
<i>M. lasiophylla</i> (L.) subsp. <i>palmensis</i>	Spain	[43]	Borneol (24.9), linalool (11.0) and camphor (8.6)
<i>M. teneriffae</i> BENTH.	Spain	[44]	α -pinene (20.3), borneol (14.9), nerolidol (10.9) and limonene (5.6)
<i>M. cilicia</i> L.	Turkey	[8]	Pulegone (64.1 – 66.6), <i>cis</i> - <i>p</i> -menthone (21.7 – 25.3) and <i>trans</i> - <i>p</i> -menthone (5.6 – 9.6)
<i>M. dolichodantha</i> P. H. DAVIS	Turkey	[45]	Isomenthone (23.5), <i>cis</i> -piperitone oxide (16.9), pulegone (14.9), piperitone (10.3) and piperitenone (7.7)
<i>M. carminea</i> P. H. DAVIS	Turkey	[46]	Borneol (26.0) and camphor (11.5)
<i>M. myrtifolia</i> Boiss. et HOHEN	Turkey	[47]	(<i>E</i>)- β -caryophyllene (42.6), caryophyllene oxide (9.1) and germacrene D (6.9)
<i>M. cremnophila</i> Boiss. Subsp. <i>amana</i> (RECH. FIL.) P. H. DAVIS	Turkey	[48]	Germacrene D (24.0), (<i>E</i>)- β -caryophyllene (23.0) and caryophyllene oxide (10.4)
<i>M. pulegium</i> L.	Serbia	[32]	Isomenthone (27.2), piperitone oxide (7.4), limonene (6.8) and <i>cis</i> -sabinene hydrate (6.4)
<i>M. cristata</i> L.	Serbia	[12]	Isoborneol (11.3), borneol (8.5), verbenone (8.2), 10- <i>epi</i> - α -cadinol (8.2) and thujan-3-ol (8.0)
<i>M. kosaninii</i> Silic	Serbia	[35]	Verbenol (11.7), linalool oxide (9.8) and borneol (8.2)
<i>M. libanotica</i> Boiss.	Lebanon	[49]	Isomenthone (44.5), pulegone (13.5) and isopulegone (6.5)
<i>M. Barbata</i>	Lebanon	[50]	Pulegone (20.2), limonene (16.6), neomenthol (12.4) and menthol (6.2)
<i>M. fruticulosa</i> Bertol.	Italy	[10]	γ -terpinene (14.5), (<i>E</i>)- β -caryophyllene (12.6), <i>p</i> -cymene (8.9), α -pinene (8.2) and β -bisabolene (7.2)

Table 2. (cont.)

Species	Origins	References	Main Components (%)
<i>M. graeca</i> L. BENTHAM & REICHENB.	Greece	[51]	Linalool (9.0 – 18.1), caryophyllene oxide (7.1 – 17.0), epi- α -bisabolol (5.6 – 12.8), β -chamigrene (tr – 12.5) and <i>trans</i> -verbenol (8.3 – 10.4)
<i>M. nubigena</i> H. B. K.	Egypt	[52]	Thymol (36.9), carvacrol (16.7), pulegone (10.8) and caryophyllene oxide (4.6)
<i>M. brownii</i> (SWARTZ) BENTH. var. <i>pilosiuscula</i> GRAY	USA	[53]	Pulegone (51.7), menthone (20.9) and neomenthol (11.9)
<i>M. syriaca</i>	Israel	[54]	Thymol (tr – 41.1), carvacrol (15.6 – 40.2) and <i>p</i> -cymene (tr – 19.7)

correlation between the chemical composition of individual oil samples and the nature of the soil in which the plants grew. In addition, the antimicrobial activity of collective essential oil against various nosocomial, community and toxic infections was demonstrated. The activity is linked to the occurrence of oxygenated compounds. The present results might be useful for the future commercial valorization of this plant by producing *M. inodora* essential oil.

Experimental Section

Plant Material and Essential-Oil Isolation

The aerial parts of *M. inodora* (DESF.) BENTH. from Western Algeria were collected at the flowering stage (December 2012 to January 2013) from 24 locations (S1 – S24) widespread in the littoral of Tlemcen Department. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen. The geographical origin of the different samples and the voucher number of each specimen analyzed are listed in Fig. 1. Essential oils were obtained from fresh aerial parts by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus according to the *European Pharmacopoeia*,^[72] yielding (w/w) 0.15 – 0.80% of yellow essential oils.

Oil Fractionation

The *M. inodora* collective oil was obtained by pooling of the 24 individual oils from the 24 Algerian locations. A portion of 1.0 g of essential oil was submitted to chromatography on a SiO₂ column (200 – 500 μ m, 12 g, Clarisep® Bonna Agela Technologies, Willington, USA) using an *Automatized Combi Flash* apparatus (Teledyne ISCO, Lincoln, USA) equipped with a fraction collector monitored by an UV detector. A nonpolar fraction (*Fr. FH*: hydrocarbon compounds, 0.15 g) and five polar fractions (*Frs. FO1 – 5*: oxygenated compounds, 0.81 g) were obtained by elution with hexane and diisopropyl ether (DIPE). Elution with hexane and DIPE (95:5), allowed to concentrate *trans*-sesquibinene hydrate (**1**, 50.3%), *trans*-7-epi-sesquibinene hydrate (**6**, 1.3%), viridiflorol (18.8%), ledol (4.3%), α -acorenenol (1.5%) and β -bisabolol (**5**, 8.2%) in the *Fr. FO2* (0.43 g). All fractions were analyzed by GC and GC/MS and the polar fraction *Fr. FO2* was analyzed by ¹³C-NMR.

GC Analysis

The GC analyses were carried out using a *Perkin Elmer Clarus 600* apparatus (Walton, MA, USA) equipped with

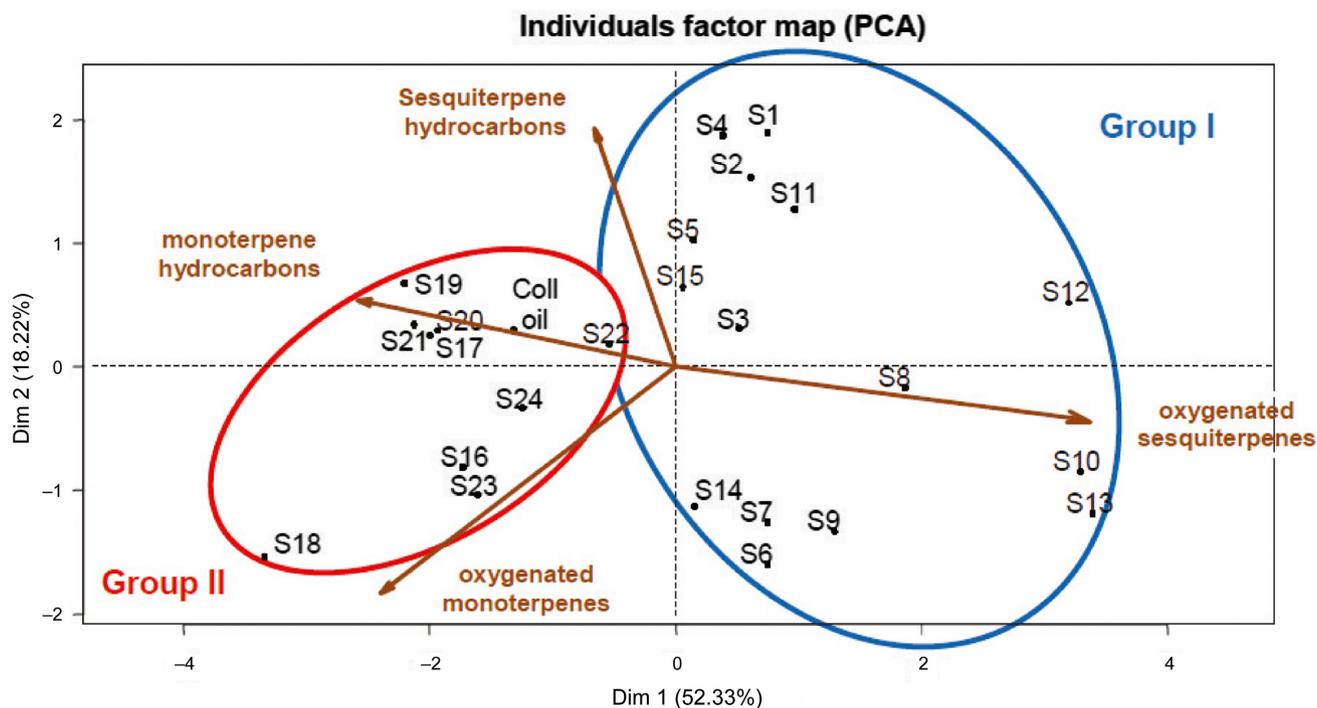


Figure 3. PCA of chemical compositions of *Micromeria inodora* essential oils. Distribution of variables (class of compounds corresponding to those of Table (Supplementary Material) and distribution of samples (coding numbers of locations).

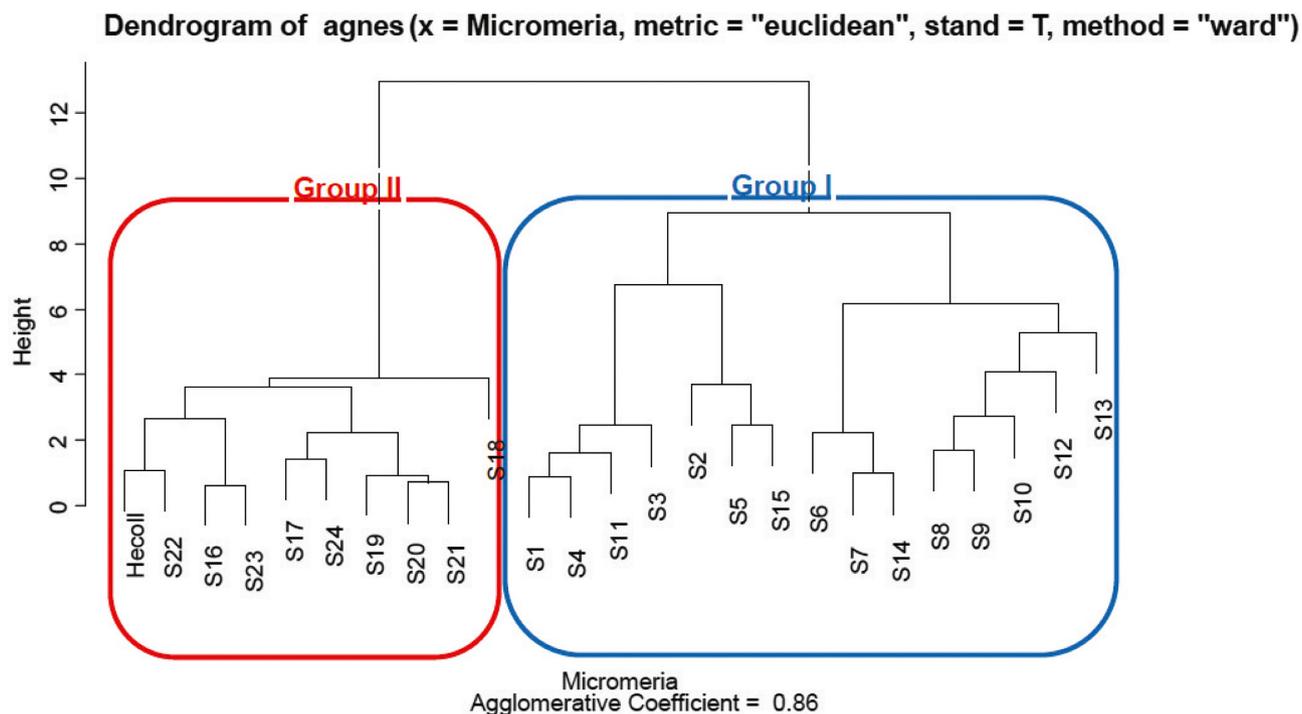


Figure 4. CA of chemical compositions of *Micromeria inodora* essential oils from western Algeria.

a single injector and two flame-ionization detectors (FIDs) for simultaneous sampling to two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm; Restek, Bellefonte, PA, USA) with stationary

phases of different polarity, *i.e.* a nonpolar *Rtx-1* (polydimethylsiloxane) and a polar *Rtx-Wax* (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed rising from 60 to 230° at 2°/min and then held isothermal

Table 3. Antimicrobial activities of *Micromeria inodora* collective essential oil expressed by the diameter inhibition zones and MIC values ([$\mu\text{g/ml}$])

Strains	Diameters [mm]			MIC ^a [$\mu\text{g/ml}$]		
	Essential oil	ATB ^b		Essential oil	ATB	
		GENT ^c	AmB ^d		GENT	AmB
<i>Gram-positive bacteria</i>						
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	19.00 \pm 0.33	21	ND	500		ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17.00 \pm 0.66	19	ND	500	4	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	23.00 \pm 0.66	20	ND	60	2	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	21.00 \pm 0.33	19	ND	60	2	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	22.00 \pm 0.33	21	ND	60	2	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	14.00 \pm 00	11	ND	500	2	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	8.00 \pm 0.33	20	ND	4000	2	ND
<i>Gram-negative bacteria</i>						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6.00 \pm 0.66	10	ND	ND	4	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	6.00 \pm 0.66	11	ND	ND	4	ND
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453	7.00 \pm 0.33	21	ND	ND	4	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7.00 \pm 0.33	16	ND	4000	4	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	8.00 \pm 00	11	ND	4000	4	ND
<i>Yeasts</i>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11.00 \pm 00	ND	23	1000	ND	1
<i>Candida albicans</i> IP 444	13.00 \pm 0.33	ND	18	1000	ND	0.125

^a MIC, minimum inhibitory concentration (given as $\mu\text{g/ml}$); ^b ATB, antibiotics; ^c GENT, gentamicine (15 μg); ^d AmB, amphotericin B (100 μg); ND, not determined.

at 230° for 30 min; injector temp., 280°; detector temp., 280°; carrier gas, H₂ (0.7 ml/min); split ratio, 1:80; injected volume, 0.1 μl . The retention indices (*R*_I) of the compounds were determined rel. to the retention times (*t*_R) of a series of *n*-alkanes (C₅ – C₃₀; commercial soln. obtained from Restek, Bellefonte, PA, USA) using the Van den Dool and Kratz equation.

GC/MS Analysis

The essential oils and the fractions obtained by CC were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole detector directly coupled to a Perkin Elmer AutoSystem XL (Walton) equipped with the two same fused-silica cap. columns as described above. Both columns were used with the same MS detector. The analyses were consecutively carried out on the nonpolar and on the polar column. Hence, for each sample, two reconstructed ionic chromatograms (RIC) were provided, which were investigated consecutively. The GC conditions were the same as described above, and the MS parameters were as follows: ion-source temp., 150°; ionization energy; 70 eV; EI-MS spectra acquired over a mass range of 35 – 350 *uma* during a scan time of 1 s. The injection volumes for the oil and the fractions were 0.1 and 0.2 μl , resp.

NMR Analysis Conditions

Spectra of oxygenated *Fr. FO2* obtained by CC was measured in CDCl₃ (Euroisotop, Saint Aubin, France), at 300K using a Bruker Avance DRX 500 NMR spectrometer (Karlsruhe, Germany) operating at 500.13 MHz for ¹H and 125.77 MHz for ¹³C Larmor frequency with a double resonance broadband fluorine observe (BBFO) 5 mm probe head. ¹³C-NMR experiments were recorded using one-pulse excitation pulse sequence (90° excitation pulse) with ¹H decoupling during signal acquisition (performed with WALTZ-16); the relaxation delay has been set at 2 s. For each analysed sample, depending on the compound concentration, 3k up to 5k free induction decays (FID) 64k complex data points were collected using a spectral width of 30000 Hz (240 ppm). δ in ppm relative to residual signal of CDCl₃ (δ (C) 77.04 ppm).

Component Identification

Identification of the components was based *i)* on the comparison of their GC retention indices (*R*_I) on apolar and polar columns, determined to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literatures

data,^{[20][73]}; ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries,^[74] and comparison of spectra with those of our laboratory-made library. Strategy based on ¹³C-NMR analysis of the mixture was used for the identification of *trans*-sesquisabinene hydrate **1**, *trans*-7-epi-sesquisabinene hydrate **6**, viridiflorol, ledol, α -acorenol and β -bisabolol **5**. The compounds were concentrated in the polar fraction (Fr. FO2) obtained by CC and then they were identified by the comparison of their ¹³C-NMR chemical shifts in the mixture with those of references^[16–19] (*Supplementary Material*).

Component Quantification

The quantification of the oil was performed using the methodology reported by *Bicchi et al.*,^[75] and adapted in our laboratory.^[76] Briefly, the compound quantification was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) relative to tridecane (0.7 g/100 g) used as internal standard and expressed as normalized% abundance.

Statistical Analysis

Data analyses were performed using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA). Both methods aim at reducing the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed, but are complementary in their ability to present results.^[77]^[78] Indeed, PCA provides the data for plots in which both objects (oil samples) and variables (oil components) are represented, while canonical analysis (CA) informs a classification tree in which objects (sample locations) are gathered. The PCA was carried out using the function PCA of the statistical R software (R Foundation, Institute for Statistics and Mathematics, Austria). The discriminate variables (volatile components) have been selected using function of the statistical software. A dendrogram (tree) was produced by CA using *Ward's* method of hierarchical clustering, based on *Euclidean* distances between pairs of oil samples.

Microbial Strains

Fourteen reference strains were used for this work, including seven *Gram*-positive bacteria: *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 33862, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778 and *L. monocytogenes* ATCC 19115. Five *Gram*-negative bacteria: *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 *Salmonella enteritidis* ATCC 2453 and two yeasts; *Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida albicans* IPP444 were also studied.

Preparation of Inoculum

The pure strains were inoculated into tubes containing 5 ml of Brain Heart Infusion (*CondaPronadisa*TM, Spain) were then incubated at 37 °C for 18 h. A concentration of 0.5 McFarland has been adjusted and which corresponds to 10⁷ CFU/ml according to the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI.^[79]

Sensitivity Tests

Disc Diffusion Method. The susceptibility of strains to the essential oil was tested according to the method described by *Bauer and Kirby*.^[80] A culture of 18–24 h of the tested strains on *Müller–Hinton* broth was prepared at a concentration of 10⁷ CFU/ml and then seeded on *Müller–Hinton* agar (*FlukaBioChemika*, Spain) and *Sabouraud* (*FlukaBioChemika*, Spain) for the yeast *Candida albicans* by swab as recommended by CLSI.^[79] A sterile disc of 6 mm diameter impregnated with 5 μ l of essential oil was aseptically deposited in the center of the inoculated plate.

MICs

The minimum inhibitory concentration was performed by the method of microplate (96 wells) round bottom using as reported in literature.^[81] The essential oil has undergone successive dilution of 1/2 in the outer tubes in *Müller–Hinton* broth (*FlukaBioChemika*, Spain) by adding *Tween 80* to a concentration of 1% (v/v) to obtain a homogeneous solution of essential oil and broth. A second solution was prepared containing only *Müller–Hinton* broth and *Tween 80* at a concentration of 1%, this concentration was used as a complement of dilutions with broth and *Tween 80* for grader the same concentration of *Tween 80*; 1% for each concentration of essential oil.

Inocula of 10⁷ CFU/ml were diluted by 1/100 for a concentration of 10⁵ CFU/ml. On microplate, 180 μ l of bacterial suspension 10⁵ CFU/ml were deposited inside the wells. Then 20 μ l of the solution of the essential oil was added. The final concentration of *Tween 80* is 0.1% (v/v) to each well and the final concentrations of the essential oil ranged from 0.0078% to 4%.

Supplementary Material

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600098>

Acknowledgements

The authors are indebted to the *French Ministry of Foreign Affairs* through bilateral program France - Algeria research 'Hubert Curien Partnership Tassili', and to *Fayçal HASSANI* and *Tawfik FEROUANI* from Université de Tlemcen, Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Département d'Ecologie & Environnement, to botanical identification of *M. inodora*.

References

- [1] R. M. Harley, S. Atkins, A. Budantsev, P. D. Cantino, B. J. Conn, R. Grayer, M. M. Harley, R. De Kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A. J. Paton, O. Ryding, T. Upson, 'Labiatae', in 'The Families and Genera of Vascular Plants', Ed. J. W. Kadereit, Springer, Berlin, 2004.
- [2] C. Bräuchler, H. Meimberg, T. Abele, G. Heubl, *Taxon*. **2005**, *54*, 639.
- [3] H. Meimberg, T. Abele, C. Bräuchler, J. K. McKay, de Pérez Paz P. L., G. Heubl, *Mol. Phylogenet. Evol.* **2006**, *41*, 566.
- [4] P. Quezel, S. Santa, 'Nouvelle Flore de l'Algérie', Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963.
- [5] P. L. Pérez de Paz, Revision del género *Micromeria* Benthams in la región macaromésica, La Laguna de Tenerife, 1978.
- [6] R. M. Valverde, *An. Jard. Bot. Madr.* **1991**, *48*, 131.
- [7] M. S. Ali-Shtayeh, R. M. Yaghmour, Y. R. Faidi, K. Salem, M. A. Al-Nuri, *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *60*, 265.
- [8] M. E. Duru, M. Ozturk, A. Ugur, O. Ceylan, *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 43.
- [9] I. Telci, M. Ceylan, *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 629.
- [10] C. Formisano, E. Mignola, D. Rigano, F. Senatore, G. Bellone, M. Bruno, S. Rosselli, *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 289.
- [11] M. Güllüce, M. Sökmen, F. Şahin, A. Sökmen, A. Adigüzel, H. Özer, *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 735.
- [12] G. Stojanović, I. Palić, J. Ursić-Janković, *Flavour Frag. J.* **2006**, *21*, 77.
- [13] B. Marinkovic, P. D. Marin, J. Knezevic-Vukcevic, M. D. Sokovic, D. Brkic, *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 336.
- [14] J. Mastelić, I. Jerković, D. Kuštrak, *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 516.
- [15] B. Morsli, M. Mazour, M. Arabi, N. Mededjel, R. Roose, 'Influence of Land Use, Soils and Cultural Practices on Erosion, Eroded Carbon, and Soil Carbon Stocks at the Plot Scale in the Mediterranean Mountains of Northern Algeria', in 'Soil Erosion and Dynamics', Eds. E. J. Roose, R. Lal, C. Feller, B. Barthès and B. A. Stewart, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2006, p. 117.
- [16] P. Weyersthal, H.-C. Wahlburg, U. Splittgerber, H. Marschall, *Flavour Frag. J.* **1994**, *7*, 179.
- [17] I. Bombarda, P. Raharivelomanana, P. A. R. Ramanoelina, R. Faure, J.-P. Bianchini, E. M. Gaydou, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *447*, 113.
- [18] P. Weyersthal, S. Schneider, H. Marschall, A. Rustaiyan, *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 111.
- [19] P. Weyersthal, H. Marschall, K. Thefeld, G. C. Subba, *Flavour Frag. J.* **1998**, *13*, 377.
- [20] W. A. König, D. H. Hochmuth, D. Joulain, 'Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of Mass Finder 2.1', Institute of Organic Chemistry, Hamburg, 2001.
- [21] N. Kirimer, T. Özek, K. H. C. Baser, M. Harmandar, *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 199.
- [22] N. G. Shehab, E. Abu-Gharbieh, *Pak. J. Pharm. Sci.* **2012**, *25*, 687.
- [23] N. Kirimer, G. Tümen, T. Özek, K. H. C. Baser, *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 79.
- [24] Z. Fleisher, A. Fleisher, *J. Essent. Oil Res.* **1991**, *3*, 477.
- [25] N. Kirimer, *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 521.
- [26] K. H. C. Baser, N. Kirimer, T. Özek, G. Tümen, F. Karaer, *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 699.
- [27] M. Al-Hamwi, Y. Bakkour, M. Abou-Ela, A. El-Lakany, M. Tabcheh, F. El-Omar, *J. Nat. Prod.* **2011**, *4*, 147.
- [28] L. Karuza-Stojakovic, S. Pavlovic, P. Zivanovic, B. Todorovic, *Arhiva Farmaciju.* **1989**, *39*, 59.
- [29] K. P. Šavikin, N. R. Menković, G. M. Zdunić, S. R. Tasić, M. S. Ristić, T. R. Stević, Z. P. Dajić-Stevanović, *J. Essent. Oil Res.* **2010**, *22*, 91.
- [30] N. S. Radulović, P. D. Blagojević, *Chem. Biodiversity* **2012**, *7*, 1303.
- [31] E. Kostadinova, K. Alipieva, M. Stefova, T. Stafilov, D. Antonova, L. Evstatieva, V. Matevski, S. Kulevanova, G. Stefkov, V. Bankova, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2007**, *26*, 3.
- [32] V. Slavkovska, M. Couladis, S. Bojovic, O. Tzakou, M. Pavlovic, B. Lakusic, *Plant Sys. Evol.* **2005**, *255*, 1.
- [33] R. Karoussou, E. Hanlidou, D. Lazari, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 2775.
- [34] B. Galambosi, B. E. Hethelyi, *Olaj. Szappan. Kozmetika.* **2008**, *57*, 93.
- [35] I. Palić, J. Ursić-Janković, G. Stojanović, *J. Essent. Oil Res.* **2010**, *22*, 40.
- [36] G. Stojanovic, I. Palic, J. Ursic-Jankovic, V. Vajs, D. Dokovic, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 785.
- [37] D. Kremer, E. Stabentheiner, V. Dunkic, I. D. Muller, L. Vujic, I. Kosalec, D. Ballian, F. Bogunic, N. Bezic, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 755.
- [38] F. Sefidkon, R. Kalvandi, *Flavour Frag. J.* **2005**, *20*, 539.
- [39] S. Masoudi, L. Azad, B. Arabshahi, M. Yari, M. Jamzad, H. Akhlaghi, A. Motevalzadeh, A. Rustaiyan, *J. Essent. Oil Res.* **2009**, *21*, 515.
- [40] G. R. Mallavarapu, S. Ramesh, K. Subrahmanyam, *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 23.
- [41] A. J. Al-Rehaily, *Pak. J. Pharm. Sci.* **2006**, *9*, 2726.
- [42] N. Kirimer, T. Özek, K. H. C. Baser, *J. Essent. Oil Res.* **1991**, *3*, 387.
- [43] M. J. Perez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, M. Gil-Pinilla, dePérez Paz P. L., C. G. Vallejo, J. L. Esteban, *Bioch. Syst. Ecol.* **1996**, *24*, 571.
- [44] B. M. Lawrence, *J. Essent. Oil Res.* **1989**, *1*, 43.
- [45] K. H. C. Baser, N. Kirimer, H. Duman, *Flavour Frag. J.* **1997**, *12*, 289.
- [46] K. H. C. Baser, N. Kirimer, G. Tümen, *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7*, 457.
- [47] T. Özek, N. Kirimer, K. H. C. Baser, *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 79.

- [48] K. H. C. Baser, B. Demirçakmak, H. Duman, *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 725.
- [49] Y. Diab, L. Auezova, H. Chebib, J. C. Chalchat, *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 449.
- [50] Y. Bakkour, S. Alwan, H. Soufi, N. El-Ashi, M. Tabcheh, F. El Omar, *J. Nat. Prod.* **2012**, *5*, 116.
- [51] O. Tzakou, M. Couladis, *Flavour Frag. J.* **2001**, *16*, 107.
- [52] H. R. El-Seedi, A. Khattab, A. H. M. Gaara, T. K. Mohamed, N. A. Hassan, A. E. El-kattan, *J. Essent. Oil Res.* **2008**, *20*, 452.
- [53] A. O. Tucker, M. J. Maciarello, D. McCrory, *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 301.
- [54] U. Ravid, E. Putievsky, *Essent. Oils Aroma. Plants* **1985**, *15*, 155.
- [55] M. Bonneau, B. Souchier, *Pedologie 2, Contribution et Propriétés du sol*, Masson. ed. Paris, 1994.
- [56] D. Bouaoune, M. Dahmani-Megrerouche, *C. R. Geosci.* **2010**, *342*, 815.
- [57] A. R. Duarte, S. C. Santos, J. C. Seraphin, P. C. Ferri, *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1672.
- [58] S. C. Chao, D. G. Young, C. J. Oberg, *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 639.
- [59] D. Kalemba, A. Kunicka, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813.
- [60] A. Smith-Palmer, J. Stewart, L. Fyfe, *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, *26*, 118.
- [61] C. J. Longbottom, C. F. Carson, K. A. Hammer, B. J. Mee, T. V. Riley, *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 386.
- [62] C. Mann, S. Cox, J. Markham, *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, *30*, 294.
- [63] A. G. Ponce, R. Fritz, C. del Valle, S. I. Roura, *Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 679.
- [64] G. L. Archer, *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 1179.
- [65] H. F. Chambers, F. R. De Leo, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 629.
- [66] J. K. Yang, M. S. Choi, W. T. Seo, D. L. Rinker, S. W. Han, G. W. Cheong, *Fitoterapia* **2007**, *78*, 149.
- [67] A. Ait-Ouazzou, L. Cherrat, L. Espina, S. Loraan, C. Rota, R. Pagan, *Trends Food Sci. Tech.* **2011**, *12*, 320.
- [68] M. Tan, L. G. Zhou, Y. F. Huang, X. J. Hao, J. C. Wang, *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 569.
- [69] D. Yang, L. Michel, J. P. Chaumont, J. Millet-Clerc, *Mycopathologia* **2000**, *148*, 79.
- [70] Z. Toker, G. Kizil, H. C. Ozen, M. Kizil, S. Ertekin, *Fitoterapia* **2006**, *77*, 57.
- [71] O. Boussaada, S. Ammar, D. Saidana, J. Chriaa, I. Chraif, M. Daami, A. N. Helal, Z. Mighri, *Microbiolo. Res.* **2008**, *163*, 87.
- [72] Council of Europe, 'European Pharmacopoeia', Council of Europe, Strasbourg, 1997.
- [73] W. Jennings, T. Shibamoto, in 'Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography', Ed. H. B. Jovanovich, Academic Press, New-York, 1980.
- [74] F. W. McLafferty, D. B. Stauffer, 'The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data', Wiley-Interscience, New-York, 1988.
- [75] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. A. Zellner, R. Costa, P. Rubiolo, *Flavour Frag. J.* **2008**, *23*, 382.
- [76] N. Djabou, S. Andreani, L. Varesi, F. Tomi, J. Costa, A. Muselli, *Flavour Frag. J.* **2013**, *28*, 14.
- [77] R. G. Brereton, 'Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant', Wiley Interscience, New-York, 2003.
- [78] D. L. Massart, 'Chemometrics: A Textbook', Elsevier Science Ltd., New-York, 1998.
- [79] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, 2011.
- [80] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493.
- [81] I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163.

Received March 31, 2016

Accepted May 31, 2016

[A2] : Genre *Mentha* (activités biologiques)

F. Z. Benomari, V. Andreu, J. Kotarba, M. A. Dib, C. Bertrand, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou.
« Essential Oils from Algerian Species of *Mentha* as New Bio-control Agents Against Phytopathogen Strains ». *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-017-9991-4. **2017.**



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains

Fatima Zahra Benomari^{1,2} · Vanessa Andreu³ · Jules Kotarba³ ·
Mohammed El Amine Dib¹ · Cédric Bertrand^{3,4} · Alain Muselli² · Jean Costa² ·
Nassim Djabou¹ 

Received: 23 February 2017 / Accepted: 22 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian *Mentha* species were studied. Chemical compositions of different *Mentha* species oils (*Mentha rotundifolia*, *M. spicata*, *M. pulegium*, and *M. piperita*) were investigated by capillary GC and GC/MS, and their antifungal activities were evaluated by means of paper disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. In total, 98 components from all *Mentha* species were identified. All oils were rich in monoterpenoxygenated components. In addition, we reported fumigant antifungal activity of Algerian *Mentha* essential oils against four fungi: *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa*, and *M. fructigena*. All oils demonstrated very good inhibition especially against *B. cinerea*, *M. laxa*, and *M. fructigena*. Both *Monilinia* fungi were extremely sensitive to all Algerian *Mentha* oils, which suggests that *Mentha* essential oils have the potential to be used as bio-pesticides to protect fruit trees, such as apple and pear trees, and provides an alternative to chemical pesticides.

Keywords *Mentha rotundifolia* · *Mentha spicata* · *Mentha pulegium* · *Mentha piperita* · Essential oils · Chemical composition · Bio-control · Fumigant antifungal activity

Introduction

Aromatic plants are increasingly used in agro-alimentary storage and bio-agriculture pest control. Essential oils and volatile constituents extracted from these plants are widely used as new bio-control alternative agents against microbial strains and insect pests, because of their specificity of action, biodegradable nature, and potential for commercial application (Kerdchoechuen et al. 2010; Park et al. 2003).

The Taxa of genus *Mentha* (*Lamiaceae* family) includes 25 species of herbaceous perennial (rarely annual) plants (Celenk et al. 2008; Fenwick and Ward 2001; Gobert et al. 2002; Khanuja et al. 2000; Krasnyanski et al. 1998; Shasany et al. 2005). Mints are distributed predominantly in the temperate region of the world and show substantial variation in terms of their natural habitats, growth characteristics, and aromas (Celenk et al. 2008; Shasany et al. 2005).

The genus *Mentha* consists of some of the most frequently cultivated spice plants in the world. Many species of *Mentha* are used in traditional folk medicine for many of its properties. *Mentha* EOs were known to be rich in oxygenated monoterpenes (Rösch et al. 2002). Depending on the nature of major components, they were used in several commercial and industrial fields. Recently, many works has shown strong activities of *Mentha* EOs as bio-control agents and possible substitute of traditional chemical fungicides, pesticides, and insecticides (Al-Bayati 2009; Al Yousef 2013; Mahboubi and Haghi 2008; Mohammadi et al. 2015; Odeyemi et al. 2008; Santana-Méridas et al. (2014, 2017); Soković et al. 2009).

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Nassim Djabou
nassim.djabou@mail.univ-tlemcen.dz

¹ Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université de Tlemcen, Laboratoire COSNA, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

² UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, Université de Corse, Laboratoire CPN, BP 52, 20250 Corte, France

³ AKINAO, 52 av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

⁴ PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

In Algeria, the literature reported the occurrence of six species of *Mentha* genus: *M. rotundifolia*, *M. spicata*, *M. pulegium*, *M. piperita*, *M. longifolia*, and *M. aquatica*, and also three hybrids of these species: *M. durandoana*, *M. niliaca*, and *M. schultzei* (Quezel and Santa 1963). The same reference reported that *M. longifolia* and *M. aquatica* were very rare at that time and probably decimated now.

In the context of our characterization of Algerian aromatic plants, we investigated the chemical composition of four species of *Mentha*: *M. rotundifolia*, *M. spicata*, *M. pulegium*, and *M. piperita* from western Algeria, by analyzing their essential oils. A comparative analysis was performed between chemical compositions of all species. A chemical analysis was performed using a combination of capillary GC-RI and GC/MS after fractionation using column chromatography. Lastly, we report the bio-control effect for all essential oils against four fungal pathologies (*M. fructigina*, *M. laxa*, *Penicillium expansum*, and *Botrytis cinerea*) through the use of a fumigant antifungal assay.

Materials and methodologies

Plant material and oil isolation

The aerial parts of all *Mentha* from western Algeria were collected at the flowering stage (July 2014 to September 2014) from 11 location areas: 4 locations from *M. rotundifolia* (MRO1–MRO4), 2 locations from *M. spicata* (MSP1, MSP2), 3 locations from *M. pulegium* (MPU1–MPU3), and 2 locations from *M. piperita* (MPI1, MPI2) (Fig. 1). From each location, many samples were collected to poll collective oils from the same species. For all species, voucher specimens were

deposited in the Herbarium of the University of Tlemcen. Essential oils were obtained from the fresh aerial parts of all stations by hydrodistillation for 4 h using a Clevenger-type apparatus according to the *European Pharmacopoeia* (Council of Europe 1997) and yielded (w/w) 0.78–0.96% from *M. rotundifolia*, 0.50–0.56% from *M. spicata*, 0.70–0.75% from *M. pulegium*, and 0.67–0.72% from *M. piperita* (see Fig. 1).

Gas chromatography

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and two flame ionization detectors (FIDs). The apparatus was used for simultaneous sampling of two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Temperature program 60 to 230 °C at 2 °C min⁻¹ and then held isothermal 230 °C (30 min). Carrier gas was hydrogen (0.7 mL min⁻¹). Injector and detector temperatures were held at 280 °C. Split injection was conducted with a split ratio of 1:80. Injected volume was 0.1 μL.

Gas chromatography-mass spectrometry

The oils and the fractions obtained by CC were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole analyzer, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature was

	Species ^a	N° Voucher ^b	Localities ^c	GPS Coordinates ^d	Yields ^e	Alt. ^f	
Mentha species	<i>rotundifolia</i>	MRO1	MRO-0714-KA1	Oulhassa1	35°11'50"N ; 1°29'24"O	0.78	476
		MRO2	MRO-0714-KA2	Oulhassa2	35°12'46"N ; 1°29'41"O	0.91	269
		MRO3	MRO-0714-KA3	Lakhmis	34°38'03"N ; 1°33'56"O	0.96	845
		MRO4	MRO-0714-KA4	Ain kebira	35°01'51"N ; 1°41'30"O	0.90	507
	<i>spicata</i>	MSP1	MSP-0714-KA1	Oudjlida	34°55'21"N ; 1°19'43"O	0.56	616
		MSP2	MSP-0714-KA2	Ouchba	34°52'11"N ; 1°10'52"O	0.50	779
	<i>pulegium</i>	MPU1	MPU-0714-KA1	Maaziz	34°54'35"N ; 1°48'28"O	0.70	526
		MPU2	MPU-0714-KA2	Ghazaouet	35°04'56"N ; 1°51'05"O	0.73	48
		MPU3	MPU-0714-KA3	Djbal	34°58'16"N ; 1°45'10"O	0.75	949
	<i>piperita</i>	MPI1	MPI-0714-KA1	Ouzidene	34°57'00"N ; 1°17'33"O	0.72	456
		MPI2	MPI-0714-KA2	Ourite	34°52'02"N ; 1°16'00"O	0.67	734

^a Sampler codes

^b Voucher codent

^c Harvest localities

^d Sample positioning

^e Yields % (w/w)

^f Altitudes (m)

Fig. 1 Geographical distribution of *Mentha* species from western Algeria

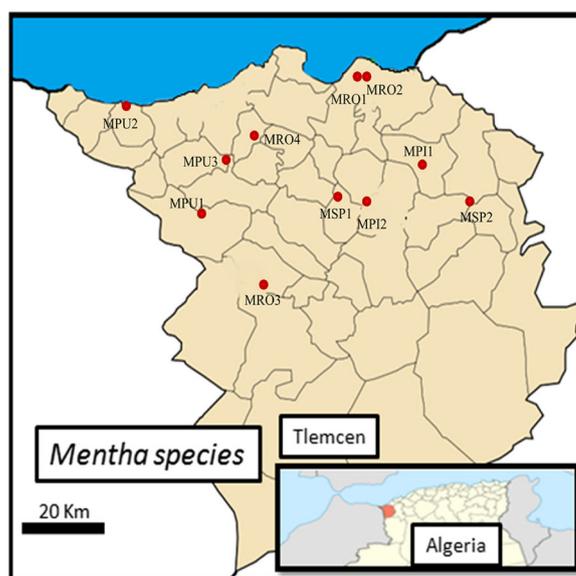


Table 1 Chemical compositions of *Mentha* essential oils from Algeria

		<i>Mentha</i> species ^e																
No. ^a	Composés	<i>Rotundifolia</i>				<i>Spicata</i>				<i>Pulegium</i>				<i>Piperita</i>				Identification
		IRI _d ^b	RI _d ^c	RI _p ^d	MRO1	MRO2	MRO3	MRO4	MSP1	MSP2	MPU1	MPU2	MPU3	MPII	MPI2			
1	(E)-Hex-3-en-1-ol	812	810	1360			tr	tr										RI, MS
2	Ethyl-2-methyl butyrate	829	829	1016	tr	0.4	0.3	0.1	tr	tr								RI, MS
3	(E)-2-hexenal	830	830	1210	0.1	0.2	0.3	0.1	tr	tr						0.1	0.1	RI, MS
4	(Z)-hex-3-en-1-ol	831	832	1375	tr	tr	0.1	0.1										RI, MS
5	(Z)-2-hexenol	851	848	1400	tr	tr	0.1	tr										RI, MS
6	1-Hexenol	852	851	1414	0.1	tr	0.1	tr										RI, MS
7	α-Thujene	922	923	1021	0.4	0.6	0.2	0.2	0.1	0.4	0.1	tr	tr	0.1	tr			RI, MS
8	α-Pinene	931	932	1023	0.7	1.2	0.8	0.4	0.3	0.7	0.5	0.2	0.1	0.2	0.2			RI, MS
9	Camphene	943	944	1066	0.5	0.5	0.3	tr										RI, MS
10	Oct-1-en-3-ol	959	962	1440	1.8	1.6	1.8	0.5				0.4	0.2					RI, MS
11	Sabinene	964	966	1118	0.2	1	0.3	0.2										RI, MS
12	β-Pinene	970	972	1108	0.6	0.6	0.9	0.4	0.4	0.7	0.2	0.1	0.1	0.5	0.3			RI, MS
13	Myrcene	976	982	1159	0.9	1.2	0.9	1.3	0.7	3.3	tr	tr	tr	1.9	1.2			RI, MS
14	3-octanol	982	982	1350	0.1	0.5	0.1	0.2				0.8	0.5	0.3				RI, MS
15	γ-Phellandrene	997	998	1164	0.2	0.3			0.1	0.1								RI, MS
16	α-Terpinene	1008	1010	1175	1.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.3								RI, MS
17	p-Cymene	1010	1012	1259	0.7	0.4	0.8	1.0	tr	0.1								RI, MS
18	Limonene	1020	1021	1195	1	1.9	1.3	0.3	8.4	21.9	1.1	1	1.5					RI, MS
19	1,8-cineole	1020	1021	1205	0.5	0.3	0.4	0.2	0.2		0.6	1.0	0.4	5.4	3.8			RI, MS
20	(Z)-β-ocimene	1024	1025	1225	0.8	1.8	0.7	0.2						0.4	0.4			RI, MS
21	(E)-β-ocimene	1034	1036	1241	0.1	0.2	0.1	tr	tr	0.4				0.2	0.4			RI, MS
22	γ-Terpinene	1047	1049	1237	3.2	0.9	0.4	0.3	0.1	0.7	0.1	0.4	0.2	0.3	0.2			RI, MS
23	Trans-hydrate sabinene	1051	1054	1444	3.9	2.8	0.9	3.0	tr	1.7								RI, MS
24	Terpinolene	1078	1080	1247	0.8	0.2	0.2	0.5	0.1	0.1		tr	tr	0.1	0.1			RI, MS
25	Linalool	1078	1075	1280					0.6	0.2	tr	tr	tr	47.6	40.4			RI, MS
26	Nonanal	1083	1082	1394	0.2	0.4												RI, MS
27	Cis-sabinene hydrate	1083	1082	1535	0.9	1.2	tr	0.1	0.1	0.5								RI, MS
28	1-Oct-3-enyl acetate	1093	1087	1390	6.5	3.2	0.7	0.1			tr	0.1	tr					RI, MS
29	2-Methyl-butyl isovalerate	1098	1096	1274										0.4	0.4			RI, MS
30	Cis-p-menth-2-en-1-ol	1108	1110	1600	0.6	0.4	tr	0.1						tr	tr			RI, MS, Ref
31	3-Octyl acetate	1111	1110	1315										0.2	0.2			RI, MS
32	Trans-p-menth-2-en-1-ol	1123	1126	1612	0.3	0.4	0.1	tr						0.1	tr			RI, MS, Ref
33	Menthone	1134	1135	1456			16.8	28.5	10.8	38.3	40.5							RI, MS

Table 1 (continued)

		<i>Mentha</i> species ^a													
34	p-Menth-3-en-8-ol	1135	1135	1590		0.7	3.1								RI, MS
35	Iso-menthone	1143	1142	1490		5.5	19.0		0.7	1.7	0.6				RI, MS
36	Borneol	1148	1150	1690	1.7	1.4	0.1								RI, MS
37	Cis-iso-pulegone	1152	1151	1569		0.1									RI, MS
38	Trans-iso-pulegone	1152	1151	1580		tr									RI, MS
39	Neo-Menthol	1156	1157	1637		2.4	10.4	0.1	0.2	9.1	42.3				RI, MS
40	p-Cymen-8-ol	1161	1162	1833	0.4	0.7									RI, MS
41	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	10.4	3.4	2.7	1.3							RI, MS
42	Menthol	1164	1163	1629		0.1	1.4		tr	tr	0.1				RI, MS
43	Iso-menthol	1174	1173	1660		0.2	2.1		tr	0.1	0.1				RI, MS
44	Z-dihydro carvone	1175	1174	1601				2.3	2.6						RI, MS
45	Dihydro carveol	1178	1174	1723				tr	tr						RI, MS
46	α-Terpincol	1179	1177	1688	0.1	0.9	0.1	2.9		0.2	0.1	10.4	6.4		RI, MS
47	E-dihydro carvone	1180	1180	1626					3.1						RI, MS
48	α-Campholenol	1186	1188	1782	0.2	0.2	tr								RI, MS
49	Nerol	1211	1213	1799			tr					1.7	1.1		RI, MS
50	Pulegone	1213	1216	1640	0.2	0.3	56.3	5.6		77.3	40.7	9.2	0.3	0.1	RI, MS
51	Carvone	1222	1226	1739				79.3	54.1						RI, MS
52	Z-piperitone oxide	1230	1229	1700				11.7							RI, MS
53	E-piperitone oxide	1230	1229	1722				10.6							RI, MS
54	Piperitone	1232	1229	1727		tr	0.1	1.3		2.3	0.9				RI, MS
55	Geraniol	1232	1234	1844								5	2.4		RI, MS
56	Linalyl acetate	1240	1237	1557					tr	tr	tr	12	32.6		RI, MS
57	Geranial	1244	1243	1731								0.5	0.2		RI, MS
58	Lyratal acetate	1256	1258	1630		0.1									RI, MS
59	Pulegyl acetate	1260	1258	2113			0.1								RI, MS
60	Neryl formate	1263	1266	1647								tr	0.1		RI, MS
61	Neo-menthyl acetate	1263	1268	1548			0.3	5.0		0.9	0.5				RI, MS, Ref
62	Bornyl acetate	1269	1268	1475	0.9	1.4	0.1	tr							RI, MS
63	Lavandulyl acetate	1270	1273	1593											RI, MS
64	Menthyl acetate	1282	1285	1578			0.1	2.1							RI, MS, Ref
65	Iso-menthyl acetate	1294	1295	1594			0.1	1.8		tr	tr				RI, MS, Ref
66	Dihydro caryyl acetate	1311	1312	1661					0.4		2.2				RI, MS
67	Piperitenone	1315	1313	1900	0.2	0.2	0.6	1.8	0.1	tr	0.9				RI, MS
68	Piperitenone oxide	1333	1335	1945	34	36.1			0.3						RI, MS

Table 1 (continued)

		Mentha species ^c													
69	α -Terpenyl acetate	1336	1336	1678	1	1.2	tr	0.1	tr	1.7	0.1	0.1	0.1	RI, MS	
70	Neryl acetate	1342	1345	1725							2.7	2.7	2.7	RI, MS	
71	Geranyl acetate	1361	1364	1725							5.3	2.5	2.5	RI, MS	
72	E-jasmone	1363	1366	1889	0.9	0.3								RI, MS	
73	α -Copaene	1379	1379	1475	0.8	0.3	tr	0.1						RI, MS	
74	β -Bourbonene	1385	1385	1515	0.1	0.5	tr	tr	0.8	0.3		0.1	0.1	RI, MS	
75	E-β-caryophyllene	1424	1418	1583	7.5	0.5	0.4	0.4	0.2	0.6	0.3	0.2	0.1	RI, MS	
76	β -Copaene	1431	1430	1581	0.4	tr								RI, MS	
77	E- β -farnesene	1448	1447	1660	0.2	0.8	0.1	0.2				0.1	0.1	RI, MS	
78	α -Humulene	1456	1456	1665	0.8	0.4			0.1	0.2	0.4	0.3	0.2	RI, MS	
79	2-Phenyl ethyl isovalerate	1465	1465	1980	0.1	0.1								RI, MS	
80	γ -Muuroolene	1471	1469	1679	0.9	0.5	tr	0.2				0.1	0.1	RI, MS	
81	Germacrene D	1480	1474	1692	1.3	0.2	0.2	0.1	tr	0.1		tr	0.1	RI, MS	
82	4-epi-cubebol	1487	1486	1870	0.3	0.3								RI, MS	
83	α -Muuroolene	1496	1492	1709	0.6	tr	tr	0.1						RI, MS	
84	Epizonarene	1499	1496	1701			tr	tr						RI, MS, Ref	
85	γ -Cadinene	1507	1506	1750	0.7	0.6	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	tr	RI, MS	
86	trans-Calamenene	1512	1510	1810	0.8	0.5	0.1	0.1	0.2	0.1		0.1	0.2	RI, MS	
87	δ -Cadinene	1516	1515	1748	1.2	1	0.1	0.1	tr	0.1	tr	0.1	0.2	RI, MS	
88	Cadina-1,4-diene	1523	1520	1763										RI, MS	
89	α -Calacorene	1531	1528	1890			tr	0.1					0.1	RI, MS	
90	α -Cadinene	1535	1530	1740	0.5	0.3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	RI, MS	
91	β -Calacorene	1548	1546	1936			tr	tr						RI, MS	
92	Caryophyllene oxide	1578	1580	1980	1.2	0.4						0.8	0.3	RI, MS	
93	Globulol	1580	1582	2074								0.5	0.5	RI, MS	
94	1,10-di-epi-cubenol	1608	1605	2031	1.3	0.3								RI, MS	
95	Cadin-4-en-7-ol	1627	1626	2096	0.5	0.2								RI, MS	
96	Tau-cadinol	1632	1630	2169	0.5	0.5								RI, MS	
97	Tau-muurolol	1634	1630	2143	0.6	0.5								RI, MS	
98	α -Cadinol	1645	1642	2231	1.3	0.3								RI, MS	
	Total identification %				98.2	99.2	98.6	98.9	98.5	98.1	98.5	98.7	98.4	97.9	98.8
	Yields % (w/w)				0.78	0.91	0.96	0.90	0.56	0.50	0.70	0.73	0.75	0.72	0.67
	Hydrocarbon compounds				27.4	16.7	8.1	6.5	11.7	30.2	2.7	2.4	2.3	4.8	4.8
	Monoterpene hydrocarbons				11.6	11.1	7.1	4.9	10.3	28.7	2	1.7	1.9	3.7	2.8
	Sesquiterpene hydrocarbons				15.8	5.6	1	1.6	1.4	1.5	0.7	0.7	0.4	1.1	2

Table 1 (continued)

Oxygenated compounds	<i>Mentha</i> species ^e													
	70.8	82.5	90.5	92.4	86.8	67.9	95.8	96.3	96.1	93.1	94			
Oxygenated monoterpenes	55.3	73.3	87	91.3	86.8	67.9	94.2	95.3	95.6	91.1	92.5			
Oxygenated sesquiterpenes	5.7	2.5	0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.8			
Non-terpenic oxygenated compounds	9.8	6.7	3.5	1.1	0	0	1.6	1	0.5	0.7	0.7			

The writing in bold denotes the major components

RI retention indices, *MS* mass spectra in electronic impact mode, *Ref.* compounds identified from literature data: König et al. 2001 (30, 32, 61, 64, 65, and 84)

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1)

^b Retention indices of literature on the apolar column (*RI_A*) reported from König et al. (2001)

^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (*RI_A*)

^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (*RI_P*)

^e Algerian *Mentha* species, normalized % abundance: *M. rotundifolia* (MRO), *M. spicata* (MSP), *M. pulegium* (MPU), and *M. piperita* (MPI)

150 °C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35–350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 µL and fraction injected volume of 0.2 µL.

Component identification

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on non-polar and polar columns, determined to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds for our laboratory library from University of Corsica and literatures data (Jennings and Shibamoto 1980; König et al. 2001), and (ii) on computer matching with mass spectral of our laboratory library and commercial mass spectral libraries (McLafferty and Stauffer 1988).

Component quantification

The quantification of the essential oil components was performed using the methodology reported by Bicchi et al. (2008) and adapted in laboratory of UMR CNRS 6134 from University of Corsica (Djabou et al. 2013). Component quantification was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard and expressed as normalized % abundance.

Statistical analysis

Data analyses were performed using principal component analysis (PCA) (Brereton 2003). This method aims to reduce the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results (Massart 1998). Indeed, PCA provides the data in which both objects (oil samples) and variables (oil major components and/or antibacterial inhibition) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in which objects (sample locations) are gathered. PCA was carried out using function “PCA” from the statistical R software (factominR package). The variables (major components and/or antibacterial inhibition) have been selected using function from the statistical software (compounds > 1% were selected for the analysis).

Microbial strains and growth conditions

B. cinerea and *P. expansum* strains were obtained from Institut Pasteur, Paris, France (IP 1854.89, batch 185489; IP 1405.82, batch 050291 and IP 1350.82, batch 230992). *M. laxa* and *M. fructigena* strains were obtained from Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands (CBS 127258, batch 127258 and CBS 101499, batch 101499). They were grown

on Sabouraud Glucose Agar (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and incubated at 23 °C in darkness.

Fumigant antifungal activity

Essential oils were evaluated for fumigant antifungal activity based on their ability to inhibit mycelial growth. Six-millimeter-diameter mycelial plugs of each fungal strain from a 7-day-old culture were placed into a Petri dish. Essential oils were introduced onto a 6-mm cellulose disc, placed on the agar-free lid of the Petri dish. A negative control (cellulose disc without essential oil) was performed in the same way. Petri dishes were then sealed with parafilm and incubated at 23 °C in the dark.

Mycelial radial growth was measured after 3 to 7 days of incubation, and the antifungal index was calculated with the formula as follows:

$$\text{Antifungal index (\%)} = (1 - \text{Dex}/\text{Dc}) \times 100$$

where Dex is the diameter of growth zone in the experimental plate (mm) and Dc is the diameter of growth zone in the control plate (mm).

After a preliminary assay to determine antifungal index, Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined for more active essential oils. In each treatment, the MIC was determined, with two replicates for preliminary assays and three replicates for the determination of MIC.

Results and discussion

Composition of the essential oils

Preliminary analysis of 11 Algerian oil sample areas showed that the GC chromatograms of all samples from the same species were qualitatively similar but differed by abundances of their major components from the same species of *Mentha* studied, except for *M. rotundifolia* species where we found

Table 2 Normalized percentage abundances from class compounds and function of Algerian *Mentha* species essential oils

		<i>Mentha</i> species ^a										
Class compounds		<i>Rotundifolia</i>				<i>Spicata</i>		<i>Pulegium</i>			<i>Piperita</i>	
		MRO1	MRO2	MRO3	MRO4	MSP1	MSP2	MPU1	MPU2	MPU3	MPI1	MPI2
Hydrocarbon compounds	Σ	27	28	28	28	18	18	11	11	11	18	18
	%	27.4	16.7	8.1	6.5	13.7	29.2	2.7	2.4	2.3	4.8	4.8
MH	Σ	14	15	14	14	11	11	6	6	6	8	8
	%	11.6	11.1	7.1	4.9	12.3	27.7	2	1.7	1.9	3.7	2.8
SH	Σ	13	13	14	14	7	7	5	5	5	10	10
	%	15.8	5.6	1	1.6	1.4	1.5	0.7	0.7	0.4	1.1	2
Oxygenated compounds	Σ	33	36	34	31	14	14	17	17	17	20	20
	%	70.8	82.5	90.5	92.4	84.1	67.9	95.8	96.3	95.1	93.1	94
MO	Σ	15	18	25	22	13	13	14	14	14	15	16
	%	55.3	73.3	87	91.3	84.1	67.9	94.2	95.3	94.6	91.1	92.5
SO	Σ	7	7	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	%	5.7	2.5	0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.8
NTO	Σ	11	11	9	9	1	1	3	3	3	3	3
	%	9.8	6.7	3.5	1.1	tr	tr	1.6	1	0.5	0.7	0.7
Alcohols	Σ	20	20	18	18	6	6	7	7	7	7	7
	%	25	17.6	8.7	26.7	2.5	3.9	3.2	10.3	42.1	65.3	50.8
Aldehydes and cetones	Σ	5	5	8	6	5	5	5	5	5	3	3
	%	1.6	1.4	79.7	56.3	80.9	59.8	91.8	84	52.1	0.9	0.4
Esters	Σ	5	6	8	7	2	2	4	4	4	8	8
	%	8.5	6.4	1.7	9.2	0.4	3.9	0.2	1	0.5	20.7	38.7
Oxides	Σ	3	4	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	%	35.7	57.1	0.4	0.2	0.3	0.3	0.6	1	0.4	6.2	4.1

The bold corresponded to the important values

MH monoterpene hydrocarbons, SH sesquiterpene hydrocarbons, MO monoterpenes oxygenated, SO sesquiterpenes oxygenated, NTO non-terpenic oxygenated, % normalized % abundances, tr trace, Σ total number of specified components

^a Algerian *Mentha* species: *M. rotundifolia* (MRO), *M. spicata* (MSP), *M. pulegium* (MPU) and *M. piperita* (MPI)

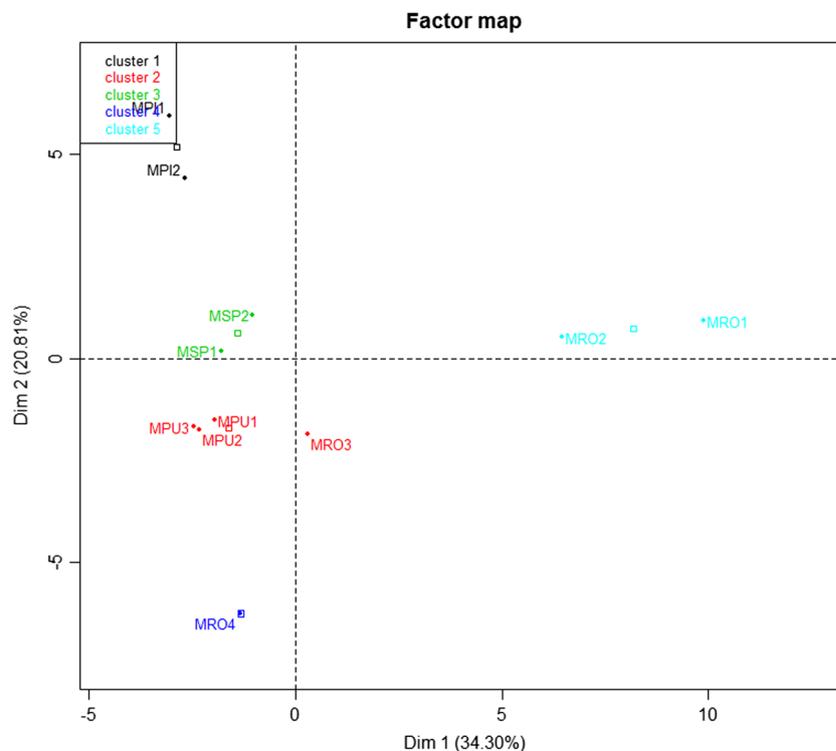
qualitative differences between major components in different areas of the same species (see Table 1). In the 11 oils from four *Mentha* species, 98 compounds were identified, (14 monoterpene hydrocarbons, 17 sesquiterpene hydrocarbons, 45 oxygenated monoterpenes, 8 oxygenated sesquiterpenes, and 14 non-terpenic oxygenated compounds). In Table 1, the compositions from all samples of each species are presented. In total, we identified 80 compounds in *M. rotundifolia* samples (60 compounds in **MRO1** simple representing 98.2% of the total number of compounds identified, 64 compounds in **MRO2** sample representing 99.2% of total, 62 compounds in **MRO3** simple representing 98.6% of total, and 59 compounds in **MRO4** simple representing 98.9% of total), among them **MRO1** (14 monoterpene hydrocarbons, 13 sesquiterpene hydrocarbons, 15 oxygenated monoterpenes, 7 oxygenated sesquiterpenes, and 11 non-terpenic oxygenated compounds), **MRO2** (15 monoterpene hydrocarbons, 13 sesquiterpene hydrocarbons, 18 oxygenated monoterpenes, 7 oxygenated sesquiterpenes, and 11 non-terpenic oxygenated compounds), **MRO3** (14 monoterpene hydrocarbons, 14 sesquiterpene hydrocarbons, 25 oxygenated monoterpenes, and 9 non-terpenic oxygenated compounds), and **MRO4** (14 monoterpene hydrocarbons, 14 sesquiterpene hydrocarbons, 22 oxygenated monoterpenes, and 9 non-terpenic oxygenated compounds) (see Table 2). Regarding *M. spicata*, we identified 32 compounds (in both **MSP1** and **MSP2** samples representing 98.5 and 98.1% of total respectively from **MSP1** and **MSP2**), among them 11 monoterpene hydrocarbons, 7 sesquiterpene

hydrocarbons, 13 oxygenated monoterpenes, and 1 non-terpenic oxygenated compound (see Table 2). About *M. pulegium*, we reported 28 compounds in different stations (**MPU1**, **MPU2**, and **MPU3** samples representing 98.5, 98.7, and 98.4% of total respectively from **MPU1**, **MPU2**, and **MPU3**), among them 6 monoterpene hydrocarbons, 5 sesquiterpene hydrocarbons, 14 oxygenated monoterpenes, and 3 non-terpenic oxygenated compounds (see Table 2). Finally, we reported 38 compounds in both *M. piperita* essential oil samples (**MPI1** and **MPI2** representing 97.9 and 98.8% of total respectively from **MPI1** and **MPI2**), among them 8 monoterpene hydrocarbons, 10 sesquiterpene hydrocarbons, 15 oxygenated monoterpenes, 2 oxygenated sesquiterpenes, and 3 non-terpenic oxygenated compounds) (see Table 2).

From all species analyzed, 92 components were verified by comparing their EI-MS and retention indices with those in our laboratory library (UMR CNRS 6134 from University of Corsica). Six components were identified by comparing their EI-MS and apolar retention indices with those of literature libraries under the same analytical conditions as ours (see Table 1),

In *M. rotundifolia* (**MRO**) essential oils, four different types of oils were shown to be different both qualitatively and quantitatively in their compositions. **MRO1** was characterized by the abundance of piperitenone oxide (34%), terpinene-4-ol (10.4%), E- β -caryophyllene (7.5%), and 1-oct-3-enyl acetate (6.5%). The oil was dominated by oxygenated compounds (70.8%), especially oxygenated

Fig. 2 Individual factor map (principal component analysis)



monoterpenes (55.3%). **MRO2** was characterized by the abundance of piperitenone oxide (36.1%), Z-piperitone oxide (11.7%), and E-piperitone oxide (10.6%). The oil was dominated by oxygenated compounds (82.5%), especially oxygenated monoterpenes (73.3%). **MRO3** was characterized by the abundance of pulegone (56.3%), menthone (16.8%), and iso-menthone (5.5%). The oil was dominated by oxygenated compounds (90.5%), especially oxygenated monoterpenes (87%). Finely **MRO4** was characterized by the abundance of menthone (28.5%), iso-menthone (19%), neo-menthol (10.4%), pulegone (5.6%), and neo-menthyl acetate (5%). The oil was dominated by oxygenated compounds (92.4%), especially oxygenated monoterpenes (91.3%) (see Table 1).

In *M. spicata* (**MSP**) essential oils, two oils were identified, with only qualitative differences in the abundance of their major components. **MSP1** and **MSP2** were characterized respectively by the abundance of carvone (79.3 and 54.1%), limonene (8.4 and 21.9%), and myrcene (0.7 and 3.3%). Both oils were dominated by oxygenated monoterpene (86.8 and 67.9%) and monoterpene hydrocarbons (10.3 and 28.7%) respectively from **MSP1** and **MSP2** (see Table 1).

In *M. pulegium* (**MPU**) essential oils, tree oils were characterized and differenced only quantitatively by the abundance of their major components. **MPU1**, **MPU2**, and **MPU3** were characterized respectively by the abundance of pulegone (77.3, 40.7, and 9.2%), neo-menthol (1.6, 9.1, and 42.3%), and menthone (10.8, 38.3, and 40.5%). All oils were dominated respectively by oxygenated monoterpene (94.2, 96.3, and 96.1%) (see Table 1).

In *M. piperita* (**MPI**) essential oils, both oils were qualitatively similar but differed by the abundance of their major components. **MPI1** and **MPI2** were respectively dominated by linalool (47.6 and 40.4%), linalyl acetate (12 and 32.6%), α -Terpineol (10.4 and 6.4%), 1,8-Cineole (5.4 and 3.8%), geranyl acetate (5.3 and 2.5%), and geraniol (5 and 2.4%). Both oils were dominated by oxygenated monoterpene (91.1 and 92.5%) respectively in **MPI1** and **MPI2** (see Table 1).

As presented in Table 2, chemical composition of essential oils of *Mentha* species were characterized by the high amount of oxygenated compounds (70.8 to 96.3%) in all samples, especially monoterpene-oxygenated compounds (55.3 to 95.3%), in accordance with literature. Only some samples of *M. rotundifolia* and *M. spicata* exhibited a significant level of hydrocarbon compounds. Finally, *M. spicata*, *M. piperita*, and *M. rotundifolia* (**MRO3** and **MRO4**) were characterized by high amounts of aldehydes and ketones (52.1 to 91.8%). *M. piperita* were characterized by the presence of alcohols (50.8 to 65.3%) and esters (20.7 to 38.7%), and finally, **MRO1** and **MRO2** from *M. rotundifolia* were dominated by oxides (35.7 to 57.1%) and alcohols (17.6 to 25%) (see Table 2).

To identify possible correlation between the chemical oil compositions of Algerian *Mentha* species, principal component

analysis (PCA) was applied to matrix linking essential oil components to species identities. PCA (Figs. 2 and 3) confirmed our interpretation that there are similarities between *M. pulegium* (**MPU1**, **MPU2**, and **MPU3**) and **MRO3** and **MRO4** from *M. rotundifolia* especially **MRO3**. Both simples (**MSP1** and **MSP2**) of *M. spicata* were also close to *M. pulegium*. The most important differences were found in *M. piperita* (**MPI1** and **MPI2**) and in the **MRO1** and **MRO2** from *M. rotundifolia*, which were quite different from the others.

Fumigant antifungal activity

The antifungal activity of essential oils of Algerian *Mentha* species was tested against for fungi. Results of fumigant antifungal activity are shown in Tables 3 (inhibition rate) and 4 (MIC against more sensitive fungal strains). *P. expansum* is less sensitive than are other strains and for this reason, MICs were only identified for *Monilinia sp.* and *B. cinerea* strains.

Essential oils of *M. rotundifolia* are less active than the essential oils from other species of *Mentha*, except for **MRO3**,

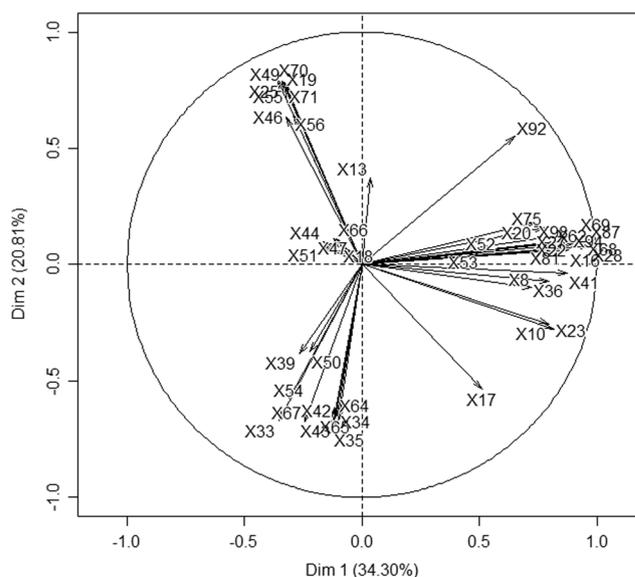


Fig. 3 Variable factor map (principal component analysis). X8 = α -Pinene; X10 = Oct-1-en-3-ol; X13 = myrcene; X16 = α -terpinene; X17 = p-cymene; X18 = limonene; X19 = 1,8-cineole; X20 = (Z)- α -ocimene; X22 = α -terpinene; X23 = trans-hydrate sabinene; X25 = linalool; X27 = cis-sabinene hydrate; X28 = 1-oct-3-enyl acetate; X33 = menthone; X34 = p-menth-3-en-8-ol; X35 = iso-menthone; X36 = borneol; X39 = neo-menthol; X41 = terpinene-4-ol; X42 = menthol; X43 = iso-menthol; X44 = Z-dihydro carvone; X46 = α -terpineol; X47 = E-dihydro carvone; X49 = Nerol; X50 = pulegone; X51 = carvone; X52 = Z-piperitone oxide; X53 = E-piperitone oxide; X54 = piperitone; X55 = geraniol; X56 = linalyl acetate; X62 = bornyl acetate; X64 = menthyl acetate; X65 = iso-menthyl acetate; X66 = dihydro carvyl acetate; X67 = piperitenone; X68 = piperitenone oxide; X69 = α -terpenyl acetate; X70 = neryl acetate; X71 = geranyl acetate; X75 = E- α -caryophyllen; X81 = germacrene D; X87 = α -cadinene; X92 = caryophyllene oxide; X94 = 1,10-di-epi-cubenol; X98 = cadinol

Table 3 Fumigant antifungal activity of *Mentha* essential oils from Algeria

Mentha species ^a	Volume (μl)	Concentration (× 10 ⁻³ μl/ml air)	Inhibition rate (mean ± SD)				
			<i>Botrytis cinerea</i> (3 days) ^b	<i>Penicillium expansum</i> (3 days)	<i>Monilinia fructigena</i> (3 days)	<i>Monilinia laxa</i> (7 days)	
<i>Mentha rotundifolia</i>	MRO1	5	71	40.7	0	89.7 ± 12.1	80.8
		10	142	58.3 ± 17.0	38.1 ± 1.1	100	100
	MRO2	5	71	14.8 ± 10.4	19.4 ± 15.5	52.5 ± 17.1	87.2
		10	142	52.7 ± 9.1	39.8 ± 1.1	100	100
	MRO3	5	71	100	0	100	100
		10	142	100	43.2 ± 3.5	100	100
	MRO4	5	71	51.8 ± 20.9	38.9 ± 9.5	92.3 ± 14.4	93.6
		10	142	66.6 ± 5.23	50.8 ± 2.3	100	100
<i>Mentha spicata</i>	MSP1	5	71	100	14.4 ± 10.7	100	96.8 ± 3
		10	142	100	55.9	100	100
	MSP2	5	71	100	20.3	100	100
		10	142	100	20.3 ± 2.3	100	100
<i>Mentha pulegium</i>	MPU1	5	71	100	9.3 ± 20.3	100	100
		10	142	100	61.0 ± 2.3	100	100
	MPU2	5	71	100	27.1 ± 16.7	100	100
		10	142	100	38.1 ± 3.5	100	100
	MPU3	5	71	100	46.6 ± 5.9	100	100
		10	142	100	71.1 ± 7.1	100	100
<i>Mentha piperita</i>	MPI1	5	71	100	29.6 ± 1.1	84.1 ± 17.7	74.4
		10	142	100	36.4 ± 8.3	100	100
	MPI2	5	71	66.6	5.9 ± 10.7	100	100
		10	142	25.9	4.2 ± 32.3	100	100

^a *M. rotundifolia* (MRO), *M. spicata* (MSP), *M. pulegium* (MPU), and *M. piperita* (MPI)

^b Duration of growth

which has an MIC of 36 × 10³ μl/ml air against *B. cinerea*. We observed an MIC between 36 and 142 × 10³ μl/ml air for *M. spicata*, *M. pulegium*, and *M. piperita*. These results can

be correlated with both their chemical compositions and statistical results. Oils dominated by alcohols (**MPI1** and **MPI2** and **MPU3**), aldehydes and ketones (**MRO3**, **MSP1**, **MSP2**,

Table 4 Minimal inhibitory concentration of *Mentha* essential oils from Algeria

Mentha species ^a	Minimal inhibitory concentration (× 10 ³ μl/ml air)			
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	<i>Monilinia laxa</i>	
<i>Mentha rotundifolia</i>	MRO1	> 142	142	142
	MRO2	> 142	142	142
	MRO3	36	142	142
	MRO4	> 142	142	142
<i>Mentha spicata</i>	MSP1	71	71	142
	MSP2	71	71	71
<i>Mentha pulegium</i>	MPU1	36	71	71
	MPU2	71	71	71
	MPU3	36	71	71
<i>Mentha piperita</i>	MPI1	36	142	142
	MPI2	36	71	71

^a *M. rotundifolia* (MRO), *M. spicata* (MSP), *M. pulegium* (MPU) and *M. piperita* (MPI)

MPU1, **MPU2**, and **MPU3**) exhibited an interesting inhibition against the fungi tested, in contrast to **MRO1** and **MRO2** which were rich in oxide compounds and were less active. On the basis of these results, we suggest that the most interesting activity of *Mentha* essential oils was due to alcohol, aldehyde, and ketone compounds, like linalool in *M. piperita*; carvone in *M. spicata*; and pulegone, menthone, and neo-menthol in both *M. pulegium* and *M. rotundifolia*. Those results were in accordance with the results published recently and demonstrated strong activities of molecules like iso-menthose, pulegone, carvone, piperitone, piperitone oxide, and piperitenone oxide present in essential oils of *M. spicata* and *M. pulegium*, as good activities against insect pests (*Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis*, and *Myzus persicae*), root-knot nematodes (*Meloydogine javanica*), and plants (*Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Solanum lycopersicum*) (Santana-Méridas et al. 2017). In addition, we suggest that these molecules can significantly inhibit the growth of fungi, especially *Molilinia sp.* and *B. cinerea*, and to a lesser degree *P. expansum*.

Conclusions

The aerial parts of the Algerian *Mentha* species produce one type of essential oil dominated by oxygenated compounds; however, the oils can be classed in three different groups. The most important group is characterized by ketone compounds like carvone, menthone, and pulegone and the second by alcohol compounds like linalool and neo-menthol. Finally, the third group was characterized by oxide compounds like piperitenone oxide and piperitone oxide.

The *Mentha* essential oil activity was very interesting and almost all the oils tested demonstrated a strong inhibition against the fungi studied except for *P. expansum* where the activity was moderate. Thus, the *Mentha* essential oils could be considered as a good bio-control agent to protect fruit trees, such as apple and pear trees, which are known targets for fungi like *Molilinia sp.* and *B. cinerea*, and as an alternative to chemical pesticides, to treat trees infected with these fungi.

Acknowledgements The authors are indebted to Fayçal HASSANI and Tawfik FEROUANI from University of Tlemcen, Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, to botanical identification of all *Mentha* species.

The complement spectroscopic experiments have been performed using the “Biodiversité et Biotechnologies Marines” (Bio2Mar) facilities at the University of Perpignan.

The authors gratefully thank Jeanine ALMANY for providing the English language editing (as well as constructing comments) which improved the manuscript.

References

- Al Yousef S (2013) Antifungal activity of volatiles from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2:261–272
- Al-Bayati FA (2009) Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8:20
- Bicchi C, Libertò E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, Zellner BA, Costa R, Rubiolo P (2008) Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Frag J* 23:382–391
- Brereton RG (2003) Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant, first edn. Wiley Interscience, New-York
- Celenk S, Tarimcilar G, Bicakci A, Kaynak G, Malyer H (2008) A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). *Bot J Linn Soc* 157:141–154
- Council of Europe (1997) European Pharmacopoeia, First edn. Council of Europe, Strasbourg
- Djabou N, Andreani S, Varesi L, Tomi F, Costa J, Muselli A (2013) Analysis of volatile fraction of *Teucrium marum* L. *Flavour Frag J* 28:14–24
- Fenwick AL, Ward SM (2001) Use of random amplified polymorphic DNA markers for cultivar identification in mint. *Hort Sci* 36:761–764
- Gobert V, Moja S, Colson M, Taberlet P (2002) Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *Am J Bot* 89:2017–2023
- Jennings W, Shibamoto T (1980) In: Jovanovich HB (ed) Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, Academic Press, New York
- Kerchoehuen O, Laohakunjit N, Singkornard S, Matta FB (2010) Essential oils from six herbal plants for bicontrol of the maize weevil. *Hortscience* 45(4):592–598
- Khanuja SPS, Shasany AK, Srivastava A, Kumar S (2000) Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica* 111:121–125
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D (2001) Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder 2.1. Ed. Institute of Organic Chemistry, Hamburg
- Krasnyanski S, Ball TM, Sink KC (1998) Somatic hybridization in mint: identification and characterization of *Mentha piperita* M. spicata hybrid plants. *Theor Appl Genet* 96:683–687
- Mahboubi M, Haghi G (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* 119: 325–327
- Massart DL (1998) Chemometrics: a textbook. Elsevier Science Ltd, New-York
- McLafferty FW, Stauffer DB (1988) The Wiley/NBS registry of mass spectra data. Wiley-Interscience, Ed, New-York
- Mohammadi A, Hashemi M, Masoud Hosseini S (2015) Comparison of antifungal activities of various essential oils on the *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of fruits decay. *Iran J Microbiol* 7(1): 31–37
- Odeyemi OO, Masika P, Afolayan AJ (2008) Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. capensis against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *Afr Entomol* 16:220–225
- Park IK, Lee SG, Choi DH, Park JD, Ahn YJ (2003) Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod Res* 39:375–384
- Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle Flore de l'Algérie. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris
- Rösch P, Kiefer W, Popp J (2002) Chemotaxonomy of mints of genus *Mentha* by applying Raman spectroscopy. *Biopolymers* 67(6):358–361

- Santana-Méridas O, Fe Andrés M, Sanz J, Errahmani N, Abdeslam L, González-Coloma A (2014) Valorization of essential oils from Moroccan aromatic plants. *Nat Prod Commun* 9(8):1109–1114
- Santana-Méridas O, González-Coloma A, Fe Andrés M, Vidali VP, Polissiou MG, Kimbaris AC (2017) Biocidal compounds from *Mentha* sp essential oils and their structure-activity relationships. *Chem Biodivers*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600270>
- Shasany AK, Darokar MP, Dhawan S, Gupta AK, Gupta S, Shukla AK, Patra NK, Khanuja SPS (2005) Use RAPD and AFLP markers to identify inter- and intraspecific hybrids of *Mentha*. *J Hered* 96(5): 542–549
- Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, Van Griensven LJ (2009) Chemical composition of essential oils of thymus and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14:238–249

[A3] : *Thymus ciliatus* (trois espèces)

F. Z. Benomari, M. Moumani, F. Hassani, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Chemical Variability of Essential Oils of Three Subspecies of *Thymus ciliatus* Desf. from Western Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*. **2017. Article soumis, en révision.**





Chemical Variability of Essential Oils of Three Subspecies of *Thymus ciliatus* Desf. from Western Algeria

Journal:	<i>Flavour and Fragrance Journal</i>
Manuscript ID	FFJ-17-0149
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Nov-2017
Complete List of Authors:	BENOMARI, Fatima Zahra; Universite Abou Bekr Belkaid Tlemcen Departement de Chimie; Universite de Corse Pascal Paoli MOUMANI, Mohamed; Parc National de Tlemcen; Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Faculté SNV, Agronomie HASSANI, Fayçal; Universite Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Faculté des Sciences, Département de Botanique Muselli, Alain; UNIVERSITE DE CORSE, EQUIPE CHIMIE DES PRODUITS NATURELS - UMR CNRS 6134 Jean, Costa; Universite de Corse Pascal Paoli Djabou, Nassim; Universite Abou Bekr Belkaid Tlemcen Departement de Chimie,
Keywords:	<i>T. ciliatus</i> subsp. <i>munbyanus</i> , <i>T. ciliatus</i> subsp. <i>eu-ciliatus</i> , <i>T. ciliatus</i> subsp. <i>coloratus</i> , essential oils, chemical variability, chemotaxonomic characters

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Chemical Variability of Essential Oils of Three Subspecies of *Thymus ciliatus* Desf. from**
4
5 **Western Algeria**
6
7

8
9 **Fatima Zahra Benomari^{1,2}, Mohamed Moumani³, Fayçal Hassani⁴, Alain Muselli², Jean**
10
11 **Costa², Nassim Djabou^{1,*}**
12
13

14
15
16 ¹ Université de Tlemcen, Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA), BP
17
18 119, Tlemcen 13000, Algérie.

19
20 ² Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels (CPN), Campus Grimaldi,
21
22 BP 52, 20250 Corte, France.

23 ³ Parc National de Tlemcen (PNT), Lala Setti, BP 181/K, Tlemcen 13000, Algérie.

24
25 ⁴ Université de Tlemcen, Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, BP 119, Tlemcen 13000,
26
27 Algérie

28
29 ***Corresponding author-email address: nassim.djabou@mail.univ-tlemcen.dz**
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Chemical composition of the essential oils of three subspecies of Algerian *Thymus ciliatus*, (*T. ciliatus* subsp. *munbyanus*, *T. ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* and *T. ciliatus* subsp. *coloratus*) aerial parts have been investigated using Gas Chromatography/Retention Indices (GC/RI) and GC-Mass Spectrometry (GC/MS). GC and GC/MS analysis allowed the identification of 68 compounds accounting for 99.3%, 99.7% and 98.2% of collective essential oils of subsp. *munbyanus*, subsp. *eu-ciliatus* and subsp. *coloratus* respectively. The main components of three collective oils were: α -terpenyl acetate (51.7%), α -terpineol (9.7%), borneol (6.8%), bornyl acetate (5.2%) and limonene (4.1%) for subsp. *munbyanus*; carvacrol (65.7%), γ -terpinene (13.6%) and p-cymene (7.9%) for subsp. *eu-ciliatus* and camphor (25.9%), myrcene (16.9%), 1,8-cineole (6.5%), camphene (6.2%), δ -cadinene (5.7%) and limonene (5.6%) for subsp. *coloratus*. Intra-species variations of chemical compositions of essential oil from thirty five Algerian samples of various locations were also investigated using statistical analysis. The sample oils were discriminated in three main clusters confirming that there is a relation between the chemical compositions of essential oil and taxonomical differentiation between the three subspecies. These results confirm chemotaxonomic differentiation of all subspecies of *T. ciliatus* based on chemical variability of essential oils of each of them.

Keywords: *T. ciliatus* subsp. *munbyanus*, *T. ciliatus* subsp. *eu-ciliatus*, *T. ciliatus* subsp. *coloratus*, essential oils, chemical variability, chemotaxonomic characters.

Introduction

Thymus (Tourn.) L. genus belongs to the *Lamiaceae* family and consists of about 220 species of perennial, aromatic herbs and subshrubs native to Europe and North Africa [1]. This genus is very complex from the taxonomical and systematic points of view, demonstrating significant polymorphism both at inter and intra-specific level not only in morphological characteristics but also in composition of essential oils [2].

Various types of thyme are used all over the globe as condiments, ornamentals and sources of essential oil. Thyme oil (distilled from its leaves) is among the world's top ten essential oils, displaying antibacterial, antimycotic, antioxidative, food preservative and mammalian age-delaying properties. Because of the wide variety of its applications, the demand for thyme oil is growing; hence thyme commands an important place in an expanding world market [3].

In Algeria the genus *Thymus* is represented by twelve species and three subspecies [4]. Nine species are endemic and only one (*T. ciliatus*) is reported with three subspecies [4].

Thymus ciliatus Desf. an endemic plant of North Africa was reported in literature with three subspecies: subsp. *eu-ciliatus* Maire, common throughout Algeria; subsp. *coloratus* (Boiss. et Reut.) Batt. common in Tell of Algeria, and subsp. *munbyanus* (Bois. et Reut.) Batt. quite rare and localized only in Western Algeria (the Oranais and the Hauts-Plateaux) [4].

Recently Ramon Morales [1] in the book of *Thyme: The genus Thymus* edited by Elisabeth Stahl-Biskup and Francisco Sáez [3], has established a recent classification of thyme in the world, in which it was considered that the subspecies of *Thymus ciliatus* could be considered as species in their own right and thus gave the names *Thymus ciliatus*, *Thymus munbyanus* and *Thymus coloratus*, indicating that these three species could easily hybridize to each other.

In the same book, Elisabeth Stahl-Biskup [5] indicated that the botanical differentiation between the three species would be very difficult to make and that the chemical composition could help to make this classification, hence the notion of chemotaxonomy [5].

1
2
3 *T. ciliatus* is a small shrub, 10 to 30 cm tall, with tetragonal, ramified and prostrated stems. It
4 has different floral leaves of the stem leaves, generally strongly dilated at their lower part,
5 with large flowering spikes of 16-20 mm. The flowers are larger at corolla longer exerted.
6
7 The only difference between the three sub-species is flowering. The flowers of the subsp. *eu-*
8 *ciliatus* are very large, red or purple 10 mm long, with linear leaves ciliated on margins and
9 floral largely oval, present in lawns and brush regions. The subsp. *coloratus* shows flowers
10 not exceeding 7-8 mm, usually paler, with floral leaves more or less stained with purple at
11 least at the base. Both subspecies *eu-ciliatus* and *coloratus* were present in lawns and brush
12 regions. Finally, the subsp. *munbyanus* presents green floral leaves [4].

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23 Very recently, Bendif et al [6], reported chemical composition of essential oil of *Thymus*
24 *munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria. This author indicated that *T. munbyanus* includes
25 three subspecies, namely subsp. *abylaeus* (Font Quer & Maire), subsp. *ciliatus* (Desf.)
26 Greuter & Burdet, and subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet in according to
27 Plant List Database from 2013 [7]. The same Database reported that *T. ciliatus* (Desf.) Benth.,
28 is a synonym of *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* (Desf.) Greuter & Burdet [= *T. ciliatus* subsp.
29 *eu-ciliatus* Maire]; *T. coloratus* Boiss. & Reut. is a synonym of *T. munbyanus* subsp.
30 *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet [= *T. ciliatus* subsp. *coloratus* (Boiss. et Reut.)
31 Batt.]; and *T. munbyanus* Boiss. & Reut. is a synonym of *T. munbyanus* subsp. *munbyanus* [=
32 *T. munbyanus* subsp. *abylaeus* (Font Quer & Maire), = *T. ciliatus* subsp. *munbyanus* (Bois. et
33 Reut.) Batt.] [4] [7].

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Many works deal with the chemical composition of the aerial part essential oils of *Thymus*
genus. To our knowledge eighteen works deals with chemical composition of essential oil of
T. ciliatus, species, subspecies and synonyms [6] [8-24]. **Table 1** report name, origin, and
major components of all essential oil reported in literature. Only one ancient work (1967)
reported three different composition without specify any information about subspecies or

1
2
3 variability [17]. To the best of our knowledge no work deal with comparison between
4
5 chemical composition of essential oils of three subspecies of *Thymus ciliatus*, or their
6
7 synonyms, from North-Africa including Algeria.
8

9
10 In the course of our characterization of Mediterranean aromatic plants [25-34], we reported
11
12 from the first time chemical composition of three subspecies of *Thymus ciliatus*: subsp. *eu-*
13
14 *ciliatus*, subsp. *coloratus* and subsp. *munbyanus* essential oils using combination of capillary
15
16 GC(RI) and GC/MS. The chemical variability of the essential oils of 35 specimens of all
17
18 subspecies harvested in western Algeria was examined using statistical analysis. A
19
20 comparison between chemical composition of three subspecies and also between our results
21
22 and literature data of all *T. ciliatus*, *T. munbyanus* and *T. coloratus* species and subspecies
23
24 were discussed.
25
26
27
28
29

30 **Experimental**

31 *Plant Material and Essential Oil Isolation*

32
33 The aerial parts of subspecies of *T. ciliatus* Desf. from western Algeria were collected at the
34
35 flowering stage (March to July 2015) from 35 locations (S1 – S35) widespread in the different
36
37 geographical distribution from Tlemcen Department. Voucher specimens were deposited both
38
39 in the herbarium of the University of Tlemcen and National Park of Tlemcen. The
40
41 geographical origin of the different samples and the voucher number of each specimen
42
43 analyzed are listed in **Fig. 1**. Essential oils were obtained from fresh aerial parts by
44
45 hydrodistillation for 3 h using a *Clevenger*-type apparatus according to the *European*
46
47 *Pharmacopoeia* [35], yielding (w/w) yellow essential oils: 0.84 – 1.38% from subsp.
48
49 *munbyanus*, 0.49 – 0.96% from subsp. *eu-ciliatus* and 0.29 – 0.58% from subsp. *coloratus*.
50
51
52
53
54
55

56 *Oil Fractionation*

1
2
3 The three collective oils called HEColl1, HEColl2 and HEColl3 were obtained by pooling
4 each individual oils from same subspecies (S1 – S8) for subsp. *munbyanus*; (S9 – S23) for
5 subsp. *eu-ciliatus* and (S24 – S35) for subsp. *coloratus*. All collective oils (1 g for each oil)
6 were consecutively submitted to flash chromatography on a normal phase silica column (FC,
7 silica gel 200–500 μm). The apolar fractions (hydrocarbon compounds: 0.14g; 0.33g and
8 0.57g respectively for subsp. *munbyanus*, subsp. *eu-ciliatus* and subsp. *coloratus*) were eluded
9 with pentane ($\text{n-C}_5\text{H}_{12}$) and polar fractions (oxygenated compounds: 0.79g; 0.61g and 0.36g
10 respectively for subsp. *munbyanus*, subsp. *eu-ciliatus* and subsp. *coloratus*) were eluded with
11 diethyl ether (Et_2O). All fractions were analyzed by GC and GC/MS.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 25 *GC Analysis*

26
27 The GC analyses were carried out using a *Perkin Elmer Clarus 600* apparatus (*Walton*, MA,
28 USA) equipped with a single injector and two flame-ionization detectors (FIDs) for
29 simultaneous sampling to two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm i.d., film
30 thickness 0.25 μm ; *Restek*, Bellefonte, PA, USA) with stationary phases of different polarity,
31 *i.e.* a nonpolar *Rtx-1* (polydimethylsiloxane) and a polar *Rtx-Wax* (polyethylene glycol). The
32 oven temperature was programmed rising from 60 to 230° at 2°/min and then held isothermal
33 at 230° for 30 min; injector temp., 280°; detector temp., 280°; carrier gas, H_2 (0.7 ml/min);
34 split ratio, 1:80; injected volume, 0.1 μl . The retention indices (*RIs*) of the compounds were
35 determined rel. to the retention times (t_R) of a series of n-alkanes (C_5 – C_{30} ; commercial soln.
36 obtained from *Restek*, Bellefonte, PA, USA) using the *Van den Dool* and *Kratz* equation.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 52 *GC/MS Analysis*

53
54 The essential oils and the fractions obtained by CC were investigated using a *Perkin Elmer*
55 *TurboMass* quadrupole detector directly coupled to a *Perkin Elmer AutoSystem XL* (*Walton*)
56
57
58
59
60

1
2
3 equipped with the two same fused-silica cap. columns as described above. Both columns were
4
5 used with the same MS detector. The analyses were consecutively carried out on the nonpolar
6
7 and on the polar column. Hence, for each sample, two reconstructed ionic chromatograms
8
9 (*RIC*) were provided, which were investigated consecutively. The GC conditions were the
10
11 same as described above, and the MS parameters were as follows: ion-source temp., 150°;
12
13 ionization energy; 70 eV; EI-MS spectra acquired over a mass range of 35 – 350 uma during a
14
15 scan time of 1 s. The injection volumes for the oil and the fractions were 0.1 and 0.2 µl, resp.
16
17
18
19

20 21 *Component Identification*

22
23 Identification of the components was based *i*) on the comparison of their GC retention indices
24
25 (*RI*) on nonpolar and polar columns, determined to the retention time of a series of *n*-alkanes
26
27 with linear interpolation, with those of authentic compounds or literatures data [36] [37]; *ii*)
28
29 on computer matching with commercial mass spectral libraries [38] and comparison of
30
31 spectra with those of our laboratory-made library.
32
33
34
35
36

37 38 *Component Quantification*

39
40 The quantification of the essential oil components was performed using methodology reported
41
42 by *Bicchi et al.* [39], and adapted in our laboratory [40]. Briefly, component quantification
43
44 was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) relative to
45
46 tridecane (0.7 g/100g) used as internal standard and expressed as normalized % abundance.
47
48
49
50

51 52 *Statistical Analysis*

53
54 Chemical data analyses were performed using Principal Component Analysis (PCA) and
55
56 Cluster Analysis (CA). Both methods aim at reducing the multivariate space in which oil
57
58 samples are distributed but both methods are complementary in their ability to present results
59
60

1
2
3 [41] [42]. Indeed, PCA provides the data for diagrams in which both objects (oil samples) and
4 variables (oil components) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in
5 which objects (sample locations) are gathered. PCA was carried out using function 'PCA'
6 from the statistical R software. The variables (volatile components) have been selected using
7 function from the statistical software. The Cluster Analysis produced a dendrogram (tree)
8 using the Ward's method of hierarchical clustering, based on the Euclidean distance between
9 pairs of oil samples.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Results and Discussion**

23 *Harvest Locations*

24
25 Aerial parts of three subspecies of *T. ciliatus* Desf. were collected from 35 locations (S1 –
26 S35) widespread in Tlemcen Department from western Algeria. **Fig. 1** report geographical
27 distribution of *T. ciliatus* Desf. subspecies samples from western Algeria.
28
29
30
31
32
33

34 *Composition of T. ciliatus Essential Oils*

35 Preliminary analysis of 35 Algerian essential oil samples (8 samples for subsp. *munbyanus*, 15
36 samples for subsp. *eu-ciliatus* and 12 samples for subsp. *coloratus*) showed significant
37 qualitative and quantitative difference in GC chromatograms between subspecies samples.
38
39 Only quantitative and no qualitative different were found in samples of same subspecies.
40
41 Therefore, in order to carry out a detailed analysis, we pooled all similar essential oil samples
42 to produce three Collective oils samples. They were then fractioned using column
43 chromatography (CC) and reanalyzed using GC and GC/MS. The quantification of all three
44 collective oils expressed in normalized % abundances and the maximum and minimum
45 abundances are listed in **Table 2**. We checked that the compounds identified in the CC
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

fractions were in the individual oil samples (*Supplementary Material Table*), by comparing their retention indices (RI_a, RI_p) and their electronic impact-mass spectra (EI-MS).

GC and GC/MS analysis of *T. ciliatus* subsp. *munbyanus* collective oil (HEColl1) allowed the identification of 51 compounds accounting for 99.3%. HEColl1 was dominated by oxygenated compounds (82.3%), exclusively constituted by monoterpenes (81%). The main components were α -terpenyl acetate (51.7%), α -terpineol (9.7%), borneol (6.8%), bornyl acetate (5.2%) and limonene (4.1%). GC and GC/MS analysis of *T. ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* collective oil (HEColl2) allowed the identification of 29 compounds accounting for 99.7%. HEColl2 was dominated by monoterpenes oxygenated compounds (68.4%) and monoterpenes hydrocarbons (28.9%). The main components were carvacrol (65.7%), γ -terpinene (13.6%) and p-cymene (7.9%). GC and GC/MS analysis of *T. ciliatus* subsp. *coloratus* collective oil (HEColl3) allowed the identification of 41 compounds accounting for 98.2%. HEColl3 was constituted by 55.1% of hydrocarbon compounds (37.9% of monoterpenes and 17.2% of sesquiterpenes) and 43.1% of oxygenated compounds, especially monoterpenes (40.3%). The main components were camphor (25.9%), myrcene (16.9%), 1,8-cineole (6.5%), camphene (6.2%), δ -cadinene (5.7%) and limonene (5.6%) (See **Table 2**). All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library. In total we identified in species of *T. ciliatus* from Algeria 68 compounds: 40 hydrocarbon compounds (20 monoterpenes, 18 sesquiterpenes and 2 diterpenes) and 28 oxygenated compounds (21 monoterpenes, 3 sesquiterpenes and 4 non-terpenic compounds).

Comparison between subspecies

Each of the three subspecies had a different chromatographic profile than the other subspecies. **Table 3** present the difference between subspecies. Subsp. *munbyanus* was more dominated by oxygenated compounds (21 compounds accounting for 82.3%) like other (8

1
2
3 compounds for 68.4% and 14 compounds for 43.1% respectively for subsp. *eu-ciliatus* and
4
5 subsp. *coloratus*). All three subspecies were rich in oxygenated monoterpenes compounds,
6
7 more in subsp. *munbyanus* (15 compounds for 81%) and subsp. *eu-ciliatus* (8 compounds for
8
9 68.4%) than the subsp. *coloratus* (10 compounds for 40.3%). Only subsp. *coloratus* was rich
10
11 in hydrocarbon compounds (27 compounds for 55.1%) than subsp. *eu-ciliatus* (21 compounds
12
13 for 31.3%) and subsp. *munbyanus* (30 compounds for 17%). Only subsp. *coloratus* present an
14
15 interesting % of hydrocarbon sesquiterpenes compounds (14 compounds for 17.2%) than the
16
17 others (13 compounds for 2.8% and 4 compounds for 2.1% respectively for subsp. *munbyanus*
18
19 and subsp. *eu-ciliatus*). Finally the three subspecies oils were characterized by different class
20
21 function of compounds. Subsp. *munbyanus* was dominated by esters components (4
22
23 compounds for 57.6%), subsp. *eu-ciliatus* was dominated by alcohols components (6
24
25 compounds for 68.1%) and subsp. *coloratus* was characterized by the presence of aldehydes
26
27 and ketones components (3 compounds for 26.2%). These results clearly demonstrate that the
28
29 chemical composition of the essential oils of the three subspecies is very different from each
30
31 other.
32
33
34
35

36 Finally, all three subspecies oils exhibit different aroma and fragrance probably due to their
37
38 difference of major compounds. *T. ciliatus* subsp. *munbyanus* present sweet herbaceous
39
40 fragrance with floral fresh lavender nuances, somewhat minty odor with woody flavors. *T.*
41
42 *ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* present phenolic herbaceous odor with a spicy undertone. *T. ciliatus*
43
44 subsp. *coloratus* present fresh, diffusive camphoraceous-cool odor with warm-minty
45
46 fragrance. In the other hand, essential oils yields (w/w) in subsp. *munbyanus* (0.84 – 1.38%),
47
48 were more important than subsp. *eu-ciliatus* (0.49 – 0.96%) than subsp. *coloratus* (0.29 –
49
50 0.58%) (See Table Supplementary Material).
51
52
53
54
55

56 *Comparison with literature Data*
57
58
59
60

Table 1 regroups all Data reported in literature. Eighteen works reported chemical composition of essential oils of *T. ciliatus* specie and subspecies [6] [8-24]. Teen works reported chemical composition of *T. ciliatus* from Algeria and Morocco with different composition mostly dominated by thymol [8-14], carvacrol [15] and viridiflorol [16], and three works reported chemical composition of *T. munbyanus* from Algeria dominated by thymol [23] [24] and carvacrol [22]. All this thirteen works not specify subspecies classification. Only five works indicated subspecies, all from Algeria. Two about *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* dominated by carvacrol [20] [21], one about *T. ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* dominated by carvacrol [18], one about *T. ciliatus* subsp. *coloratus* dominated by thymol, and finely one about *T. munbyanus* subsp. *coloratus* dominated by borneol [6] (See **Table 1**). Only one work, reported in 1967, and cited three different chemical compositions of *T. ciliatus* from Morocco, without specify any information about subspecies [17]. This work indicated the difficulty to differentiate subspecies of *T. ciliatus*, and reported three oils dominated by thymol, camphor and α -terpinyl acetate.

In comparison between literature and our result, we found the same result of essential oil *T. ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* reported in literature [18], dominated by carvacrol (more than 70%) and γ -terpinene and p-cymene. This is also the same result reported from *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* [20] [21]. This is in according with literature Data who indicated that *T. ciliatus* subsp. *ciliatus* is synonym of *T. munbyanus* subsp. *ciliatus* [4] [7].

The only reference cited camphor and α -terpinyl acetate as major compounds from *T. ciliatus* was reported in Morocco in 1967, without specify subspecies [17]. This is the two same major compounds funded in our analysis for respectively subsp. *coloratus* and subsp. *munbyanus*.

There are also reference reported chemical composition of essential oil of *T. munbyanus* subsp. *coloratus*, who reported borneol, camphor, camphene and 1,8-cineole as major components [6]. This result is quite similar to our result about *T. ciliatus* subsp. *coloratus*

1
2
3 with difference in abundance of borneol. The other Data of literature reported thymol as major
4 compound in most reference and never find in our result, except small presence in our subsp.
5 *eu-ciliatus*. To our knowledge, this is the first report of camphor and α -terpinyl acetate as
6 major compounds from *T. ciliatus* subspecies. These two compounds have been find as major
7 compounds in *Thymus* genus, as well as reported in review edited by Stahl-Biskup [43].
8 Camphor was previously reported as major compound in *T. ciliatus* (Desf.) Benth., *T.*
9 *pallidus*, *T. granatensis* Bois. and *T. vulgaris* L. [43]. α -terpinyl acetate was previously
10 reported as major compound in *T. ciliatus* (Desf.) Benth., *T. praecox* Opiz subsp. *arcticus*, *T.*
11 *pulegioides* L. *T. zygis* L. and *T. godayanus* [43]
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 *Chemical Variability of essential oils of T. ciliatus subspecies*

26
27 Normalized percentage abundances of all identified components were used for statistical
28 analysis (*Table Supplementary Material*). Relationship between the chemical composition of
29 oils and subspecies differentiation were studied, using principal component analysis (PCA)
30 and cluster analysis (CA) applied to a matrix linking essential oil compositions and the
31 samples localities (**Fig. 2** and **3**). As shown in **Fig. 2**, PCA constructed using axes 1 and 2
32 accounted for 98.54% of the variance. First dimension (Dim1) was positively correlated with
33 major components of all simple oils of subsp. *coloratus* and all sample oils of subsp.
34 *munbyanus*, and negatively correlated with major components of all simple oils of subsp. *eu-*
35 *ciliatus*. The plot suggests that there are three main groups (**Fig. 2**) in accordance with general
36 structure of the dendrogram obtained from the CA (**Fig. 3**): Group I included 8 stations (S1 –
37 S8), group II included 12 stations (S24 – S35) and group III included 15 stations (S9 – S23).
38 Sample oils of group I were characterized by high amount of camphor, myrcene, 1,8-cineole,
39 camphene, limonene and δ -cadinene. Sample oils of group II were characterized by major
40 components α -terpenyl acetate, borneol, α -terpineol and bornyl acetate. Finely sample oils of
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 group III were dominated by high amount of carvacrol, p-cymene and γ -terpinene (See *Table*
4 *supplementary Material*). The statistical distribution of the oil samples demonstrated
5 correlation between the chemical composition of individual oil samples and different
6 subspecies. Group I regrouped all specimens of subsp. *munbyanus*, group II regrouped all
7 samples of subsp. *coloratus* and group III regrouped all samples of subsp. *eu-ciliatus*.
8
9

10 Samples of group I (subsp. *munbyanus*) were collected only in one region from mountains of
11 Tlemcen (see **Fig. 1**) and never find in other geographical distribution in which we sampled.
12 No importance variations were found in chemical composition within this subspecies, with
13 always the presence of α -terpenyl acetate as major component (more than 50% in all
14 samples). The literature indicated that this subspecies was quite rare and localized only in
15 western Algeria [4]. About samples of group II (subsp. *coloratus*) and group III (subsp. *eu-*
16 *ciliatus*), we collected samples in different geographical distribution from western Algeria
17 especially from Mediterranean area and mountains of Tlemcen (see **Fig. 1**). All these regions
18 were characterized by different nature of the soils and climates, however, no significant
19 variations on essential oils composition in the same subspecies were detected. Subsp.
20 *coloratus* oils were always characterized by camphor and myrcene as major components, and
21 subsp. *eu-ciliatus* oils were always dominated by carvacrol (more than 60%) as major
22 compound.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Conclusion**

46
47 The present study investigated, for the first time, the chemical composition and variability of
48 all subspecies of *T. ciliatus* essential oils from western Algeria. Visual differentiation between
49 the three subspecies is very difficult to achieve. On the other hand, it is very easy to
50 differentiate qualitatively and quantitatively between the chemical compositions of the
51 essential oils of the three subspecies. It is in this perspective that the taxonomic differentiation
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 between the three subspecies of *T. ciliatus* can be correlated with chemical composition of
4 essential oils and done using chemotaxonomic approach by studying the chemical variability
5 of the various essential oils of species. Probably *T. ciliatus* subsp. *munbyanus* is rare and
6 much localized, and according to our observations, the subspecies is threatened with
7 disruption. This work was carried out in collaboration with the National Park of Tlemcen
8 (NPT), which has just described it as a threatened species and, following this work, the NPT
9 is about to launch a program to preserve it and multiply it in their nursery.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Supplementary Material**

24 Table supplementary material.
25
26
27
28

29 **Acknowledgements**

30 The authors are indebted to the National Park of Tlemcen (NPT) for sampling authorizations
31 and field trips to sample plants, and to Fayçal HASSANI and Tawfik FEROUANI from
32 Université de Tlemcen, Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels,
33 Département d'Ecologie & Environnement, to botanical identification of different subspecies
34 of *T. ciliatus*.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **References**

46 **References**

47
48 [1] Morales R. *The history, botany and taxonomy of the genus Thymus*. In *Thyme: the Genus*
49 *Thymus; Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles 17*; Stahl-Biskup E, Saez F.
50 London, U.K: Taylor and Francis; 2002.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [2] Snezana J, Miroslava M, and Pavle P. Review of Ethnobotanical, Phytochemical and
4 Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. *Evidence-Based Complementary and*
5 *Alternative Medecine*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/101978>.
6
7
8
9
10 [3] Stahl-Biskup E. *Essential oil chemistry of the genus Thymus a global view*. In *Thyme: the*
11 *Genus Thymus; Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles 17*; Stahl-Biskup E, Saez
12 F. London, U.K: Taylor and Francis; 2002.
13
14
15
16 [4] Quezel P, Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris:
17 C.N.R.S; 1962.
18
19
20 [5] Stahl-Biskup E, Sáez F. *Thyme: the Genus Thymus; Medicinal and Aromatic Plants -*
21 *Industrial Profiles 17*; Eds.; Taylor and Francis: London, U.K., 2002.
22
23
24 [6] Bendif H, Boudjeniba M, Miara MD, Biqiku L, Bramucci M, Lupidi G, Quassinti L, Vitali
25 LA, Maggi F. Essential Oil of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria:
26 Chemotypification and in vitro Biological Activities. *ChemBiodivers*. 2017; 14:3.
27
28
29 [7] The Plant List Version 1.1. Published on the Internet; 2013. <http://www.theplantlist.org/>
30
31
32 [8] Ksouri S, Djebir S, Bentorki AA, Gouri A, Hadeif Y, and Benakhla A. Antifungal activity
33 of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and
34 *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J. Med.*
35 *Mycol*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.004>.
36
37
38 [9] Kabouche A, Ghorab H, Semra Z, Sajjadi E, Touzani R, and Kabouche Z. Biological
39 activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. *Sch. Res.*
40 *Libr*. 2013;5:28–32.
41
42
43 [10] El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Amarti F, Rahouti M, Aafi A, Ismaili MR, Farah A.
44 Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis*
45 Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du
46 bois. *Acta Bot. Gallica*. 2010;157:285–294.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [11] Amari F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A.
4
5 Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus*
6
7 *algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron.*
8
9 *Soc. Environ.* 2010;14:141-148.
10
11 [12] Amrouni S, Touati M, Hadeif Y, and Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum*
12
13 *vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase.
14
15 *Phytothérapie.* 2014;12:309–313.
16
17 [13] Kabouche A, Ghannadi A, and Kabouche Z. *Thymus ciliatus* - The Highest Thymol
18
19 Containing Essential Oil of the Genus. *Nat. Prod. Commun.* 2009;4:1251–1252.
20
21 [14] Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential
22
23 oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia.* 2008;79:199-203.
24
25 [15] Jamali CA, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, Leach D,
26
27 Abbad A. Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential
28
29 Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chem. Biodivers.* 2012;9:1188–1197.
30
31 [16] Ghorab H, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative composition of essential oils of
32
33 *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.*
34
35 2014;5:298-303.
36
37 [17] Benjilali B, Hammouni M, Richard H. Polymorphisme Chimique des Huiles Essentielles
38
39 de Thym du Maroc. *Sci Aliment.* 1967;7:77-91.
40
41 [18] Marroki LB, Bekkara FA, Tomi F, Casanova J. Chemical Composition and Antibacterial
42
43 Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth.ssp. *eu-ciliatus* Maire from
44
45 Algeria. *J Essent Oil Res.* 2007;19:490–493.
46
47 [19] Nina S, Seridi R, Tarek H. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential
48
49 Oils of *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* from Annaba-Algeria. *J Pharm Sci Rev Res.*
50
51 2016;40:180-185.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [20] Tefiani C, Riazi A, Youcefi F, Aazza S, Gago C, Faleido ML, Pedro LG, Barroso JG,
4 Figueiredo AC, Megias C, Giraldo IC, Vioque J, Miguel MG. *Ammoides pusilla* (Apiaceae)
5 and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition,
6 antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J Essent Oil Res.* 2015;27:131–139.
7
8
9
10
11 [21] Abdelmounaïm K, Bendahou M, Benbelaid F, Bellahcene C, Abdelouahid DE, Muselli
12 A, Paolini J, Desjobert JM, Costa J. Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils
13 Obtained from four Algerian Medicinal Plants. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3:18-24.
14
15
16
17 [22] Benchabane O, Hazzit M, Baaliouamer A, and Mouhouche F. Analysis and Antioxidant
18 Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis* Coss. Et Dur. And *Thymus munbyanus*
19 Desf. *J Essent Oil Bear Plants.* 2012;15:774–781.
20
21
22
23 [23] Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. Composition of the Essential Oils of
24 *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial
25 Activities. *J Agric Food Chem.* 2006;54:6314–6321.
26
27
28
29 [24] Chikhoun A, Stouvenel L, Ouada MI, Hazzit M, Schmitt A, Lores P, Wolf JP, Aissat K,
30 Auger J, Vaiman D, Touré A. In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol
31 on human sperm motility and function. *Reprod Biomed Online.* 2015;31:411–420.
32
33
34 [25] Dib MA, Djabou N, Desjobert JM, Allali H, Tabti B, Muselli A, Costa J.
35 Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace solid phase
36 microextraction as alternative technique to hydrodistillation. *Chem Cent J.* 2010;4:16.
37
38
39 [26] Djabou N, Paolini J, Desjobert JM, Allali H, Baldoini N, Costa J, Muselli A. Qualitative
40 and quantitative analysis of volatile components of *Teucrium massiliense* L. identification of 6-
41 methyl-3-heptyl acetate as a new natural product. *Flavour Fragr J.* 2010;25:475-487.
42
43
44 [27] Djabou N, Battesti MJ, Allali H, Desjobert JM, Varesi L, Costa J, Muselli A. Chemical
45 and genetic differentiation of Corsican subspecies of *Teucrium flavum* L. *Phytochemistry.*
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 [28] Djabou N, Muselli A, Allali H, Dib MA, Tabti B, Varesi L, Costa J. Chemical and
4 genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*.
5 2012;83:51-62.
6
7

8
9 [29] Djabou N, Allali H, Battesti MJ, Tabti B, Costa J, Muselli A, Varesi L. Chemical and
10 genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium scorodonia* L.
11 *Phytochemistry*. 2012;74:123-132.
12
13

14 [30] Bendiabdellah A, Dib MA, Djabou N, Hassani F, Paolini J, Tabti B, Costa J, Muselli A.
15 *Daucus carota* ssp. *Hispanicus* Gouan. Essential oils: chemical variability and fungitoxic
16 activity. *J Essent Oil Res*. 2014;26:427-440.
17
18

19 [31] Younes K, Merghache S, Djabou N, Selles C, Muselli A, Tabti B, Costa J. Chemical
20 composition and free radical scavenging activity of essential oils and extracts of Algerian
21 *Cardaria draba* L. Desv. *J Essent Oil Bear Plants*. 2015;18:1448-1458
22
23

24 [32] Benomari FZ, Djabou N, Medbouhi A, Khadir A, Bendahou M, Selles C, Desjobert JM.
25 Costa J, Muselli A. Chemical variability and biological activities of essential oils of
26 *Micromeria inodora* (Desf.) Benth. from Algeria, *Chem Biodiversity*. 2016;13:1559-1572.
27
28

29 [33] Belabbes R, Dib MA, Djabou N, Ilias F, Tabti B, Costa J, Muselli A. Chemical
30 variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of
31 *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem Biodiversity*. 2017;14:
32 DOI: 10.1002/cbdv.201600482.
33
34

35 [34] Benyelles B, Allali H, Dib MA, Djabou N, Paolini J, Costa J. Chemical composition
36 variability of essential oils of *Daucus gracilis* Steinh. From Algeria. *Chem Biodiversity*,
37 2017;14: DOI: 10.1002/cbdv.201600490.
38
39

40 [35] Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. Strasbourg: *Council of Europe*; 1997.
41
42

43 [36] König WA, Hochmuth DH, Joulain D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential*
44 *Oils*. *Institute of Organic Chemistry*. Hamburg: Library of Mass Finder 2.1. 2001.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [37] Jennings W, Shibamoto T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by*
4 *Glass Capillary Gas Chromatography*. New-York: Academic Press. Ed. H.B. Jovanovich;
5
6 1980.
7
8
9 [38] McLafferty FW, Stauffer DB. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data*, New-York:
10 Wiley-Interscience; 1988.
11
12 [39] Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, Zellner BA, Costa R, Rubiolo
13 P. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Frag J*. 2008;23:382-391.
14
15 [40] Djabou N, Andreani S, Varesi L, Tomi F, Costa J, Muselli A. Analysis of the volatile
16 fraction of *Teucrium marum* L. *Flavour Frag J*. 2013;28:14-24.
17
18 [41] Brereton RG. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*.
19 New-York: Wiley Interscience; 2003.
20
21 [42] Massart DL. *Chemometrics: A Textbook*. New-York: Elsevier Science Ltd; 1998.
22
23 [43] Stahl-Biskup E. The chemical composition of Thymus Oils: A review of the Literature
24 1960-1989. *J Ess Oil Res*. 1991;2:61-82.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Data of previous chemical investigations of essential oils of species and subspecies of *Thymus ciliatus*

Species and subspecies	Origins	Ref. ^a	Year ^b	N ^c	Main Components (%)
<i>Thymus ciliatus</i> (Desf.)	Algeria	[8]	2017	1	thymol (62.41%), p-cymene (15.51%), carvacrol (6.12%)
	Algeria	[9]	2013	1	thymol (54.98%), γ -terpinene (11.33%), p-cymene (6.66%) and carvacrol (4.96%)
	Morocco	[10]	2010	1	thymol (44.2%), E- β -ocymene (25.8%), α -terpinene (12.3%)
	Morocco	[11]	2010	1	thymol (44.2%), E- β -ocymene (25.8%), α -terpinene (12.3%)
	Algeria	[12]	2014	1	thymol (57.66%), carvacrol (16.19%), o-ocimene (12.04%), γ -terpinene (6.42%)
	Algeria	[13]	2009	1	thymol (79.1%), p-cymene (5.6%), carvacrol (4.4%)
	Algeria	[14]	2008	1	thymol (60.52%), γ -terpinene (9.45%), p-cymene (8.10%)
	Morocco	[15]	2012	1	carvacrol (26.2%), p-cymene (19.6%), thymol (17.3%), γ -terpinene (14.6%)
	Morocco	[16]	2014	1	viridiflorol (16.12%), α -pinene (8.75%), camphor (7.50%), nerolidol (6.95%)
	Morocco	[17]	1967	1	thymol
	Morocco	[17]	1967	1	camphor
	Morocco	[17]	1967	1	α -terpinyl acetate
<i>T. ciliatus</i> subsp. <i>eu-ciliatus</i>	Algeria	[18]	2007	8	carvacrol (72.4–80.3%), γ -terpinene (1.6 - 7.8%), p-cymene (4.2 - 7.2%)
<i>T. ciliatus</i> subsp. <i>coloratus</i>	Algeria	[19]	2016	3	thymol (21.02-33.39%), carvacrol (24.16-30.85%), γ -terpinene (5.58-10.97%)
<i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	Algeria	[20]	2015	1	carvacrol (71.4%), p-cymene (8.3%), γ -terpinene (5.9%)
<i>T. munbyanus</i> subsp. <i>ciliatus</i>	Algeria	[21]	2013	1	carvacrol (80.1%), p-cymene (7.1%), γ -terpinene (4.2%)
<i>T. munbyanus</i> subsp. <i>coloratus</i>	Algeria	[6]	2017	2	borneol (31.2-44.8%), camphor (5.7-13.6%), camphene (3.6-7.5%), 1,8-cineole (4.2-6.0%)
<i>T. munbyanus</i>	Algeria	[22]	2012	1	carvacrol (35.2%), thymol (18,5%), γ -terpinene (7.0%)
<i>T. munbyanus</i>	Algeria	[23]	2006	1	thymol (37.7%), p-cymene (14.2%), γ -terpinene (10.1%), myrcene (7.1%)
<i>T. munbyanus</i>	Algeria	[24]	2015	1	thymol (52.0%), γ -terpinene (11.0%), p-cymene (8.5%), carvacrol (5.2%)

^a References in manuscript; ^b year of publication; ^c number of sample

Table 2. Chemical composition of essential oils of *T. ciliatus* subspecies from Algeria

No	Compound name and class ^a	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>Thymus ciliatus</i> ^e									Identification ^f
					subsp. <i>munbyanus</i>			subsp. <i>eu-ciliatus</i>			subsp. <i>coloratus</i>			
					HEColl1	Min	Max	HEColl2	Min	Max	HEColl3	Min	Max	
1	tricyclene	921	923	1020	0.5	0.1	0.8							RI, MS
2	α -thujene	922	925	1023	0.3	tr	0.7	0.6	0.1	0.9	0.8	0.5	0.9	RI, MS
3	α -pinene	931	933	1022	1.6	1.5	2	0.6	0.3	0.8	3.1	2.1	3.2	RI, MS
4	camphene	943	946	1066	3.2	2.9	3.5	0.1	tr	0.2	6.2	5.3	7.3	RI, MS
5	thuja-2,4(10)diene	946	947	1120	0.1	tr	0.2							RI, MS
6	oct-1-en-3-ol	959	956	1446	0.1	tr	0.1				0.3	0.1	0.4	RI, MS
7	sabinene	964	962	1120	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.6	0.1	tr	0.2	RI, MS
8	β -pinene	970	967	1110	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.3	1.7	1.4	2.2	RI, MS
9	1,8-dihydro-cineole	979	977	1190	1	0.8	1.3							RI, MS
10	myrcene	976	980	1159	1.3	1.2	2	2.4	1.4	3.6	16.9	14.4	18.2	RI, MS
11	α -phellandrene	997	998	1164				0.3	0.1	0.4				RI, MS
12	3-carene	1005	1006	1147				0.1	tr	0.1				RI, MS
13	α -terpinene	1008	1010	1178	0.1	0.1	0.2	2.1	1.1	2.6	0.3	tr	0.6	RI, MS
14	p-cymene	1011	1013	1268	0.1	tr	0.1	7.9	5.6	9.8	0.3	0.2	0.5	RI, MS
15	limonene	1020	1021	1206	4.1	3.4	5.1				5.6	4.4	6.1	RI, MS
16	1,8-cineole	1020	1021	1215	2.9	2.2	3.2				6.5	5.7	7.2	RI, MS
17	β -phellandrene	1021	1021	1208				0.5	0.3	0.6				RI, MS
18	Z- β -ocimene	1024	1026	1230	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.2	RI, MS
19	E- β -ocimene	1034	1037	1247	1.5	1.4	1.8	0.1	tr	0.1	1.9	1.4	2.4	RI, MS
20	γ-terpinene	1047	1049	1243	0.4	0.2	0.5	13.6	9.6	14.2	0.5	0.4	0.6	RI, MS
21	p-cymenene	1075	1072	1430	0.1	tr	0.1							RI, MS
22	terpinolene	1078	1078	1280	0.5	0.3	0.7	0.2	tr	0.3	0.4	0.3	0.6	RI, MS
23	linalool	1081	1082	1544				0.8	0.3	0.9	2.1	1.6	2.7	RI, MS
24	nonanal	1081	1082	1390							0.5	0.4	0.5	RI, MS
25	cis-hydrate sabinene	1083	1082	1541	0.3	0.2	0.3							RI, MS
26	1-octen-3-yl acetate	1095	1092	1376	0.7	0.5	0.8							RI, MS
27	p-mentha-1,3,8-triene	1101	1103	1433	0.1	0.1	0.2							RI, MS
28	perillene	1098	1095	1713							0.3	0.2	0.3	RI, MS
29	camphor	1123	1120	1517	1.4	1.1	1.7				25.9	23.5	28.8	RI, MS
30	trans-pinocarveol	1125	1122	1650	0.4	0.1	0.7				0.6	0.4	0.8	RI, MS

66	α -bisabolol	1672	1669	2217	0.1	tr	0.1				0.8	0.6	1.2	RI, MS
67	abietatriene	2042	2039	2493				0.2	tr	0.2				RI, MS
68	abieta-7,13-diene	2080	2077	2457				0.1	tr	0.3				RI, MS
Total Identification %					99.3			99.7			98.2			
Hydrocarbon compounds					17			31.3			55.1			
Monoterpene hydrocarbons					14.2			28.9			37.9			
Sesquiterpene hydrocarbons					2.8			2.1			17.2			
Diterpene hydrocarbons					0			0.3			0			
Oxygenated compounds					82.3			68.4			43.1			
Oxygenated monoterpenes					81			68.4			40.3			
Oxygenated sesquiterpenes					0.5			0			2			
Non-terpenic oxygenated compounds					0.8			0			0.8			

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). Bold types refer to main compounds. ^b Retention indices of literature on the apolar column (RIa) reported from [36]. ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^e Collective oils (HEColl1 to 3): Mixture of all Algerian *T. ciliatus* essential oils from each subspecies. Quantification was carried out using RFs relative to tridecane as internal standard. %: Normalized Percentages are given on the apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). Sample oils: Minimal and maximal normalized percentages (%) from all sample oils of each subspecies are given on the apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). The chemical compositions of all individual samples were tabulated in Supplementary Material. ^f RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library.

Table 3. Normalized percentage abundances from class compounds and function of Algerian *T. ciliatus* subspecies essential oils

Class compounds ^a		<i>Thymus ciliatus</i> subsp. ^b		
		<i>munbyanus</i>	<i>eu-ciliatus</i>	<i>coloratus</i>
		HEColl1	HEColl2	HEColl3
Hydrocarbon Compounds	Σ^c	30	21	27
	% ^d	17	31.3	55.1
MH	Σ^c	17	15	13
	% ^d	14.2	28.9	37.9
SH	Σ^c	13	4	14
	% ^d	2.8	2.1	17.2
DTH	Σ^c	0	2	0
	% ^d	0	0.3	0
Oxygenated Compounds	Σ^c	21	8	14
	% ^d	82.3	68.4	43.1
MO	Σ^c	15	8	10
	%	81	68.4	40.3
SO	Σ^c	3	0	2
	% ^d	0.5	0	2
NTO	Σ^c	3	0	2
	% ^d	0.8	0	0.8
Alcohols	Σ^c	10	6	7
	% ^d	18.8	68.1	8.3
Aldehydes and Ketones	Σ^c	4	0	3
	% ^d	1.7	0	26.6
Esters	Σ^c	4	2	1
	% ^d	57.6	0.3	0.2
Oxides	Σ^c	3	0	3
	% ^d	4.2	0	8

^a Monoterpene hydrocarbons (MH), Sesquiterpene hydrocarbons (SH), Monoterpenes oxygenated (MO), Sesquiterpenes oxygenated (SO), Non-terpenic oxygenated (NTO).

1
2
3
4
5 ^b Algerian *T. ciliatus* subspecies: *munbyanus*, *eu-ciliatus* and
6 *coloratus*.
7 ^c Σ Total number of specified components
8 ^d % Normalized % abundances, tr (Trace)

For Peer Review

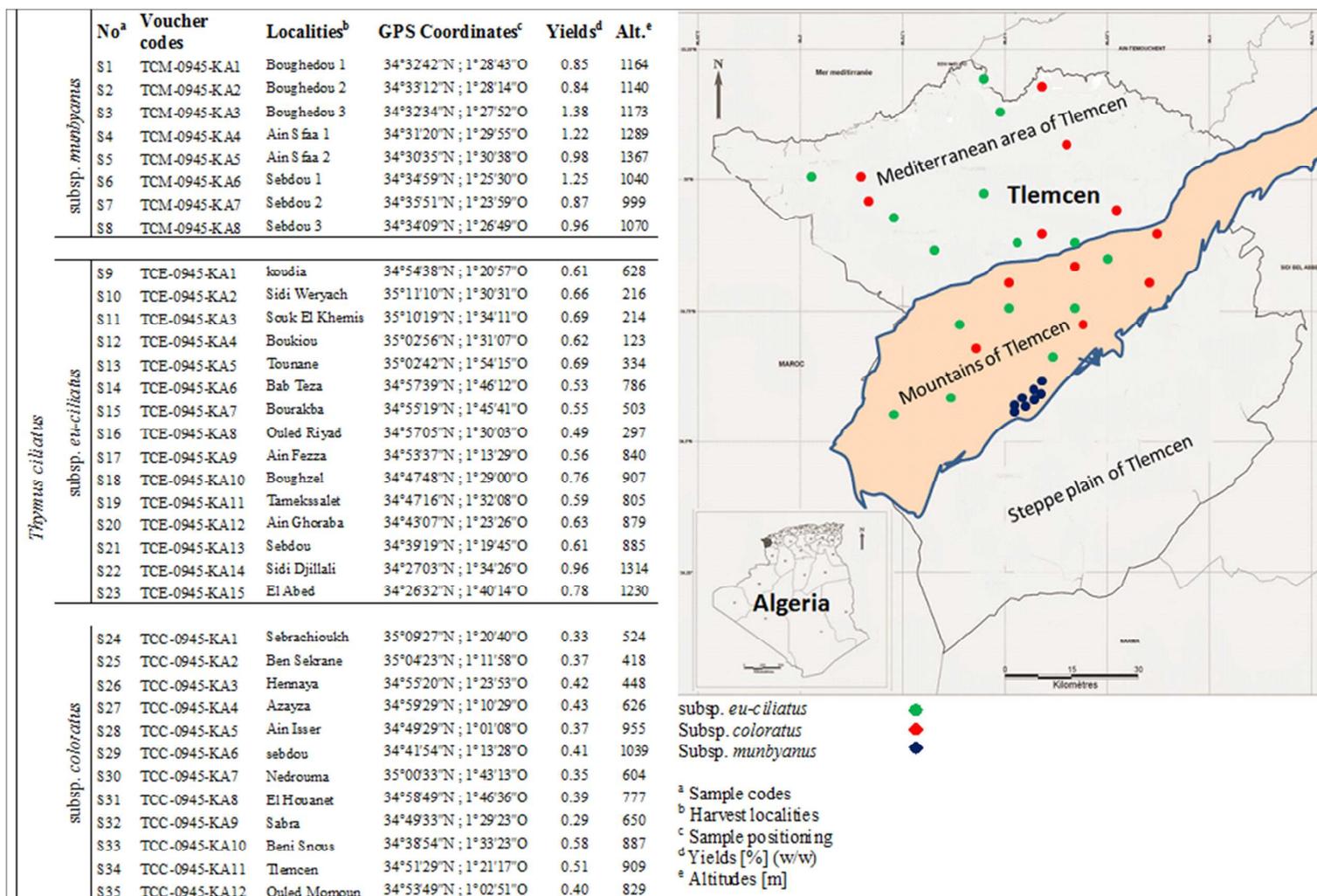
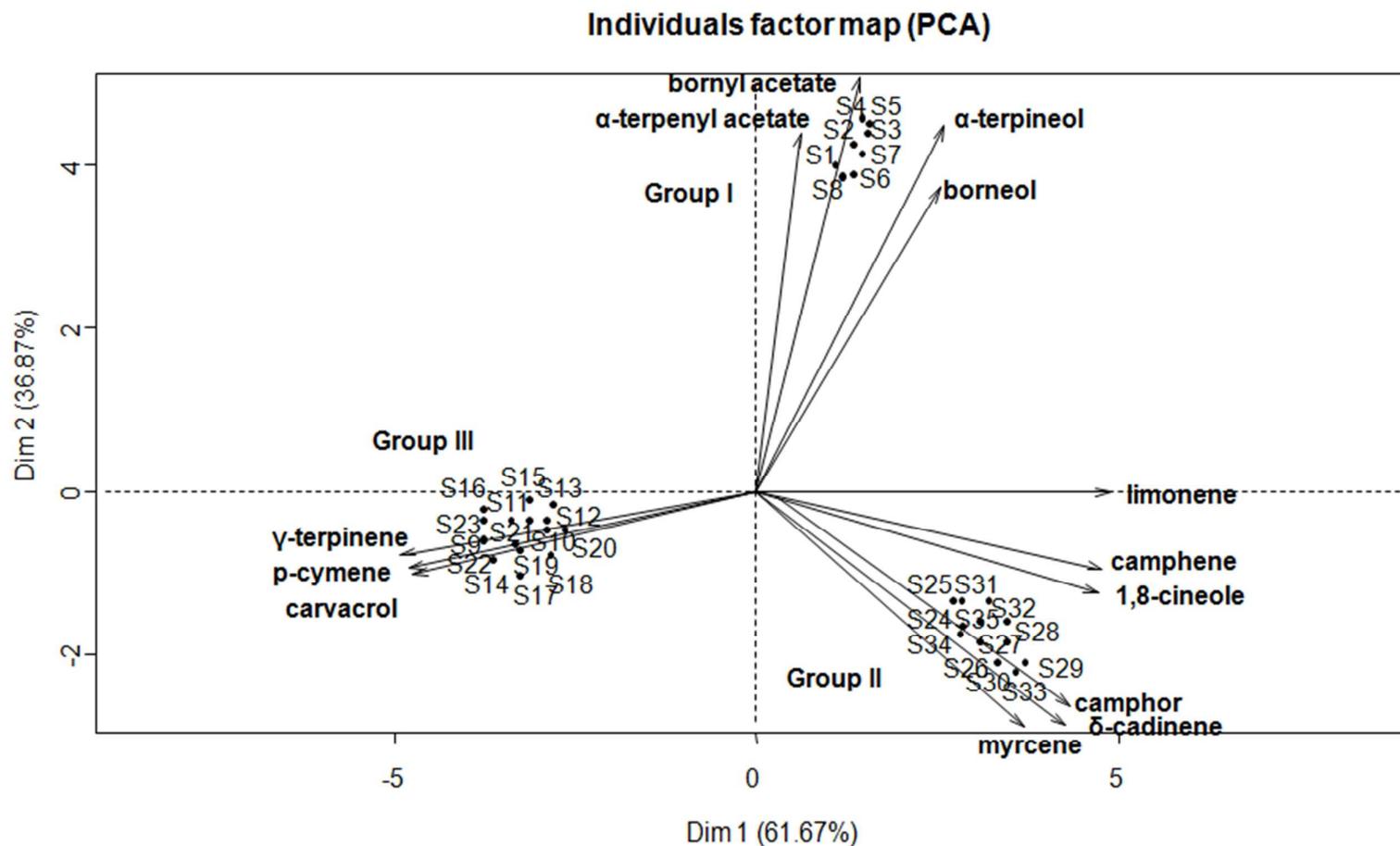


Figure 1. Geographical distribution of *T. ciliatus* subspecies samples (S1 – S35) from western Algeria.



38 Figure 2. PCA of chemical compositions of subspecies of *T. ciliatus* essential oils. Distribution of variables (major of compounds corresponding
39 to those of Table (Supplementary Material) and distribution of samples (coding numbers of locations)

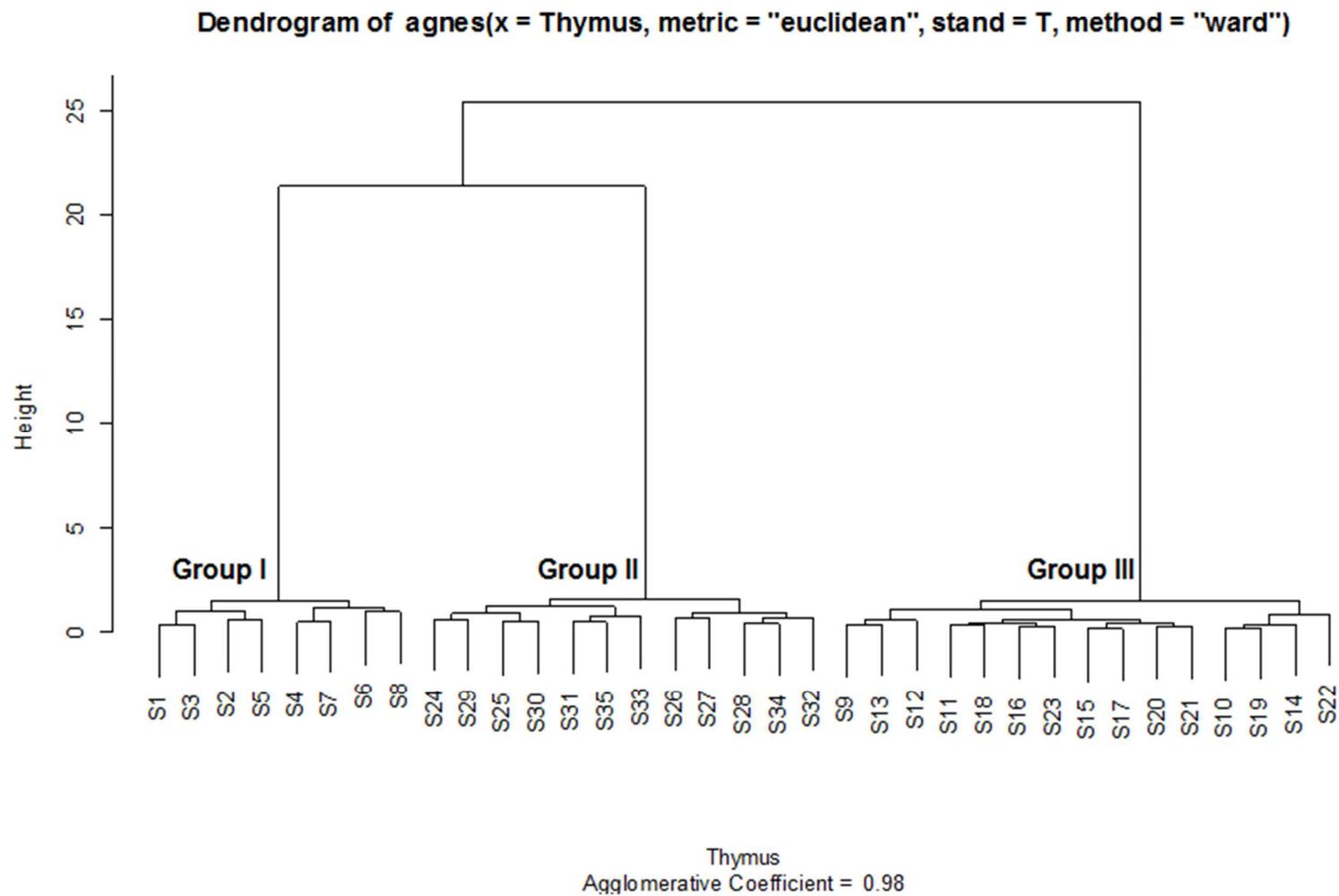
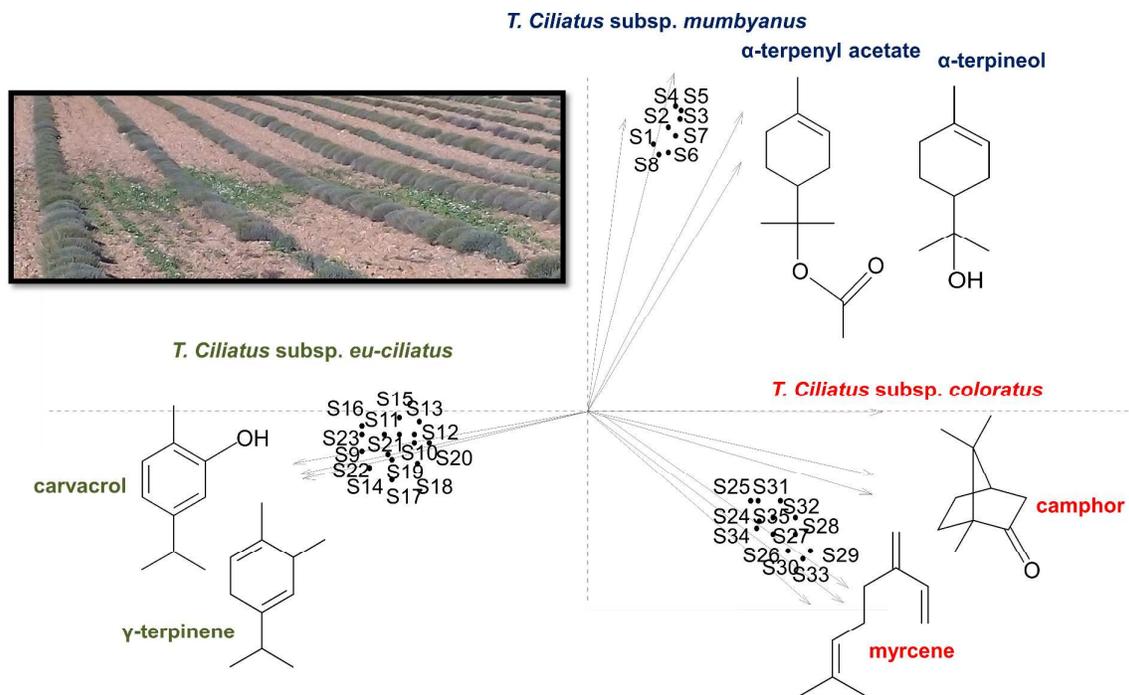


Figure 3. CA of chemical compositions of *T. ciliatus* subspecies essential oils from western Algeria

Table Supplementary Material

No	Compound name and class ^a	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>Thymus ciliatus</i> subs p. <i>munbyanus</i>								<i>Thymus</i>					
					S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
1	tricyclene	921	923	1020	0.1	0.8	0.8	0.4	0.5	0.3	0.7	0.8						
2	α -thujene	922	925	1023	0.7	tr	tr	0.3	0.5	0.2	0.1	0.5	0.1	0.7	0.7	0.4	0.4	0.3
3	α -pinene	931	933	1022	1.6	1.7	1.8	2	1.9	1.8	1.7	1.5	0.5	0.6	0.6	0.3	0.5	0.6
4	camphene	943	946	1066	2.9	3.1	3.3	3.1	3	2.9	3.5	3.5	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1
5	thuja-2,4(10)diene	946	947	1120	0.2	tr	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.1						
6	oct-1-en-3-ol	959	956	1446	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.1						
7	sabinene	964	962	1120	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2
8	β -pinene	970	967	1110	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1
9	1,8-dihydro-cineole	979	977	1190	1	1	tr	0.8	1.1	1.3	0.8	1.2						
10	myrcene	976	980	1159	1.2	2	tr	1.3	1.2	1.5	1.8	1.3	1.4	2.4	2	2.1	1.8	1.6
11	α -phellandrene	997	998	1164									0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1
12	3-carene	1005	1006	1147									0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
13	α -terpinene	1008	1010	1178	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	1.9	2.3	1.8	2.6	2.5	2.1
14	p-cymene	1011	1013	1268	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	5.6	9.3	7	5.7	6.7	8.9
15	limonene	1020	1021	1206	3.4	4	3.6	3.7	3.9	5.1	4.5	4.2						
16	1,8-cineole	1020	1021	1215	3	2.2	3.1	2.6	2.9	3.2	2.7	2.6						
17	β -phellandrene	1021	1021	1208									0.4	0.6	0.5	0.3	0.5	0.4
18	Z- β -ocimene	1024	1026	1230	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	tr
19	E- β -ocimene	1034	1037	1247	1.5	1.8	1.5	1.4	1.6	1.6	1.5	1.6	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1
20	γ -terpinene	1047	1049	1243	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.2	0.4	13.4	12.8	9.6	10.9	13.3	14.2



Peer Review

Table Supplementary Material

No	Compound name and class ^a	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>Thymus ciliatus</i> subsp. <i>munbya</i>					
					S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	tricyclene	921	923	1020	0.1	0.8	0.8	0.4	0.5	0.3
2	α -thujene	922	925	1023	0.7	tr	tr	0.3	0.5	0.2
3	α -pinene	931	933	1022	1.6	1.7	1.8	2	1.9	1.8
4	camphene	943	946	1066	2.9	3.1	3.3	3.1	3	2.9
5	thuja-2,4(10)diene	946	947	1120	0.2	tr	0.1	0.2	0.1	0.1
6	oct-1-en-3-ol	959	956	1446	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1
7	sabinene	964	962	1120	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1
8	β -pinene	970	967	1110	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr
9	1,8-dihydro-cineole	979	977	1190	1	1	tr	0.8	1.1	1.3
10	myrcene	976	980	1159	1.2	2	tr	1.3	1.2	1.5
11	α -phellandrene	997	998	1164						
12	3-carene	1005	1006	1147						
13	α -terpinene	1008	1010	1178	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
14	p-cymene	1011	1013	1268	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1
15	limonene	1020	1021	1206	3.4	4	3.6	3.7	3.9	5.1
16	1,8-cineole	1020	1021	1215	3	2.2	3.1	2.6	2.9	3.2
17	β -phellandrene	1021	1021	1208						
18	Z- β -ocimene	1024	1026	1230	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
19	E- β -ocimene	1034	1037	1247	1.5	1.8	1.5	1.4	1.6	1.6
20	γ-terpinene	1047	1049	1243	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5
21	p-cymenene	1075	1072	1430	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	tr
22	terpinolene	1078	1078	1280	0.6	0.5	0.7	0.3	0.5	0.6
23	linalool	1081	1082	1544						
24	nonanal	1081	1082	1390						
25	cis-hydrate sabinene	1083	1082	1541	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
26	1-octen-3-yl acetate	1095	1092	1376	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.5
27	p-mentha-1,3,8-triene	1101	1103	1433	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2
28	perillene	1098	1095	1713						
29	camphor	1123	1120	1517	1.1	1.5	1.5	1.3	1.5	1.3
30	trans-pinocarveol	1125	1122	1650	0.1	0.7	0.2	0.5	0.3	0.2
31	cis-verbenol	1127	1127	1650	0.6	0.8	0.5	0.5	0.7	0.6
32	pinocarvone	1136	1137	1558	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
33	borneol	1148	1149	1698	6.4	5.9	6.6	7.2	6.8	7.4
34	terpinen-4-ol	1161	1160	1600	0.7	0.5	0.8	0.6	0.5	0.3
35	Myrtenal	1172	1169	1628	0.1	0.1	tr	tr	0.1	tr
36	α-terpineol	1179	1175	1700	9.8	7.8	9.5	10.3	8.5	7.9
37	trans-carveol	1196	1196	1832	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1
38	cis-3-hexenyl-2-methyl butyrate	1220	1220	1457	tr	tr	tr	0.1	tr	tr
39	carvone	1222	1223	1739	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
40	thymol	1266	1267	2189						
41	carvacrol	1278	1280	2219						
42	thymyl acetate	1330	1328	1820						
43	carvacryl acetate	1346	1344	1874						
44	bornyl acetate	1269	1268	1575	5.4	6.2	5.8	4.6	6.1	5.1
45	α-terpenyl acetate	1336	1336	1681	51.4	51.1	50.6	52.2	52.5	50.7
46	α -cubebene	1350	1347	1452						
47	α -copaene	1379	1376	1488	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
48	β -bourbonene	1385	1382	1515	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
49	β -elemene	1388	1386	1589	tr	tr	tr	tr	tr	tr
50	isocaryophyllene	1407	1405	1571	tr	tr	tr	tr	tr	tr

1											
2	51	α -gurjumene	1413	1410	1524	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
3	52	E- β -caryophyllene	1420	1418	1591	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.3
4	53	E- β -farnesene	1448	1445	1661	tr	tr	tr	tr	tr	tr
5	54	α -humulene	1456	1453	1665						
6	55	γ -muurolene	1471	1469	1681	0.3	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2
7	56	germacrene D	1480	1479	1692	tr	0.2	tr	tr	0.1	tr
8	57	β -selinene	1483	1487	1712						
9	58	bicyclogermacrene	1492	1489	1727	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10	59	β -bisabolene	1500	1500	1720	0.7	0.7	0.5	0.4	0.5	0.8
11	60	γ -cadinene	1507	1505	1752	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
12	61	δ-cadinene	1516	1514	1752	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.3
13	62	α -cadinene	1532	1530	1740						
14	63	E- α -bisabolene	1532	1532	1753						
15	64	caryophyllene oxyde	1576	1572	1980	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4
16	65	Tau-cadinol	1632	1634	2169	0.2	tr	0.1	0.1	0.1	0.1
17	66	α -bisabolol	1672	1669	2217	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1
18	67	abietatriene	2042	2039	2493						
19	68	abieta-7,13-diene	2080	2077	2457						
20											
21		Total Identification %				98.2	98.1	98.7	98.8	99.6	97.3
22		Yields % (w/w)				0.85	0.84	1.38	1.22	0.98	1.25
23		Hydrocarbon compounds (40)				16.3	18.1	17.1	16	16.6	17.5
24		Monoterpene hydrocarbons (20)				13.6	15	15	13.8	14.3	15.2
25		Sesquiterpene hydrocarbons (18)				2.7	3.1	2.1	2.2	2.3	2.3
26		Diterpene hydrocarbons (2)				0	0	0	0	0	0
27		Oxygenated compounds (28)				81.9	80	81.6	82.8	83	79.8
28		Oxygenated monoterpenes (21)				80.4	78.6	80.4	81.4	81.7	78.6
29		Oxygenated sesquiterpenes (3)				0.6	0.5	0.5	0.5	0.4	0.6
30		Non-terpenic oxygenated compounds (4)				0.9	0.9	0.7	0.9	0.9	0.6
31											

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). Bold types refer to main compounds. ^b Retention indices of literature reported from [36]. ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (3): Mixture of all Algerian *T. ciliatus* essential oils from each subspecies. Quantification was carried out using RFs relative to 3: Normalized Percentages are given on the apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). Sample oils: normalized percentages (%) from all sample oils of each subspecies are given on the apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). The chemical composition is tabulated in Supplementary Material. ^f RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode. All compounds were compared by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library.

<i>Thymus ciliatus</i> ^e																
<i>nus</i>		<i>Thymus ciliatus</i> subsp. <i>eu-ciliatus</i>														
S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
0.7	0.8															
0.1	0.5	0.1	0.7	0.7	0.4	0.4	0.3	0.5	0.7	0.9	0.1	0.5	0.6	0.4	0.4	0.7
1.7	1.5	0.5	0.6	0.6	0.3	0.5	0.6	0.6	0.6	0.4	0.5	0.8	0.5	0.7	0.4	0.6
3.5	3.5	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.2
tr	0.1															
tr	0.1															
0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.6	0.4	0.5	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4
tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	0.3	0.2	0.1
0.8	1.2															
1.8	1.3	1.4	2.4	2	2.1	1.8	1.6	1.9	2.6	2.1	3.2	2.1	3.6	2.7	1.9	1.5
		0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.4	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3
		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1
0.1	0.2	1.9	2.3	1.8	2.6	2.5	2.1	2.5	1.9	2.6	2.1	2.5	1.6	1.8	2.2	1.1
0.1	tr	5.6	9.3	7	5.7	6.7	8.9	7.1	7.9	7.2	7.5	8.7	7.9	7.6	9.8	8.1
4.5	4.2															
2.7	2.6															
		0.4	0.6	0.5	0.3	0.5	0.4	0.4	0.5	0.6	0.3	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4
0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1.5	1.6	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.2	0.4	13.4	12.8	9.6	10.9	13.3	14.2	11.7	10.2	11.7	10.5	12.5	11.9	12.3	9.9	10.9
tr	tr															
0.4	0.6	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	0.2	0.1	0.3
		0.9	0.9	0.7	0.6	0.5	0.7	0.6	0.7	0.8	0.7	0.6	0.3	0.5	0.4	0.6
0.2	0.3															
0.5	0.6															
0.1	0.1															
1.7	1.5															
0.1	0.6															
0.6	0.6															
0.1	0.1															
7.1	6.2	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.4	0.2	0.1	0.4	0.5	0.3	0.4	0.2	0.1	0.2
0.7	0.8	0.5	1.5	1.1	0.8	0.6	0.8	0.9	1.1	1.4	1.2	0.8	1.1	0.9	1.3	0.7
0.1	0.1															
9.6	7.8	tr	0.1	0.2	tr	0.1	0.1	0.3	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.1	tr
0.4	0.3															
tr	tr															
0.1	0.1															
		0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3
		69.9	61.6	69.7	69.5	66.7	63.7	68.9	66.9	67.2	69.1	63.5	66.1	62.8	68.2	70.4
		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1
		0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	0.1	0.3	tr	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2
4.8	4.3															
50.9	54.3															
0.2	0.1															
0.1	0.1															
tr	tr															
tr	tr															

1																	
2	0.1	0.1															
3	0.4	0.5	1.6	2.3	1.7	1.6	1.9	2.1	2.2	2.5	1.7	1.5	2.1	1.7	2.8	2.4	1.3
4	0.1	tr															
5			0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
6	0.3	0.3															
7	0.1	tr															
8																	
9	0.1	0.1															
10	0.4	0.5	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1	tr
11	0.1	0.1															
12	0.6	0.4															
13																	
14			0.1	0.1	0.2	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1
15	0.3	0.3															
16	0.1	0.1															
17	0.1	0.1															
18																	
19			0.2	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	tr	0.2
20			0.3	tr	tr	0.2	0.1	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	0.1
21	98.3	99.3	99.1	98.1	98.1	97.8	98.4	97.6	99.3	98.2	99.3	99.7	96.7	98.2	95.3	99.4	99.1
22	0.87	0.96	0.61	0.66	0.69	0.62	0.69	0.53	0.55	0.49	0.56	0.76	0.59	0.63	0.61	0.96	0.78
23	17.4	17.3	26.6	32.8	25.5	25.7	29.3	31.3	27.9	28.8	28.8	27.4	30.9	29.5	30	28.8	26.6
24	14.9	15.1	24.2	30.1	23.5	23.6	26.9	28.9	25.4	26	26.7	25.5	28.3	27.5	27.1	26.1	24.8
25	2.5	2.2	1.9	2.6	2	1.8	2.2	2.4	2.4	2.7	1.9	1.8	2.4	1.9	2.9	2.7	1.5
26	0	0	0.5	0.1	tr	0.3	0.2	tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	tr	tr	0.3
27	80.9	82	72.5	65.3	72.6	72.1	69.1	66.3	71.4	69.4	70.5	72.3	65.8	68.7	65.3	70.6	72.5
28	79.9	80.8	72.5	65.3	72.6	72.1	69.1	66.3	71.4	69.4	70.5	72.3	65.8	68.7	65.3	70.6	72.5
29	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0.5	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

32 e on the apolar column (IRIa)
 33 mn (RIp). e Collective oils (HEColl1
 34 ative to tridecane as internal standard.
 35 ven on the polar column), tr = trace
 36 mn except for
 37 ions of all individual samples were
 38 mpounds were identified by

1													
2	0.1	0.3	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	RI, MS
3	2.4	2.4	2.5	2.1	1.8	2.5	2.5	2.1	1.8	1.6	2.1	2.4	RI, MS
4	0.5	0.5	0.3	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	0.5	RI, MS
5													RI, MS
6	3.4	3.4	3.3	3.6	3.6	3.7	3.8	3.8	3.4	3.2	3.1	3.4	RI, MS
7	0.7	0.7	0.4	0.5	0.4	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	RI, MS
8	1	0.7	0.5	0.5	0.8	0.3	0.8	1.1	1.2	0.5	0.6	1.1	RI, MS
9													RI, MS
10	0.7	0.6	0.2	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5	0.5	RI, MS
11	0.9	0.8	0.4	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0.8	0.6	0.9	0.6	RI, MS
12	4.6	5.6	6.7	6.7	6.4	5.6	5.9	5.1	5.6	4.8	6.3	4.9	RI, MS
13	0.9	1.2	0.7	0.7	0.6	0.8	0.5	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	RI, MS
14													RI, MS
15	1.4	1.3	1.6	1.2	1.1	1.1	1.3	1.1	0.9	1.3	0.7	1.4	RI, MS
16													RI, MS
17	0.9	0.8	0.6	0.6	0.7	0.9	0.8	0.6	1.2	0.9	0.8	0.9	RI, MS
18													RI, MS
19													RI, MS
20													RI, MS
21	97.7	95.8	96.3	97.1	96.2	96.9	97.5	95.8	96.8	95.8	96.1	96.6	
22	0.33	0.37	0.42	0.43	0.37	0.41	0.35	0.39	0.29	0.58	0.51	<u>0.40</u>	
23	55.8	53.9	52.5	56.8	54.3	53.7	53.6	52.1	54.7	53.3	55.1	53.3	
24	38.7	35.8	35.6	39.3	37.8	36.7	35.9	35.3	38.2	38.2	37.8	37.1	
25	17.1	18.1	16.9	17.5	16.5	17	17.7	16.8	16.5	15.1	17.3	16.2	
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	41.9	41.9	43.8	40.3	41.9	43.2	43.9	43.7	42.1	42.5	41	43.3	
28	38.8	39	41	37.8	39.6	40.5	41	41.2	39.3	39.6	38.6	40.4	
29	2.3	2.1	2.2	1.8	1.8	2	2.1	1.7	2.1	2.2	1.5	2.3	
30	0.8	0.8	0.6	0.7	0.5	0.7	0.8	0.8	0.7	0.7	0.9	0.6	
31													
32													
33													
34													
35													
36													
37													
38													
39													
40													
41													
42													
43													
44													
45													
46													
47													
48													
49													
50													
51													
52													
53													
54													
55													
56													
57													
58													
59													
60													

[A4] : Genre Mentha (activité biologiques)

K. Medjdoub, **F. Z. Benomari**, N. Gaouar Benyelles, M. A. Dib, N. Djabou. J. Costa. Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four Mentha species. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2017. **Article soumis, en révision.**



Journal: Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**Section:** General**Manuscript Type:** Research Article**Manuscript Full Title:** Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four *Mentha* species; **Revision:** 0**Abstract [Required]:**

Background: Many medicinal plants from the *Mentha* species can be easily found in Algeria. These plants have been used as traditional medicines by local ethnic groups. The mints have been commonly used as a spice, and reported to have many biological effects. Objectives: This paper focused on the assessment of the antifungal activity and fumigation toxicity of essential oil of *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* and *Mentha rotundifolia* against the growth of certain fungi and *Bactrocera oleae* insect, responsible for olives rot. Materials and Methods: Essential oils of four *Mentha* species were extracted by a Clevenger-type apparatus. The antifungal activity was tested using radial growth technique and the insecticidal activity by fumigant test. Results: The chemical composition of the four essential oils from *Mentha* was characterized by the presence of high amounts of monoterpenes oxygenated. All essential oils presented antifungal activities against *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria* sp and *Penicillium* sp. At the highest concentration (15 µl/ml air), essential oil of *M. pulegium* caused mortality of 100% after 1.5 h of exposure. While for *M. piperita* and *M. rotundifolia* essential oil it was necessary 25 µl/ml air to have mortality of 100%. Conclusion: We demonstrated for in this study, our essential oils could act as antifungal agents and fumigants against *Bactrocera oleae*.

Keywords: Antifungal, insecticidal activities, *Mentha* species**List of Uploaded Files:**

Title page.mentha.docx, Manuscript mentha.rev.docx

Classifications: Medical chemistry

Background: *Mentha* species are commonly used in traditional medical for their several pharmacological properties. *Mentha* species are also used as a spice and are known for their bactericide, viral and fungicidal properties.

Objectives: The main objective of this work is the evaluation of the antifungal activity and fumigation toxicity of essential oil of *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* and *Mentha rotundifolias* against the growth of certain fungi and *Bactrocera oleae* insect, responsible for olives rot.

Materials and Methods: Essential oils of four *Mentha* species were extracted by a Clevenger-type apparatus. The antifungal activity was tested using radial growth technique and the insecticidal activity by fumigant test.

Results: The monoterpenes oxygenated were the main components of the four essential oils from *Mentha*. All essential oils presented antifungal activities against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp*. At the highest concentration (15 µl/ml air), essential oil of *M. pulegium* caused mortality of 100% after 1.5 h of exposure. While for *M. piperita* and *M. rotundifolia* essential oil it was necessary 25 µl/ml air to have mortality of 100%.

Conclusion: We demonstrated for in this study, our essential oils could act as antifungal agents and fumigants against *Bactrocera oleae*.

Keywords: Antifungal; insecticidal activities; *Mentha* species

1. Background

In Algeria, the production of olive oil is a sector being in development and still flourishing years behind him. The olives are infected by several soilborne fungal pathogens such as *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium* (1). It is known that fungal strains occurring most frequently at mild and cold temperatures that affect fruit. Furthermore, many olives are attacked mainly by *Bactrocera oleae* insects that are considered to be a serious threat for production olive in Mediterranean region.

Chemical antifungal and fungicides are highly used to control phytopathogenic fungi; nevertheless, the use of this type of compounds represents a concern associated with risk exposure and environmental hazards; therefore, new alternatives are needed (2).

In the world, many species of mints are grown for commercial purposes for their use in the food flavours, cosmetics and pharmaceuticals field (3,4). Many studies on the fungicidal and insecticidal activity of several Mint have been carried out (5-10).

2. Objectives

The main objective of this study was to assess, (i) the antifungal activity of four mint essential oils against several phytopathogens responsible of the diseases olives, such as *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp*. and (ii), the evaluation of insecticidal activity of these four oils against *Bactrocera oleae* insect, responsible for olives rot.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

The plant material of *M. spicata*, *M. pulegium*, *M. piperita* and *M. rotundifolia* were collected from region Tlemcen (Algeria) in July 2014, during periods of full bloom stage.

Each specimens of mint collected were identified by Professor Noury Benabadji of University of Tlemcen (Algeria) and deposited in the Herbarium of the University with voucher specimens: *M. spicata*: MSP-0714; *M. pulegium*: MPU-0715; *M. piperita*: MPI-716 and *M. rotundifolia*: MRO-0716).

3.2. Essential oils isolation

The aerial parts were stored at 18 °C after harvest. 550-600 g of each species was subjected to a Clevenger-type apparatus (11) for 5 h. The yields of the oils were 0.5% for *M. spicata*, 0.7% for *M. pulegium*, 0.67% for *M. piperita* and 0.9% for *M. rotundifolia*. Before chromatographic analysis the essential oils were dried over sodium sulfate and stored in sterilized amber glass flasks.

3.3. Gas chromatography

The Gas Chromatography (GC) apparatus used for determination of retention indices is a Perkin Elmer Clarus 600 GC equipped with two flame ionization detectors (FIDs) and two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Program Conditions were temperature of 60 to 230 °C at 2 °C min⁻¹ and then held isothermal 230 °C (30 min) and carrier gas was hydrogen (0.7 mL min⁻¹). Injector and detector temperatures were held at 280 °C. Injected volume was 0.1 μL.

3.4. Gas chromatography-mass spectrometry

The essential oils were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole apparatus, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m×0.22 mm, film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol) with same program GC as described above. Ion source temperature was 150 °C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35–350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 μL.

3.5. Component identification

The different components of essential oils were identified by comparison of GC retention indices (RI), determined from retention time of a series of n alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds (12,13) and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries (31) and comparison of the spectra with those of the in house laboratory library (14).

3.6. Pathogenic Fungi

Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp* four fungal isolates causing olives rot, were isolated directly from rotten olive harvested from orchards of Remchi, Ain Temouchent (Algeria). The four fungal species after their transfers in sterilized Petri dishes, 20% of lactic acid has been added in middle to stop the growth of bacteria. The

plates were incubated at 25 ± 2 °C for 8 days away from light. Strains identification was based firstly by their morphological characters and secondly on microscopic observations according the following references (15,16).

3.7. *In vitro* Antifungal Activity

The radial growth technique was used for tested the antifungal activity of essential oils (17). The concentrations varying from 0.1 to 300 ml/l used in the *in vitro* tests were obtained from stock solutions. For it, appropriate volumes of essential oils were dissolved in DMSO and added to PDA medium immediately before it was poured into the Petri dishes of 9.0 cm diameter at 40-45 °C. The controls were prepared with DMSO mixed with PDA (without essential oils). The discs of mycelial felt of the plant pathogenic fungi, taken from 7-day-old cultures on PDA plates, were transferred aseptically to the center of Petri dishes were incubated. Each concentration was performed in triplicate.

The treatments were incubated at 27 °C in the dark. Colony growth diameter was measured after the fungal growth in the control treatments had completely covered the Petri dishes. The concentration of essential oils that inhibited 50% that radial growth (IC_{50}) and the minimum inhibitory concentrations (CMI) were determined at 95% of confidence intervals (18) using a Probit analysis.

3.8. Fumigation toxicity of essential oils against *B. oleae*

To determine the fumigant toxicity of essential oils, appropriate concentrations, were applied separately on the filter papers (Whatman No. 1, 2 cm diameter) to achieve the concentrations ranged from 8 to 65 ml/l air without using any solvent, and the filter papers were attached to the under-surface of lids of plastic jars with 50-ml volumes. The control sets received no oil. The lids were screwed tightly on the jars containing 15 insect each, all of the same age. These were kept at a temperature of 25-26 °C and 80-85% relative humidity (18). Mortality was checked after 24 h from commencement of exposure. The mortality of insect was expressed in % and calculated by using the Abbott correction formula

$$\text{Corrected mortality} = (\text{OMT} - \text{OMC}/100 - \text{CM}) \times 100$$

OMT: Observed Mortality in Treatment

OMC: Observed Mortality in Control

CM: Control mortality

Percentage mortality = (NDI/NII) X100

NDI: Number of Dead Insect

NI: Number of Insect Introduced

3.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by ANOVA using the SAS software. The means were separated using the least significant difference test at $P \leq 0.05$. Analysis of all tests was performed in triplicate.

4. Results

4.1. Chemical composition of four mint species essential oils

A total of 29, 18, 35 and 47 compounds were identified in essential oils of *M. spicata*, *M. pulegium*, *M. piperita* and *M. rotundifolia* that accounted for 98.1, 98.5, 98.8 and 98.9 % of the oils, respectively (Table 1). The components identification was realized by comparison of the IR and GC-MS with pure compounds of Arômes library (Table 1). In the GC-MS analysis of *M. spicata* essential oil, the more prominent compounds found were carvone (54.1%) and limonene (21.9%). The main compounds found in *M. pulegium* were pulegone (77.3%) and menthone (10.8%). The chemical composition of *M. piperita* essential oil was dominated by linalool (40.4%) and linalyl acetate (32.6%). Therefore, *M. rotundifolia* essential oil was characterized by appreciable amount of menthone (28.5%) and neo-menthol (10.4%).

4.2. *In vitro* antifungal activity of four mint essential oils against plant fungi

Essential oils minimum and medium inhibitory concentrations (CMI and CI_{50} , respectively), and inhibition of the four fungi amended with the estimated CMI and CI_{50} of each essential oil is presented in Table 2. All essential oils presented antifungal activities against *A. flavus*,

A. niger, *Alternaria sp* and *Penicillium sp*. The lowest activity was observed with essential oils of *M. piperita* and *M. rotundifolia* with IC_{50} s ranging from 80 to 300 ml/l and CMI from 1.2 to 25.2 ml/l. *M. spicata* and *M. pulegium* essential oils exhibited good activities compared to *M. piperita* and *M. rotundifolia* essential oils. Essential oil of *M. pulegium* was active against *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp* with IC_{50} s of 4.2, 1.1, 1.3 and 1.1 ml/l and CMI of 0.1, 0.2, 0.08 and 0.08 ml/l, respectively. However, essential oil of *M. spicata* was more active against *Alternaria sp* and *Penicillium sp* with IC_{50} s of 1.5 and 0.8 ml/l and CMI of 0.1 and 0.08 ml/l, respectively. While essential oil exhibited moderate activity against *A. flavus* and *A. niger* with IC_{50} s of 45 and 50 ml/l and CMI of 0.2 and 1.2 ml/l.

4.3. Fumigation Toxicity

The results on fumigation toxicity essential oils mints against *Bactrocera oleae* are summarized in Table 3. The efficacy of essential oils varied with its concentration. At the concentration of 10 μ l/ml air, the essential oils of *M. pulegium*, *M. piperita* and *M. rotundifolia* caused mortality over 46% after 24 h of exposure. While, *M. spicata* essential oil showed no efficacy at this concentration. At the highest concentration (15 μ l/ml air), essential oil of *M. pulegium* caused mortality of 100% after 1.5 h of exposure (Table 3). While for *M. piperita* and *M. rotundifolia* essential oil it was necessary 25 μ l/ml air to have mortality of 100%.

5. Discussion

Essential oils from plants have attracted increasing interest as ecologically safer alternatives to fungicides and insecticides. The evaluation of in vitro antifungal properties of essential oils done in the present study showed that essential oils of four mentha have a good antifungal activity against *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria sp* and *Penicillium sp*. Furthermore, if we review the results of fumigant toxicity of essential oils of four mints, we can notice that oils showed very interesting activities. Essential oils are complex mixtures of volatile. Monoterpenes and sesquiterpenes are usually the main group of compounds that are

responsible for many biological activities. Chemical composition of our *Mentha* essential oils was characterized by the high amount of oxygenated compounds (67.9 to 95.8%), such as carvone, pulegone, menthone and neo-menthol. On the basis of these results, we suggest that antifungal activity and fumigant toxicity of *Mentha* essential oils was due to their major components such as linalool, carvone, pulegone, menthone and linalyl acetate with percentages exceeding of 28%. The carvone is very used in the diet, due to its aroma of cumin, dill and spearmint. It's is a natural products of strong antiseptic properties, and used as mosquito repellent (19). It has been demonstrated that carvone showed strong fungicidal activity to different species of strains of mycotoxigenic fungi involved in several plant diseases (19). Furthermore, results obtained by Ruth et al., (20) and Flamini et al., (21) who found that pulegone, limonene, carvone and menthone showed a biocide activity. The main components of *Mentha* essential oils, such as *M. pulegium* rich in pulegone and *M. spicata* rich in carvone showed significant insect antifeedant (*M. pulegium*) and nematocidal (*M. spicata*) effects (9).

We demonstrated for in this study our essential oils could act as antifungal agents and fumigants against *Bactrocera oleae*. Their antifungal and insecticidal effects could be used as fungicide and to prevent insect infestations of olive products. However, trials are necessary to implement an application method of essential oils as fongicide and against *Bactrocera oleae* insect pest.

References

1. Agrios G, Plant Pathology, 4th edn., Academic Press, San Diego, 1997, P. 3, 8, 184.
2. Gamal MS, El-Shafei MM, El-Said AE, Attia TGM. Environmentally friendly pesticides: essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. *Ind Crop Prod.* 2010;**31**:99-6.
3. Barıs O, Güllüce M, Sahin F, Ozer H, Kılıc H, Ozkan H, Sökmen M, Ozbek T. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteini* Afan Afan. (Asteraceae). *Türkish J. Biol.* 2006;**30**:65-3.

4. Hajlaoui H, Snoussi M, Jannet HB, Mighri Z, Bakhrouf A. Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia essential* oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Ann. Microbiol.* 2008;**58**:103-10.
5. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; **8**:20-6
6. Al Yousef S. Antifungal activity of volatiles from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013;**2**:261-72.
7. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2008;**119**:325-27.
8. Odeyemi OO, Masika P, Afolayan AJ. Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *Afr Entomol.* 2008;**16**:220-25.
9. Santana-Méridas O, González-Coloma A, Fe Andrés M, Vidali VP, Polissiou MG, Kimbaris AC. Biocidal compounds from *Mentha sp* essential oils and their structure activity relationships. *Chem Biodivers.* 2017.<https://doi.org/10.1002/cbdv.201600270>.
10. Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, Van Griensven LJ. Chemical composition of essential oils of *thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules.* 2009;**14**:238-49.
11. Council of Europe. European Pharmacopoeia, First edn. Council of Europe, Strasbourg. 1997.
12. Jennings W, Shibamoto T. In: Jovanovich HB (ed) Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, Academic Press, New York. 1980.
13. König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder 2.1. Ed. Institute of Organic Chemistry, Hamburg. 2001.

14. McLafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectra data. Wiley-Interscience. Ed, New-York. 1988.
15. Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi', 4th edn., *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota; 2006.
16. De Hoog GS, Guarro J. Atlas of Clinical Fungi', Ed. CBS, Barcelona, 1995.
17. G. S. De Hoog, J. Guarro, 'Atlas of Clinical Fungi', Ed. CBS, Barcelona, 1995.
18. W. S. Abbott. A Method for Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* 1925;**18**,265-67.
19. Kokkini S, Karousou R, Lanaras L. Essential oil of spearmint (carvone rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 1995; **23**,425-30.
20. Ruth N, Kalck P, Roques C, Roux I, Michel G. Comparison of Antimicrobial Properties of Monoterpenes and their Carbonylated Products. *Planta Med.* 1996;**62**(3):275-77.
21. Flamini G, Cioni PL, Puleio R, Morelli I, Panizzi L. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. 1999;**13**(4),34951.

Table1. *Mentha* species essential oils

No. ^a	Compounds	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>M. spicata</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. rotundifolia</i>
1	(E)-Hex-3-en-1-ol	812	810	1360				tr
2	Ethyl-2-methyl butyrate	829	829	1016				0,1
3	(E)-2-Hexenal	830	830	1210	tr		0.1	0,1
4	(Z)-Hex-3-en-1-ol	831	832	1375				0,1
5	(Z)-2-Hexenol	851	848	1400				tr
6	1-Hexenol	852	851	1414				tr
7	α -Thujene	922	923	1021	0.4	0.1	tr	0,2
8	α -Pinene	931	932	1023	0.7	0.5	0.2	0,4
9	Camphene	943	944	1066				tr
10	Oct-1-en-3-ol	959	962	1440		0.8		0,5
11	Sabinene	964	966	1118				0,2
12	β -Pinene	970	972	1108	0.7	0.2	0.3	0,4
13	Myrcene	976	982	1159	3.3	tr	1.2	1,3
14	3-Octanol	982	982	1350		0.8		0,2
15	γ -Phellandrene	997	998	1164	0.1			
16	α -Terpinene	1008	1010	1175	0.3			0,1
17	p-Cymene	1010	1012	1259	0.1			1.0
18	Limonene	1020	1021	1195	21.9	1.1		0,3
19	1,8-Cineole	1020	1021	1205		0.6	3.8	0,2
20	(Z)- β -Ocimene	1024	1025	1225			0.4	0,2
21	(E)- β -Ocimene	1034	1036	1241	0.4		0.4	tr
22	γ -Terpinene	1047	1049	1237	0.7	0.1	0.2	0,3
23	Trans-Hydrate sabinene	1051	1054	1444	1.7			3.0
24	Terpinolene	1078	1080	1247	0.1		0.1	0,5

25	Linalool	1078	1075	1280	0.2	tr	40.4	
26	Cis-Sabinene hydrate	1083	1082	1535	0.5			0,1
27	1-Oct-3-enyl acetate	1093	1087	1390		tr		0,1
28	2-Methyl-butyl isovalerate	1098	1096	1274			0.4	
29	Cis-p-Menth-2-en-1-ol	1108	1110	1600			tr	0,1
30	3-Octyl acetate	1111	1110	1315			0.2	
31	Trans-p-Menth-2-en-1-ol	1123	1126	1612			tr	tr
32	Menthone	1134	1135	1456		10.8		28,5
33	p-Menth-3-en-8-ol	1135	1135	1590				3,1
34	Iso-Menthone	1143	1142	1490		0.7		19,0
35	Borneol	1148	1150	1690		-		0,1
36	Neo-Menthol	1156	1157	1637	0.2	1.6		10,4
37	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	1.3	-		2,7
38	Menthol	1164	1163	1629		tr		1,4
39	Iso-Menthol	1174	1173	1660		tr		2,1
40	Z-Dihydro carvone	1175	1174	1601	2.6			
41	Dihydro carveol	1178	1174	1723	tr			
42	α -Terpineol	1179	1177	1688		tr	6.4	2,9
43	E-Dihydro carvone	1180	1180	1626	3.1			
44	α -Campholenol	1186	1188	1782				tr
45	Nerol	1211	1213	1799			1.1	
46	Pulegone	1213	1216	1640		77.3	0.1	5,6
47	Carvone	1222	1226	1739	54.1			
48	Piperitone	1232	1229	1727		0.3		1,3
49	Geraniol	1232	1234	1844			2.4	
50	Linalyl acetate	1240	1237	1557		tr	32.6	
51	Geranial	1244	1243	1731			0.2	
52	Neryl formate	1263	1266	1647			0.1	

53	Neo-Menthyl acetate	1263	1268	1548		0.1		5.0
54	Bornyl acetate	1269	1268	1475				tr
55	Lavandulyl acetate	1270	1273	1593			0.1	
56	Menthyl acetate	1282	1285	1578				2,1
57	Iso-Menthyl acetate	1294	1295	1594		0.1		1,8
58	Dihydro carvyl acetate	1311	1312	1661	2.2			
59	Piperitenone	1315	1313	1900	tr	2.7		1,8
60	Piperitenone oxide	1333	1335	1945	0.3			
61	α -Terpenyl acetate	1336	1336	1678			0.1	0,1
62	Neryl acetate	1342	1345	1725	1.7		2.7	
63	Geranyl acetate	1361	1364	1725			2.5	
64	α -Copaene	1379	1379	1475				0,1
65	β -Bourbonene	1385	1385	1515	0.3		0.1	tr
66	E- β -Caryophyllene	1424	1418	1583	0.6	0.3	0.8	0,4
67	E- β -Farnesene	1448	1447	1660			0.1	0,2
68	α -Humulene	1456	1456	1665	0.2	0.4		
69	γ -Muurolene	1471	1469	1679			0.1	0,2
70	Germacrene D	1480	1474	1692	0.1		0.1	0,1
71	α -Muurolene	1496	1492	1709				0,1
72	γ -Cadinene	1507	1506	1750	0.1	tr	0.2	0,2
73	trans-Calamenene	1512	1510	1810	0.1		0.2	0,1
74	δ -Cadinene	1516	1515	1748	0.1	tr	0.2	0,1
75	Cadina-1,4-diene	1523	1520	1763			0.1	
76	α -Calacorene	1531	1528	1890				0,1
77	α -Cadinene	1535	1530	1740		tr	0.1	tr
78	β -Calacorene	1548	1546	1936				tr
79	Caryophyllene oxide	1578	1580	1980			0.3	
80	Globulol	1580	1582	2074			0.5	

Total Identification %	98.1	98.5	98.8	98,9
Hydrocarbon compounds	30.2	2.7	4.8	6,5
Monoterpene hydrocarbons	28.7	2.0	2.8	4,9
Sesquiterpene hydrocarbons	1.5	0.7	2.0	1,6
Oxygenated compounds	67.9	95.8	94.0	92,4
Oxygenated monoterpenes	67.9	94.2	92.5	91,3
Oxygenated sesquiterpenes	-	-	0.8	-
Non-terpenic oxygenated compounds	-	1.6	0.7	1,1

Table 2. Minimum (CMI) and medium (IC₅₀) inhibitory concentration values against radial growth of fungi species determined after 7 days of incubation on PDA + Tween amended with the essential oils

Treatment (ml/l)	<i>A. flavus</i>		<i>A. niger</i>		<i>Alternaria sp</i>		<i>Penicillium sp</i>	
	CMI	IC ₅₀	CMI	IC ₅₀	CMI	IC ₅₀	CMI	IC ₅₀
<i>M. spicata</i>	0.2 ^a	45 ^b	1.2 ^b	50 ^b	0.1 ^a	1.5 ^a	0.08 ^a	0.8 ^a
<i>M. pulegium</i>	0.1 ^a	4.2 ^a	0.2 ^a	1.1 ^a	0.08 ^a	1.3 ^a	0.08 ^a	1.1 ^a
<i>M. piperita</i>	1.5 ^b	150 ^d	1.2 ^b	150 ^c	1.3 ^b	80 ^b	1.2 ^b	150 ^c
<i>M. rotundifolia</i>	1.3 ^b	90 ^c	12.5 ^c	250 ^d	25.2 ^c	300 ^c	1.2 ^b	100 ^b

Values are means from three experiments. Different letters within a column represent significant differences (P < 0.05).

Table 3. Larvicidal efficacy of *Mentha species* essential oil against *Bactrocera oleae* insect

Concentrations ($\mu\text{l/ml}$ air)	% Mortality \pm SE			
	<i>M. spicata</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>M. piperita</i>	<i>M. rotundifolia</i>
8	-	16.6 \pm 1.2 ^a	20.2 \pm 1.6 ^a	00 \pm 00 ^a
10	00 \pm 00 ^a	50.0 \pm 2.1 ^b	66.6 \pm 3.2 ^a	46.6 \pm 3.2 ^b
15	40.3 \pm 4.2 ^b	100.0 \pm 0.0 ^c	86.5 \pm 4.2 ^c	76.6 \pm 5.6 ^c
25	53.3 \pm 5.3 ^b	-	100.0 \pm 0.0 ^d	100.0 \pm 0.0 ^d
45	76.6 \pm 3.5 ^c	-	-	-
65	86.6 \pm 6.6 ^d	-	-	-
LC₅₀ ($\mu\text{L/L}$ air)	0.22		0.27	
LC₉₀ ($\mu\text{L/L}$ air)	0.33		0.45	

The results are expressed as mean \pm standard deviation.

[A5] : Genre Asteriscus

F. Z. Benomari, M. A. Dib, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou. « Comparative study of chemical composition of essential oils of two species of Asteriscus genus from western Algeria ». *Journal of Essential Oil Research*. **2018. Article soumis, en révision.**





Comparative study of chemical composition of essential oils of two species of Asteriscus genus from western Algeria

Journal:	<i>Journal of Essential Oil Research</i>
Manuscript ID	TJEO-2018-0045
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	01-Feb-2018
Complete List of Authors:	FATIMA ZAHRA, BENOMARI; Université de Tlemcen Dib, Mohammed El Amine; Université de Tlemcen, Muselli, Alain; Université de Corse, Costa, Jean; Université de Corse Pascal Paoli Djabou, Nassim; Université de Tlemcen,
Keywords:	Asteriscus maritimus, Asteriscus spinosus, essential oil, chemical composition

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Comparative study of chemical composition of essential oils of two species of *Asteriscus* genus**
4
5 **from western Algeria**
6

7 Fatima Zahra Benomari¹, Mohammed El Amine Dib¹, Alain Muselli², Jean Costa², Nassim Djabou¹.
8
9

10
11
12
13 ¹ Université de Tlemcen, Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses
14 (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.
15

16
17
18 ² Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels (CPN), Campus
19 Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France.
20

21
22 ***Corresponding author-email address: nassim.djabou@mail.univ-tlemcen.dz**
23
24
25
26
27

28 **Abstract**
29

30
31 Comparative study between chemical composition of the essential oils of *Asteriscus maritimus* and
32 *Asteriscus spinosus* from western Algeria have been investigated. Chemical variability of the essential
33 oils of both species was reported for the first time using Gas Chromatography/Retention Indices
34 (GC/RI) and GC-Mass Spectrometry (GC/MS). A total of 86 compounds were identified in *Asteriscus*
35 *maritimus* collective essential oil and 76 compounds in *Asteriscus spinosus* collective essential oil.
36
37 Intra-species variations of chemical compositions of essential oil from eighteen Algerian samples of
38 various locations of both species were also investigated using statistical analysis. *A. maritimus*
39 essential oils were characterized by T-cadinol (34.2-16.1%), p-cymene (30-15.1%), α -pinene (13.9-
40 2.8%), bornyl acetate (8.7-5.3%) and Z-phytol (7.8-2.4%), as the major compounds. The main
41 compounds in *A. spinosus* were α -Cadinol (19.8-7.3%), β -Pinene (17.6-12.9%), Hexadecanoic acid
42 (13.4-4.1%), T-Cadinol (10.3-3.5%) and δ -Cadinene (8.2-3.9%).
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 **Keywords:** *Asteriscus maritimus*, *Asteriscus spinosus*, essential oil, chemical composition.
54
55
56
57
58
59
60

Introduction:

Medicinal plants have always occupied a prominent place in human life. Today according to the World Health Organization (WHO), as many as 80% of the world's people depend on traditional medicine for their primary healthcare needs [1], it turns out that there are about 240,000 to 300,000 species of flowering plants on earth. Less than 10% of these species would have been studied scientifically for their pharmacological properties [2]. Within the framework of the valorization of traditional medicine, there has been a growing interest in recent decades in the study of secondary metabolites of medicinal plants and their traditional uses in different regions of the world. Among these secondary metabolites are the essential oils which are the subject of our study.

Algeria, because of its climate (Mediterranean, arid) and the nature of its soils, has a particularly rich flora of medicinal plants, most of which exist in a spontaneous state. Among these plants we are interested in the study of the chemical compositions of the essential oils of two species of the genus *Asteriscus*.

Asteriscus is a genus belonging to the *Imula* group of *Asteraceae-Inuleae*. This genus and the other two from the same tribe (*Ighermia* and *Pallenis*) contain a total of 15 species that develop wildly in a variety of coastal and desert habitats throughout the Mediterranean and Middle East [3], [4]. Although most species are endemic to the Macaronesian region, in Algeria there are six species described [5], *A. aquaticus*, *A. maritimus*, *A. pygmaeus*, *A. graveolens* and *A. spinosus* commonly known as the *Pallenis spinosa* [6]. Although *Asteriscus* is not a very large genus, few studies have been published on this subject [4], [7-13]. However, most studies have focused only on one species, *A. graveolens*, describing their flavonoids [10], new derivatives [12], [13] and essential oil activities [14]. The plants of this genus are known to contain compounds with potential antitumor, antispasmodic, anti-inflammatory activities, and they are known also for the treatment of infected wounds [13]. Flowering from April to September, *A. maritimus* known in Algeria as the « kerkba » is papillose, fragrant with petiolate leaves ranging from elongate to spatulate. The perennial plant produces gold-yellow flowers which are tubular in shape with 5 lobes; achenes 1-5 mm, papus 1-1.5 mm, this plant is quite common

1
2
3 in the Algerian Tell [5]. *A. maritimus* has also been reported from another point of view. Underwater
4 and salt stress conditions, this species displayed a significant degree of stomatal regulation [15]. As
5 regards the biological component, important activities have marked the essential oils of this species
6 (insecticidal, antimicrobials and anti-acetylcholinesterases) [7–9]. To our investigation only four
7 studies deal with chemical composition of essential oils of *A. maritimus* reported from Italy, Tunisia
8 and Spain from aerial parts and separated organs. Main compounds were myrtenyl acetate (44.2%),
9 terphenyl (17.5%) and (Z)- β -farnesene (12.9%) for aerial part from Italy [9], β -phellandrene (11.8%),
10 fonenol (10.9%) and α -phellandrene (10.0%), α -pinene (9%), p-cymene (7.3%) for flowers and α -
11 pinene (27.5%), p-cymene (10%), β -phellandrene (8.3%), α -phellandrene (7.2%) and fonenol (5.6%)
12 for stems and leaves from Spain [4], tetradecanol (12.2 %), α -ylangene (8.3 %), caryophyllene
13 alcohol (8.3 %), hexadecyl acetate (7.0 %), hexyl benzoate (4.5 %) for roots from Tunisia [7] and β -
14 eudesmol (24.25%), menthyl acetate (17.03%), pentadecanal (15.38%) and m-cymene (9.34%) for
15 flowers, hexadecanoic acid (30.35%), γ -eudesmol (14.99%), (E,Z)-farnesol (11.99%) and α -bisabolol
16 (4.31%) for leaves and hexadecanoic acid (49.8%), phytol (15.57%), 1-heneicosene (6.53%) and γ -
17 eudesmol (4.45%) for stems from Tunisia. [8] (See Table 1)

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 The second species that was the subject of our study is (*Pallenis spinosa* = *Asteriscus spinosus*), this
34 species known as "nougd" in Algeria is an annual herbaceous plant that grows in vast areas of the
35 Algerian tell, throughout the Mediterranean basin and in the Middle East region. Flowering in June
36 and July this plant is characterized by having a large yellow/orange flowers that are surrounded by
37 long spiny involucre bracts [5]. Medicinally, the flowers and spiny leaves of the plant have been used
38 to alleviate inflammation associated with a variety of pathological conditions including gastralgia,
39 inflammatory contusions, skin injuries and mouth infections [16], [17]. Usually, herbal infusions or a
40 concentrated decoction are made from the flowers and leaves and applied topically or taken orally
41 [18], according to the studies made it proved that the plant is a rich source of sesquiterpenes
42 compounds [19]. In fact, the plant has also been investigated for its flavonoids content and some
43 patuletin derivatives and tricine have been reported, as well as four methoxylated flavonols [20]. To
44 our investigation three studies reported chemical composition of the essential oils of *A. spinosus*.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Chemical profile have been characterized by the presence of α -cadinol (19.26%), δ -cadinene (13.93%), α -muurolol (12.88%) and germacra-1(10),5-dien-3,4-diol (8.41%) in aerial parts from Jordan [21], acorenone B (33.85%), α -muurolol (21.93%), α -cadinol (8.54%), oplopanonyl acetate (7.22%), Germacrene D-4-ol (4.95%) and δ -cadinene (4.95%) in flowers and α -cadinol (13.5%), acorenone B (9.64%), α -muurolol (9.83%), β -longipinene (6.26%) and δ -cadinene (9.79%) in leaves from also Jordan [16], and Germacra-1(10),5-dien-3,4-diol (18.4%), α -cadinol (14.1%), 3-acetoxygermacra-1(10),5-dien-4-ol (13.0%), T-cadinol (8.2%) and δ -cadinene (5.8%) in aerial parts from Italy [22]. (See Table 1)

Since the essential oil profile of these two species of the genus *Asteriscus* has never been studied in our country, the aim of this work is to contribute to the knowledge of the chemical composition of the volatiles of *A. maritimus* and *A. spinosus* and this by making a comparative study between the compositions of the two species with the results previously reported. Also, intra-species variations of chemical compositions of essential oil from both species samples from various locations from western Algeria were also investigated using statistical analysis.

Materials and methods

Preparation of the sample

Harvesting of the aerial parts of the two species studied (*Asteriscus maritimus* and *Asteriscus spinosus*) was carried out during flowering (May- July) from 18 location areas (8 locations from *A. maritimus* and 10 locations from *A. spinosus*) (See Table 2). The aerial parts of our plant were harvested in various biotopes characteristic of the western region of Algeria. The plant material is then deposited in a dark, dry, aerated place at room temperature.

From each species, many samples were collected to poll collective oils from the same species. For all samples, voucher specimens were deposited in the Herbarium of the University of Tlemcen. Essential oils were obtained from the fresh aerial parts of all stations by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia [23], and yielded (w/w) 0.02–

0.12% from *A. maritimus*, and 0.02–0.17% from *A. spinosus* (see Table 2). The essential oil of *A. maritimus* was yellow while that of *A. spinosus* was slightly yellowish and rather patty in appearance.

Gas chromatography

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and two flame ionization detectors (FIDs). The apparatus was used for simultaneous sampling of two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Temperature program 60 to 230 °C at 2 °C min⁻¹ and then held isothermal 230 °C (30 min). Carrier gas was hydrogen (0.7 mL min⁻¹). Injector and detector temperatures were held at 280 °C. Split injection was conducted with a split ratio of 1:80. Injected volume was 0.1 μL.

Gas chromatography-mass spectrometry

The oils were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole analyzer, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature was 150 °C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35–350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 μL and fraction injected volume of 0.2 μL.

Component identification

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on non-polar and polar columns, determined to the retention time of a series of nalkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds for our laboratory library from University of Corsica and literatures data [24], [25], and (ii) on computer matching with mass spectral of our laboratory library and commercial mass spectral libraries [26].

Component quantification

The quantification of the essential oil components was performed using the methodology reported by Bicchi et al. (2008) [27] and adapted in laboratory of UMR CNRS 6134 from University of Corsica [28]. Component quantification was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard and expressed as normalized % abundance.

Statistical analysis

Data analyses were performed using principal component analysis (PCA) [29]. This method aims to reduce the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results [30]. Indeed, PCA provides the data in which both objects (oil samples) and variables (oil major components and/or antibacterial inhibition) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in which objects (sample locations) are gathered. PCA was carried out using function BPCA from the statistical R software (factominR package). The variables (major components and/or antibacterial inhibition) have been selected using function from the statistical software.

Results

Chemical composition of essential oils

Preliminary analysis of 10 Algerian oil sample areas of *A. spinosus* and 8 areas of *A. maritimus* showed that the GC chromatograms of all samples from the same species were qualitatively similar but differed by abundances of their major components. Therefore, in order to carry out a detailed analysis, all *A. spinosus* and *A. maritimus* essential-oil samples were pooled to produce two « Collective oils ». (Table 3), reported the chemical compositions from all samples of each species. In total, we identified 86 compounds in *A. maritimus* essential oils representing 94.2% of total collective oil (14 monoterpene hydrocarbons, 18 sesquiterpene hydrocarbons, 34 oxygenated monoterpenes, 11 oxygenated sesquiterpenes, 2 oxygenated diterpene, 2 phenyl propanoids and 6 non-terpenic oxygenated compounds). *A. maritimus* collective oil (CO1) was dominated by T-cadinol 25.4%, p-

1
2
3 cymene 22.1%, α -pinene 7.7% and bornyl acetate 5.2%. *A. spinosus* essential oils were characterized
4 by the presence of 76 compounds representing 94,7% of total collective oil (10 monoterpene
5 hydrocarbons, 14 sesquiterpene hydrocarbons, and 6 non-terpenic hydrocarbons compounds, 16
6 oxygenated monoterpenes, 17 oxygenated sesquiterpenes, 9 non-terpenic oxygenated compounds, 2
7 oxygenated diterpene and 1 phenyl propanoid). Collective oil of *A. spinosus* (CO₂) was characterized
8 by the abundance of β -pinene 12.9%, α -cadinol 11.4%, hexadecanoic acid 9.1%, T-cadinol 8.6% and
9 δ -cadinene 4.3%. From all simples analyzed, 133 components were identified, 125 components were
10 verified by comparing their EI-MS and retention indices with those in our laboratory library (UMR
11 CNRS 6134 from University of Corsica) and eight components were identified by comparing their EI-
12 MS and apolar retention indices with those of literature libraries under the same analytical conditions
13 as ours (see Table 3).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 ***Chemical variability of A. maritimus and A. spinosus essential oils***

27
28 Normalized percentage abundances of all identified components were used for statistical analysis
29 (Table 3). Relationship between the chemical composition of oils and species differentiation were
30 studied, using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) applied to a matrix
31 linking essential oil compositions and the samples localities (Fig. 1 and 2). As shown in (Fig. 1), PCA
32 constructed using axes 1 and 2 accounted for 81.63% of the variance. First dimension (Dim1) was
33 positively correlated with major components of all simple oils of *Asteriscus spinosus*, and negatively
34 correlated with major components of all simple oils of *Asteriscus maritimus*. The plot suggests that
35 there are two main groups (Fig. 1) in accordance with general structure of the dendrogram obtained
36 from the CA (Fig. 2): Group I included 10 stations (ASS1 – ASS10) and group II included 8 stations
37 (AMS11 – AMS18). Sample oils of group I were characterized by high amount of β -Pinene, α -
38 Cadinol, Hexadecanoic acid, δ -Cadinene, Linoleic acid, E- β - Caryophyllene, α -Phellandrene and 14-
39 hydroxy- α -Muurolole. Group II were characterized by major components T-Cadinol, p-Cymene, α -
40 Pinene, Bornyl acetate, α -Oxobisabolene and (Z)-Phytol. The statistical distribution of the oil samples
41 demonstrated correlation between the chemical composition of individual oil samples and species.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Group I regrouped all specimens of *A. spinosus* and Group II regrouped all samples of *A. maritimus*.

1
2
3 Statistical analysis shows that, essential oils of *A. maritimus* were qualitatively similar but there were
4 percentage differences in the abandonment of their majority compounds: T-cadinol (16.1-34.2%) p-
5 cymene (15.1-30%), bornyl acetate (5.3-8.7%), α -pinene (2.8-13.9%) and Z-phytol (2.4-7.8%).
6
7

8
9 The chemical composition of *A. spinosus* essential oil revealed the presence of α -Cadinol (7.3-19.8%),
10 β -Pinene (12.9-17.6), Hexadecanoic acid (4.1-13.4%), tau-Cadinol (3.5-10.3%) δ -Cadinene (3.9-
11 8.2%). The statistical analysis of this oil to show a similar chemical profile for all the samples studied
12 but that differs in the abandonment of the compounds, this can be attributed according to Vichi. S et al
13 [31] to well-known factors including geographical location, age of the plant, climate, cultivar and
14 methods of distillation employed [31]. These results were in accordance with those of Al-Qudah [21]
15 et al only in the major compound which is the « α -Cadinol» but not with those of other authors.
16
17 *A. spinosus* essential oil has been characterized by its pasty appearance which may be due to the
18 presence with an important percentage of different acids (Tetradecanoic acid, Hexadecanoic acid
19 Linoleic acid) with a percentage exceeding 10.9% in collective oil.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Discussion

33
34 In general, and especially in the case of plants growing spontaneously, the variation of the major
35 compounds, yield, and appearance of an essential oil, depends on several factors, such as the nature of
36 the soil, climates and the conditions of growth. For the first time in Algeria, the chemical composition
37 of the essential oil of two species of genus *Asteriscus* (*A. maritimus* and *A. spinosus*) was studied, and
38 the results found were different from that of the literature (see Table 3). The poor oils yields of *A.*
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
maritimus were the same compared to literature data from Italy, Spain and Tunisia [4], [7]–[9].

The chemical profile of *A. maritimus* essential oil has been marked by the presence of a class of
families that is answered to be not common in this genus: silphiperfol-6-ene, 7- α -silphiperfol-5-ene, 7-
 β -silphiperfol-5-ene and Silphiperfolan-7- β -ol.

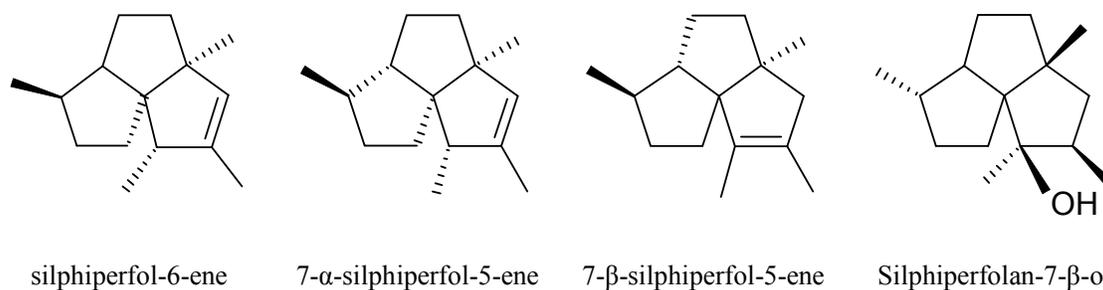


Figure 3: Structures of silphiperfol skeleton of *A. maritimus* essential oils

It is noticeable that the presence of tricyclic sesquiterpenes (Cameroonan-7- α -ol, silphiperfol-6-ene, 7- α -silphiperfol-5-ene, 7- β -silphiperfol-5-ene, Silphiperfolan-7- β -ol, Modhephene), has never been reported in literature data of essential oil of the genus *Asteriscus*.

For the second species studied, *A. spinosus* essential oil was recovered from the aerial part by the hydrodistillation method. Our poor oil yields are also similar to values reported by literature data from the same plant collected in Italy and Jordan [16], [21], [22]. The difference with literature lies in the fact that essential oils from Algeria were characterized by the presence Thymol and these derivative Thymyl methyl oxyde, Thymyl isobutyrate, and 8,9-dehydro thymyle isobutyrate, which is considered as a marker of our essential oil.

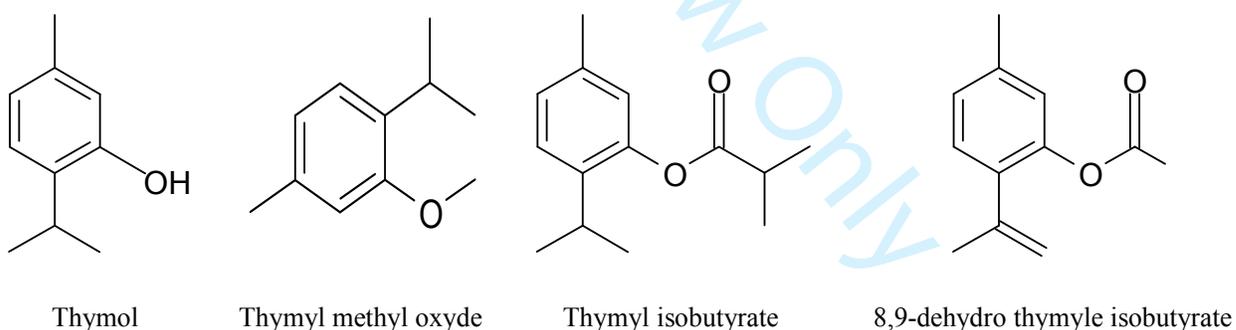


Figure 4: Structures of thymol derivatives of *A. maritimus* essential oils

Our study is designed basically to make a comparison of the chemical composition of the essential oils of two species of the same kind, for this purpose our study has shown that there is a very great resemblance in the constituents of the two oils. The first common point between the two plants is the yield of essential oil, which show low [9].

The first similarity in the chemical composition concerns the major compound which belongs to the cadinane-type sesquiterpenoids (α -cadinol in *A. spinosus* and T-cadinol in *A. maritimus*), it is noticeable that the Cadinol was found often in the chemical compositions of these species, but at a low percentage, this is the first time that we have seen them as a major percentage in *Asteriscus* oil. Chemical composition was marked by the abundance of oxygenated compound in the two collective oils (52.9 and 54.6%) for *A. spinosus* and *A. maritimus* respectively. Thus for both species the number of alcohols was equal, 19 alcohols in each composition.

The presence of an oil marker for each species has been reported in this study, but the presence of shyobunone has also been noted as a common compound between the two chemical compositions. However, the identification of shyobunone in our oil has not been reported in other studies on essential oils for either *A. maritimus* or *A. spinosus*.

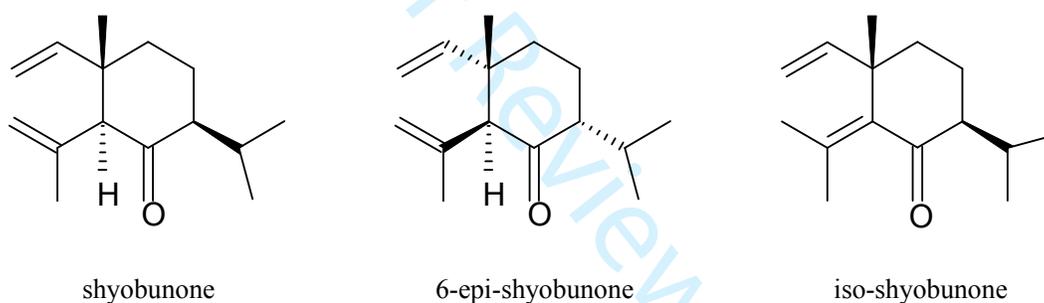


Figure 5: Structures of Shyobunone derivatives of *A. maritimus* and *A. spinosus* essential oils from Algeria

Conclusion

In the current study, the comparison between chemical composition of the essential oils of *A. maritimus* and *A. spinosus* has been investigated for the first time in Algeria. The two chemical compositions studied have revealed the abandonment of the oxygenated compound especially the oxygenated sesquiterpene in the collective oil of *A. spinosus* and *A. maritimus* respectively. The major compounds of both species were a sesquiterpenic alcohol of cadinol isomer. *A. maritimus* essential oil from Algeria was different compared to literature data. That was the same think for *A. spinosus*, except a few similitudes with the presence of cadinane form in literature (α -cadinol, T-cadinol and δ -

1
2
3 cadinene). Both essential oils of *A. spinosus* and *A. maritimus* exhibit new chemical composition
4 compared to the literature data.
5
6

7
8 **References:**

- 9
10 [1] Muthu, C., M. Ayyanar, N. Raja, and S. Ignacimuthu. 2006. Medicinal plants used by traditional
11 healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine*. 2(1):43.
12
13 [2] Anthony, J. P., L. Fyfe, and H. Smith. 2005. Plant active components – a resource for
14 antiparasitic agents. *Trends Parasitol.* 21(10):462-468.
15
16 [3] Peltier, J. 1973. Endemiques macaronesiennes au Maroc: Inventaire bibliographique et
17 problèmes taxonomiques. *Monographiae biologicae canariensis*. 134-142.
18
19 [4] Palá-Paúl, J., J. Usano-Aleman, and A. C. Soria. 2014. Essential Oil Composition of *Asteriscus*
20 *maritimus* (L.) Less. from Spain. *J. Plant Biol. Soil Health*. 2(1).
21
22 [5] Quezel, P., et S. Santa. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
23
24 [6] Wiklund, A. 1985. The genus *Asteriscus* (Asteraceae-Inuleae). *Nord. J. Bot.* 5(4):299-314.
25
26 [7] Medimagh, S., M. Daami-Remadi, H. Jabnoun-Khiareddine, M. Naffati, H. B. Jannet, and M. A.
27 Hamza. 2013. Chemical Composition and in vitro Evaluation of Antimicrobial and Anti-
28 acetylcholinesterase Activities of the Root Oil from *Asteriscus maritimus* (L.) Less Growing in
29 Tunisia. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 16(4):443-450.
30
31 [8] Medimagh, S., M. Daami-Remadi, H. Jabnoun-Khiareddine, H. B. Jannet, and M. A. Hamza.
32 2012. Chemical composition, Antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of essential
33 oils from the Tunisian *Asteriscus maritimus* (L.) Less. *Mediterr. J. Chem.* 2(2): 459-470.
34
35 [9] Fraternali, D., L. Giamperi, D. Ricci, and A. Manunta. 2001. Composition and insecticidal
36 activity of the essential oil of *Asteriscus maritimus* (L.). *Ital. J. Eppos Thirty*. 11(3232):33-39.
37
38 [10] Ahmed, A. A., M. S. Ishak, H. N. Micheal, M. A. El-Ansari, and H. I. El-Sissi. 1991. Flavonoids
39 of *Asteriscus graveolens*. *J. Nat. Prod.* 54(4):1092-1093.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [11] Estrada, B., R. Aroca, C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, and J. M. Ruiz-Lozano. 2013. Importance
4 of native arbuscular mycorrhizal inoculation in the halophyte *Asteriscus maritimus* for successful
5 establishment and growth under saline conditions. *Plant Soil*. 370(1-2):175-185.
6
7
8
9 [12] El Dahmy, S., J. Jakupovic, F. Bohlmann, and T. M. Sarg. 1985. New humulene derivatives
10 from *asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*. 41(2): 309-316.
11
12
13 [13] Sarg, T. M., S. I. El-Dahmy, A. M. Ateya, and H. A. Abdel-Fattah. 1994. Two new bisabolone
14 hydroperoxides and biological activity of *Asteriscus graveolens*. *Fitoterapia*. 65(3):241-244.
15
16
17 [14] Cristofari, G., et al. 2012. Chemical Diversity of Essential Oils from *Asteriscus graveolens*
18 (Forssk.) Less: Identification of cis-8-Acetoxychrysanthenyl Acetate as a New Natural
19 Component. *Chem. Biodivers*. 9(4):727-738.
20
21
22
23 [15] Rodríguez, P., A. Torrecillas, M. A. Morales, M. F. Ortuño, and M. J. Sánchez-Blanco. 2005.
24 Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus*
25 *maritimus* plants. *Environ. Exp. Bot*. 53(2):113-123.
26
27
28
29 [16] Saleh, A. M., M. A. Al-Qudah, A. Nasr, S. A. Rizvi, A. Borai, and M. Daghistani. 2017.
30 Comprehensive Analysis of the Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Mechanisms of
31 *Pallines Spinosa* Flower and Leaf Essential Oils Against Breast Cancer Cells; *Cell. Physiol.*
32 *Biochem*. 42(5):2043-2065.
33
34
35
36
37 [17] Chermat, S., and R. Gharzouli. 2015. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East
38 of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J. Mater. Sci. Eng*. 5:50-59.
39
40
41
42 [18] Benítez, G. M., R. González-Tejero, and J. Molero-Mesa. 2010. Pharmaceutical ethnobotany in
43 the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *J.*
44 *Ethnopharmacol*. 129(1):87-105.
45
46
47
48 [19] Appendino, G., J. Jakupovic, and S. Jakupovic. 1997. Sesquiterpenoids from *Pallenis spinosa*.
49 *Phytochemistry*. 46(6): 1039-1043.
50
51
52 [20] Ahmed, A. A., M. Spaller, and T. J. Mabry. 1992. Flavonoids of *Pallenis spinosa* (Asteraceae).
53 *Biochem. Syst. Ecol*. 20(8):785-786.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [21] Al-Qudah, M. A., A. M. Saleh, N. L. Alhawsawi, H. I. Al-Jaber, S. A. Rizvi, and F. U. Afifi.
4 2017. Composition, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from Fresh and
5 Air-Dried Aerial Parts of *Pallenis spinosa*. *Chem. Biodivers.* 14 (8).
6
7
8
9 [22] Senatore, F., and M. Bruno. 2003. Composition of the essential oil of *Pallenis spinosa* (L.) Cass.
10 (Asteraceae). *Flavour Fragr.* 18(3):195-197.
11
12
13 [23] Council of Europe. 1997. *European pharmacopoeia*. 1st ed. Council of Europe, Strasbourg.
14
15 [24] Jennings. W., and T. Shibamoto. 1980. Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles
16 by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press: New york.
17
18 [25] Konig, W., D. Hochmuth, and D. Joulain. 2001. Terpenoids and related constituents of essential
19 oils. (library of mass finder 2.1 ed.). Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
20
21
22 [26] McLafferty, F., and D. Stauffer. 1988. The Wiley/NBS registry of mass spectra data, *Wiley-*
23 *Interscience*. New york.
24
25
26 [27] Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, Zellner BA, Costa R, Rubiolo P
27 (2008) Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Frag J* 23:382–391
28
29 [28] Djabou, N., S. Andreani, L. Varesi, F. Tomi, J. Costa, and A. Muselli. 2013. Analysis of the
30 volatile fraction of *Teucrium marum* L. *Flavour Fragr. J.* 28(1):14-24.
31
32
33 [29] Brereton, R. 2003. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant, first edn*,
34 Wiley Interscience. New york.
35
36
37 [30] Massart, D. 1998. *Chemometrics: a textbook*, Elsevier Science Ltd. New york.
38
39
40 [31] Vichi, S., J. M. Guadayol, J. Caixach, E. López-Tamames, and S. Buxaderas. 2007. Comparative
41 study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma. *Food Chem.*
42 105(3):1171-1178.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Data of previous chemical investigations of essential oils of *A. maritimus* and *A. spinosus*

Species	Origins	References	Parts	Main components
<i>Asteriscus maritimus</i>	Italy	[9]	Aerial Parts	myrtenyl acetate (44.2 %), terphenyl (17.5 %), (Z)- β -farnesene (12.9 %), myrtenol (5.0%) and terpinen-4-ol (4.5 %)
	Spain	[4]	flowers	β -phellandrene (11.8%), fonenol (10.9%), α -phellandrene (10.0%), α -pinene (9%) and p-cymene (7.3%)
			stems and leaves	α -pinene (27.5%), p-cymene (10%), β -phellandrene (8.3%), α -phellandrene (7.2%) and fonenol (5.6%)
	Tunisia	[7]	roots	Tetradecanol (12.2 %), α -ylangene (8.3 %), caryophyllene alcohol (8.3 %), hexadecyl acetate (7.0 %) and hexyl benzoate (4.5 %)
	Tunisia	[8]	flowers	β -eudesmol (24.25%), Menthyl acetate (17.03%), pentadecanal (15.38%) and M-cymene (9.34%)
			leaves	Hexadecanoic acid (30.35%), γ -eudesmol (14.99%), (E,Z)-farnesol (11.99%) and α -bisabolol (4.31%)
			stems	Hexadecanoic acid (49.8%), phytol (15.57%), 1-heneicosene (6.53%) and γ -eudesmol (4.45%)
<i>Asteriscus spinosus</i>	Jordan	[21]	Aerial Parts	α -cadinol (19.26%), δ -cadinene (13.93%), α -muurolol (12.88%) and germacra-1(10),5-dien-3,4-diol (8.41%)
	Jordan	[16]	flowers	Acorenone B (33.85%), α -muurolol (21.93%), α -cadinol (8.54%), Oplopanonyl acetate (7.22%), Germacrene D-4-ol (4.95%) and δ -cadinene (4.95%)
			leaves	α -cadinol (13.5%), Acorenone B (9.64%), α -muurolol (9.83%), β -longipinene (6.26%) and δ -cadinene (9.79%)
	Italy	[22]	Aerial Parts	Germacra-1(10),5-dien-3,4-diol (18.4%), α -cadinol (14.1%), 3-acetoxygermacra-1(10),5-dien-4-ol (13.0%), T-cadinol (8.2%) and δ -cadinene (5.8%)

Table 2: Geographical distribution of *Asteriscus* (AM *A. maritimus* and AS *A. spinosus*) species from western Algeria

Species	codes	N° Voucher	Localities	GPS Coordinates	Yields	Alt
<i>Asteriscus maritimus</i>	AMS1	AM-1011-F1	Sidi youchaa	35°06'55"N; 1°46'37"O	0,04	54
	AMS2	AM-1011-F2	Wad halouf	35°21'45"N; 1°16'26"O	0,02	28
	AMS3	AM-1011-F3	Egla	35°12'04"N; 1°38'18"O	0,06	116
	AMS4	AM-1011-F4	Plage malouz	34°14'28"N; 1°34'25"O	0,07	41
	AMS5	AM-1011-F5	Beni achir	34°37'01"N; 1°35'00"O	0,09	1162
	AMS6	AM-1011-F6	Wlad azzouz	34°52'15"N ; 1°38'8"O	0,12	141
	AMS7	AM-1011-F7	Rechgoune	35°17'46"N; 1°27'46"O	0,04	71
	AMS8	AM-1011-F8	Beni saf	35°16'02"N; 1°22'27"O	0,06	257
<i>Asteriscus spinosus</i>	ASS1	AS-1012-F1	Henaya	34°56'54"N; 1°22'15"O	0,08	426
	ASS2	AS-1012-F2	Ain kebira 1	35°01'49"N; 1°22'42"O	0,07	621
	ASS3	AS-1012-F3	Ain kebira 2	35°01'32"N; 1°41'01"O	0,09	726
	ASS4	AS-1012-F4	Boujlida	34°55'04"N; 1°20'40"O	0,03	612
	ASS5	AS-1012-F5	Beni achir	34°36'43"N; 1°35'14"O	0,02	1277
	ASS6	AS-1012-F6	Egla	35°12'03"N; 1°38'24"O	0,17	126
	ASS7	AS-1012-F7	Sidi wchaa	35°06'44"N; 1°46'46"O	0,05	41
	ASS8	AS-1012-F8	El fahs	34°39'33"N; 1°32'26"O	0,08	791
	ASS9	AS-1012-F9	Sidi bellabas	35°12'11"N; 0°37'52"O	0,02	471
	ASS10	AS-1012-F10	Zenata	34°59'04"N; 1°27'33"O	0,09	286

a Sampler codes, b Voucher codes, c Harvest localities, d Sample positioning, e Yields % (w/w), f Altitudes (m)

Table 3: Chemical composition of *A. spinosus* and *A. maritimus* essential oils

No	Compound ^a	<i>Asteriscus spinosus</i> (AS) ^c														<i>Asteriscus maritimus</i> (AM) ^c								Identification	
		IRIa ^b	RIa ^c	RIp ^d	CO1	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	CO2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7		S8
1	3-Hexen-1-ol	831	835	1380	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1										RI, MS
2	α -Thujene	922	924	1023	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr										RI, MS
3	α -Pinene	931	932	1022	1	1,0	0,9	1,5	0,1	tr	0,8	0,9	1,2	1,0	1,0	7,7	10,5	5,7	2,8	3,8	13,9	12,1	5,3	7,8	RI, MS
4	Camphene	943	944	1066												0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	RI, MS
5	Sabinene	964	966	1120												0,2	0,3	0,2	tr	0,2	0,2	tr	tr	tr	RI, MS
6	β -Pinene	970	973	1110	12,9	14,2	14,5	17,6	13,2	17,1	15,1	12,9	13,2	16,2	15,0	0,4	0,7	0,2	tr	0,6	0,7	tr	tr	0,3	RI, MS
7	Myrcene	976	982	1159	2	0,2	0,3	0,3	2,9	tr	0,4	1,9	0,3	0,2	2,5	0,5	0,7	0,5	0,1	0,6	0,5	0,1	0,1	0,3	RI, MS
8	α -Phellandrene	997	1000	1164	3,9	3,7	4,2	3,6	0,1	0,5	3,3	4,1	3,2	0,9	2,2	3,0	3,1	1,2	3,5	3,2	0,9	1,1	0,4	0,1	RI, MS
9	p-Cymene	1011	1014	1268	1,2	1,7	2,0	2,2	1,1	tr	1,1	0,9	2,1	3,4	4,1	22,1	23,8	29,8	15,1	30,0	19,4	26,4	24,4	19,1	RI, MS
10	Limonene	1020	1023	1199	0,4	0,7	0,7	0,8	0,2	tr	0,6	tr	0,5	0,7	0,8	1,0	0,6	1,2	0,1	1,1	0,4	1,1	0,2	tr	RI, MS
11	Z- β -Ocimene	1024	1027	1230												tr	0,8	tr	tr	0,6	tr	0,1	0,7	tr	RI, MS
12	E- β -Ocimene	1034	1038	1247	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,7	0,8	tr	tr	0,6	tr	0,1	0,7	tr	RI, MS
13	γ -Terpinene	1047	1050	1243	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	RI, MS
14	Octanol	1054	1054													tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	RI, MS
15	p-Cymenene	1074	1075													tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	RI, MS
16	Terpinolene	1080	1078	1280	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	tr	0,1	0,2	0,2	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,4	RI, MS
17	Nonanal	1083	1083	1394	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,2		RI, MS
18	Linalol	1081	1085	1544	1,5	0,1	0,1	0,1	1,8	1,9	1,5	0,2	1,6	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	tr	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	RI, MS
19	Chrysanthenone	1101	1102	1499												tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	RI, MS
20	α -Campholenal	1105	1106	1481												tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	RI, MS
21	cis-p-menth-2-en-1-ol	1108	1108	1108												tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	0,1	RI, MS
22	Camphor	1123	1124	1517												tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	RI, MS
23	trans-p-Menth-2-ene-1-ol	1123	1123													tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	RI, MS
24	trans-Pinocarveol	1125	1127	1656	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	tr	tr	tr	tr		RI, MS
25	cis-Verbenol	1127	1130	1655												0,1	0,2	0,1	tr	0,1	0,2	0,1	tr	0,2	RI, MS
26	Citronellal	1131	1134	1479												0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	RI, MS
27	Pinocarvone	1136	1136	1644	0,1	tr	0,2	tr	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	tr	tr	tr	tr		RI, MS
28	iso-Menthone	1143	1147	1490												0,2	tr	0,2	tr	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	RI, MS
29	Borneol	1148	1151	1780												0,2	0,3	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	RI, MS
30	Lyratol	1150	1156	1780												tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	RI, MS
31	Umbellulone	1150	1153	1644	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr		RI, MS
32	Albene	1155	1158	1284												0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	RI, MS
33	Terpinen-4-ol	1161	1161	1600												tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	RI, MS
34	Cryptone	1157	1163	1667												0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	tr	RI, MS
35	p-Cymen-8-ol	1161	1169	1833												tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	RI, MS

apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%).^f RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library except compounds 41, 46, 62, 67, 69, 88, 95 and 124.

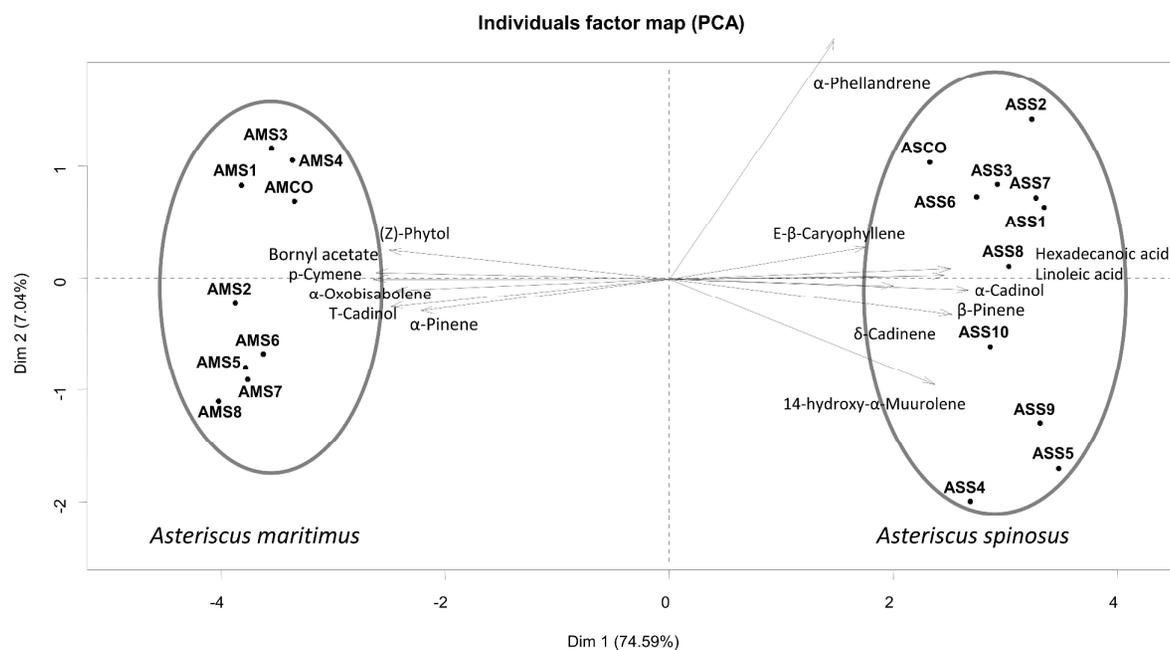


Figure 1: PCA of chemical compositions of both *Asteriscus* essential oils species. Distribution of variables (major of compounds corresponding to those of Table 3 and distribution of samples (coding numbers of locations)

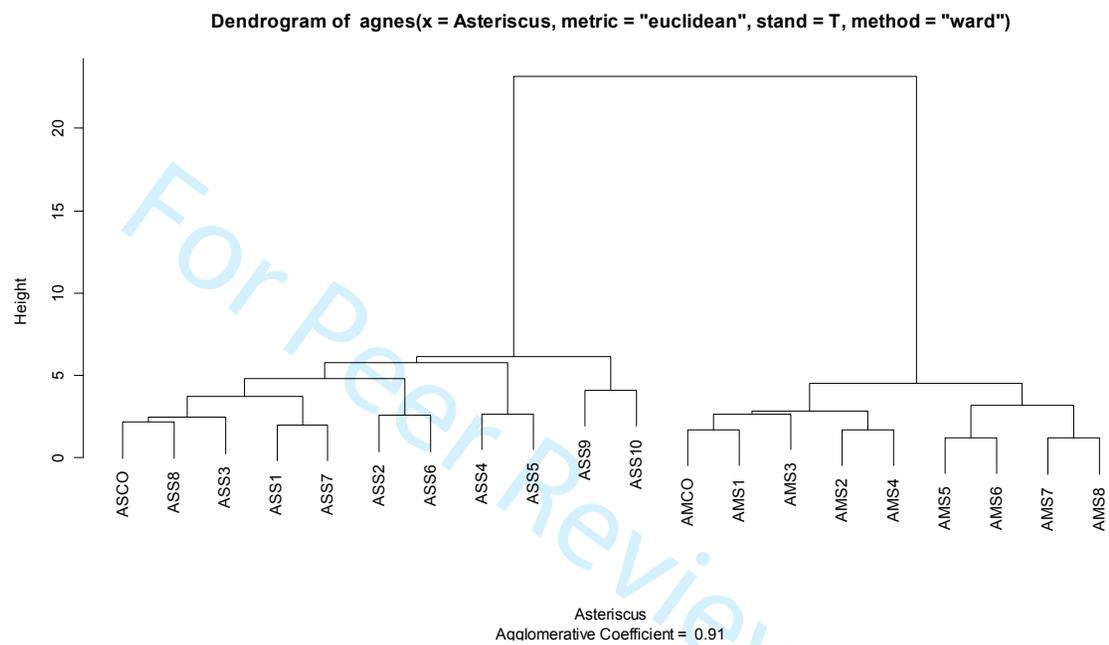


Figure 2: CA of chemical compositions of *A. maritimus* and *A. spinosus* essential oils from western Algeria

ملخص

الزيوت الأساسية هي منتجات طبيعية ذات قيمة مضافة عالية، فهي تستخدم من ناحية لخصائصها العطرية، في قطاع مستحضرات التجميل والعطور، ومن ناحية أخرى لخصائصها الطبية. الزيوت الأساسية ذات تركيب كيميائي معقد جدا. فإنها تقدم أحيانا ما يصل إلى عدة مئات من الجزيئات العطرية النشطة، والتي توجد في نسب مختلفة والتي تتطلب تنفيذ أحدث أساليب التحضير والتحليل.

يستند هذا البحث إلى دراسة التقلب الكيميائي لبعض الأنواع المشتركة بين الجزائر والعالم، من أجل إنشاء دراسات مقارنة، ولكن أيضا الأنواع المتوطنة من المنطقة الغربية من الجزائر والتي تدرس لأول مرة، لتحديد تركيباتها. والكشف عن أي خصوصية التي قد تميز تركيبها الكيميائي، وتهم العالم الصناعي. الهدف من هذه الدراسة يتركز من جهة في المساهمة في تطوير المعلومات الخاصة بالثروة النباتية، ويتعلق من جهة أخرى بدراسة اقتصادية عن الفائدة التي يمكن أن تجلبها تنمية بعض الأنواع المدروسة في هذه الأطروحة على النطاق الصناعي لخلق القيمة المضافة الاجتماعية والاقتصادية.

Résumé

Les huiles essentielles sont des produits naturels à forte valeur ajoutée, elles sont utilisées, d'une part pour leurs propriétés odorantes, dans le secteur des cosmétiques et parfums, et d'autre part pour leurs propriétés médicinales. Les huiles essentielles sont d'une composition chimique très complexe; elles proposent parfois jusqu'à plusieurs centaines de molécules aromatiques actives, qui se trouvent en proportions variables et qui nécessitent la mise en œuvre des méthodes de préparations et d'analyses les plus modernes.

Ce travail de thèse, repose sur l'étude de la variabilité chimique de certaines espèces communes à l'Algérie et dans le monde, afin d'établir des études comparatives, mais aussi des espèces endémiques de la région Ouest de l'Algérie, jamais décrites dans la littérature, afin d'identifier leurs compositions chimiques et de déceler toute spécificité pouvant caractériser leurs compositions chimiques et ainsi intéresser le monde industriel. Pour cela différents volets ont été développés : le principal volet est chimique, il concerne la caractérisation des compositions chimiques des huiles essentielles, et les deux autres volets sont complémentaires, un volet d'activités biologiques, et un volet sur l'étude économique qui montre l'importance ou l'utilité que peut apporter le développement de certaines des espèces étudiées dans cette thèse à l'échelle industrielle afin de créer de la plus-value socio-économique.

Abstract

Essential oils are natural products with high added value; they are used, on the one hand for their fragrant properties, in the cosmetics and perfumes sector, and on the other hand for their medicinal properties. Essential oils have a very complex chemical composition; they sometimes offer up to several hundred active aromatic molecules, which are found in varying proportions and which requires the use of the most modern methods of preparation and analysis.

This work is based on the study of the chemical variability of certain species common to Algeria and the world, in order to establish comparative studies, but also endemic species of the western region of Algeria, never described in the literature, and that in order to identify their compositions and to detect any specificity that can characterize their chemical compositions and thus interest the industrial world. For different components have been developed: the main component is chemical, it concerns the characterization of the chemical compositions of essential oils, and the other two components are complementary, a component of biological activities, and the last part concerns an economic study that the importance or usefulness that the development of some of the species studied in this work can bring to the industrial scale to create socio-economic added value.