

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire
« Laboratoire des Produits Naturels (Laprona) »

THESE

Pour l'obtention d'un Doctorat en
Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : **Biochimie**

Présentée par : **M^{me} BEKHECHI Chahrazed**

Thème

**Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques
de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN ¹³C
et étude de leur pouvoir antibactérien**

Soutenue le : **20/11/2008**, devant le jury composé de :

Président :	M^r TALEB BENDIAB S. A.	Professeur	U. de Tlemcen
Invité :	M^r CASANOVA J.	Professeur	U. de Corse
Examineurs :	M^r GUERMOUCHE M. H.	Professeur	U.S.T.H.B. d'Alger
	M^r KIHHEL M.	Professeur	U. d'Oran
	M^r TOMI F.	Professeur	U. de Corse
Directeur de thèse :	M^{me} ATIK-BEKKARA F.	Professeur	U. de Tlemcen
Co-directeur :	M^r ABDELOUAHID D. E.	Maître de Conférences	U. de Tlemcen

Année universitaire : 2008 - 2009

« Le don d'une plante utile me paraît plus précieux que la découverte d'une mine d'or et d'un monument plus durable qu'une pyramide ».

Bernardin de Saint-Pierre (1737-1814)

Le jardin des pamplemousses,

Ile Maurice

Remerciements

Ce travail a été effectué en grande partie au laboratoire des « Produits Naturels » (Laprona) du département de Biologie, de la Faculté des Sciences, de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, sous la direction de Madame le Professeur Fewzia Atik-Bekkara et Monsieur Djamel Eddine Abdelouahid, comme co-directeur ; et au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, sous la direction de Monsieur le Professeur Félix Tomi.

A Madame Fewzia Atik-Bekkara, Professeur et Chef d'équipe « Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) », au laboratoire des « Produits Naturels » de l'Université de Tlemcen, j'exprime ma profonde reconnaissance et gratitude tant pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de cette thèse. Ses conseils et encouragements m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je veux exprimer à Monsieur Djamel Eddine Abdelouahid, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, ma très vive reconnaissance et ma gratitude pour sa collaboration, son encadrement et pour avoir veillé au bon déroulement de ce travail.

Je veux exprimer mes vifs remerciements à Monsieur Joseph Casanova, Directeur du laboratoire « Systèmes Physiques de l'environnement », équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse au CNRS (UMR 6134), pour son accueil au sein de son laboratoire et ma profonde gratitude pour sa collaboration et sa confiance qu'il m'a accordée.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur Félix Tomi, Professeur à l'Université de Corse, pour sa collaboration, sa disponibilité et à l'attention particulière qu'il a accordée à mon travail. Ses conseils, ses recommandations et son aide durant mon stage au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse », ont permis à l'aboutissement d'une bonne partie de cette étude. Il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir aidée tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa participation au jury est un honneur pour moi.

Je tiens également à remercier le reste des membres de l'équipe « Chimie et Biomasse », spécialement Kai Lu pour sa disponibilité et sa précieuse aide.

Je réjouis également que Monsieur le Professeur Sid Ahmed Taleb Bendiab, directeur du laboratoire des « Produits Naturels » ait consenti à participer à cette commission d'examen et à présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma considération et mes vifs remerciements.

Que Monsieur le Professeur Moulay Hassen Guermouche de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumédiène-Alger, trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'apporter un regard critique sur ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur Mebrouk Kihel, Professeur à l'Université d'Oran, pour avoir accepté de participer à ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie vivement Monsieur Abdellah Moussaoui, Maître de Conférences à l'Université de Béchar et Monsieur Ali Mansri, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir aidé et accueilli dans leur laboratoire.

Mes remerciements vont à l'endroit de Monsieur Djamel Benmansour, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, pour ses conseils et son aide précieuse pour le traitement statistique des données concernant le pouvoir antibactérien des huiles essentielles des plantes étudiées. Ce fut un grand plaisir de travailler avec lui.

Mes vifs remerciements vont à l'égard de Monsieur le Professeur Mohamed Bouazza (laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels), pour ses conseils, son accueil dans son laboratoire et pour m'avoir aidé à identifier les espèces végétales étudiées.

J'adresse aussi mes remerciements les plus vifs à Monsieur Noury Benabadji, Professeur à l'Université de Tlemcen et Monsieur Hamza Bouabdellah, chargé de cours à l'Université de Tlemcen pour leur aide et leur accueil dans leur laboratoire.

Je tiens également à remercier Monsieur Slimane Amel et Monsieur Abdelkader Dahmani pour leur aide précieuse, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

Enfin, ma profonde gratitude va à l'égard de toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Résumé

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen, nous nous sommes proposés de déterminer la composition chimique et le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de six espèces végétales : *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoïdes verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* (L.) et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq., qui font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique traditionnel de la population locale.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques (CPG-Ir, CC, CPG-SM et RMN ¹³C, méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse).

L'étude détaillée des huiles essentielles de *Ziziphora hispanica*, est caractérisée par une prédominance de monoterpènes oxygénés possédant un squelette du type *p*-menthane en position C-3, à savoir la pulégone (77,6 – 79,5%) qui est le composé majoritaire. Les cinq échantillons de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, présentent une composition chimique homogène et stable dominée par le carvacrol (66,7 – 69,5%). Ces huiles essentielles sont très riches en monoterpènes, soit 24 sur 28 composés identifiés. Les cinq échantillons d'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* analysés, sont quantitativement et qualitativement très proches. Douze composés ont été identifiés dans ces huiles essentielles avec du thymol comme composé majoritaire (41,0 et 48,8%). Les huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata*, de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* sont caractérisées par une abondance de monoterpènes oxygénés. Le thymol (48,7 à 51,6%) est le composé majoritaire dans l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*. Celle de *Mentha pulegium* est riche en pulégone et en menthone. Ces derniers représentent respectivement 62,7 à 78,0% et 7,7 à 23,1%, soit environ 85,7 à 86,7%. Au total 17 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, dominés par la pulégone (33,3 – 35,5%), suivi de l'isomenthone (17,2 – 24,1%).

Concernant le pouvoir antibactérien des produits naturels de ces plantes sur des souches de référence et celle d'origine hospitalière, l'huile essentielle de *Satureja calamintha* s'est révélée plus active sur la majorité des bactéries par rapport à celles de *Mentha pulegium* et de *Ziziphora hispanica* qui possèdent une action contre seulement les Staphylocoques, l'*E. coli* de référence et la Salmonelle. Pour les autres huiles essentielles à activité antibactérienne considérable, nous avons déterminé trois paramètres : CMI, CMB et QMI. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste la plus efficace. Néanmoins, on peut qualifier les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, d'être active sur la quasi-totalité des bactéries testées. Les souches *Staphylococcus aureus*, *E. coli* de référence et la *Salmonella typhi* sont les plus sensibles vis-à-vis de ces produits. Par contre les souches *Pseudomonas aeruginosa* se sont révélées très résistantes. Les CMBs obtenues en présence du Tween 80 sont nettement supérieures à celles obtenues en présence de l'agar ou de l'éthanol.

Mots clés : Huiles essentielles, RMN ¹³C, CPG-Ir, CPG-SM, Pouvoir antibactérien, CMI, CMB, QMI, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoïdes verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* (L.) et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq..

Abstract

As part of the recovery of aromatic plants growing wild in Tlemcen region, we proposed to determine the chemical composition and the antibacterial activity of essential oils of six plant species: *Thymus fontanesii* Boiss. and Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoïdes verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* L. and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* L. Briq. which are an integral part of the traditional therapeutic arsenal of the local population.

The determination of the chemical composition of essential oils has been carried by combination of several chromatographic and spectroscopic methods (GC-RI, CC, GC-MS and ^{13}C NMR, a method established and developed by the team « Chimie et Biomasse » of the University of Corsica.

The detailed study of the essential oils of *Ziziphora hispanica*, is characterized by a predominance of C-3 oxygenated *p*-menthane derivatives, namely pulégone (77,6 – 79,5%) by far the major component. The five samples of the essential oil of *Thymus fontanesii*, present a uniform and stable chemical composition dominated by the carvacrol (66,7 – 69,5%). These essential oils are very rich in monoterpenes. The five samples of essential oil of *Origanum glandulosum* analyzed are quantitatively and qualitatively very similar. Twelve compounds were identified in these essential oils with thymol as major component (41,0 and 48,8%). The essential oils of *Ammoïdes verticillata*, *Mentha pulegium* and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* were characterized by abundance of oxygenate monoterpenes. The thymol (48,7 to 51,6%) is the major component of essential oil of *Ammoïdes verticillata*. The one of *Mentha pulegium* is rich on pulégone and menthone. Those latter's represented respectively 62,7 to 78,0% and 7,7 to 23,1%, so about 85,7 to 86,7%. In total, 21 components were identified on essential oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, dominated by pulégone (33,3 – 35,5%), followed by isomenthone (17,2 – 24,1%).

Concerning antibacterial activity of natural products of these plants against on reference strains and bacterial strains isolated from clinical, the essential oil of *Satureja calamintha* has been more active on the majority of bacteria compared to the oil of *Mentha pulegium* and *Ziziphora hispanica* who have only activity against the staphylococcus, the reference *E. coli* and Salmonella. For other essential oils which have a considerable antibacterial activity, we have determined three parameters: CMI, CMB and QMI. The essential oil of *Thymus fontanesii* remains the most effective. Nevertheless, we can describe the essential oils of *Origanum glandulosum* and *Ammoïdes verticillata*, to be active in almost all bacteria tested. The strains *Staphylococcus aureus*, reference *E. coli* and *Salmonella typhi* are more susceptible to the action of these products. However *Pseudomonas aeruginosa* strains have proved to be very resistant. The MLC for different bacterial species in presence of Tween 80 were significantly higher than those observed in presence of agar or ethanol.

Keywords: Essential oils, ^{13}C NMR, GC-RI, GC-MS, Antibacterial activity, MIC, MLC, MIQ, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoïdes verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* L. and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq..

ملخص

في إطار تقييم النباتات العطرية البرية لمنطقة تلمسان، اقترح تحديد التركيب الكيميائي ودراسة القدرة المضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية لستة أصناف من النباتات: *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.، *Origanum glandulosum* Desf.، *Ammoïdes verticillata* Desf.، *Ziziphora hispanica* L.، *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. et *Mentha pulegium* (L.) الذين يعتبرون كجزء لا يتجزأ من الترسنة العلاجية التقليدية لسكان المنطقة.

لقد تم تحديد البنية الكيميائية للزيوت الأساسية، عن طريق التطبيق المشترك لعدة طرق كروماتوغرافية وطيفية (CPG-SM، CC، CPG-Ir، ^{13}C RMN التي هي طريقة وضعت و طورت من فريق الكيمياء و الكتلة الحيوية" لجامعة كورسيكا).

الدراسة التفصيلية للزيوت الأساسية لنبته *Ziziphora hispanica*، تميزت بسيادة أحاديات التربين المؤكسجنة التي تحتوي على هيكل من نوع *p*-menthane في الوضعية C-3، حيث أن البلقون (6،77-79.5%) كان المركب السائد. أظهرت الخمس العينات من الزيوت الأساسية لنبات *Thymus fontanesii* تركيبة كيميائية متجانسة و ثابتة مع سيادة الكرفكرول (66.7% - 69.5%). هذه الزيوت الأساسية جد غنية بأحاديات التربين، حوالي 24 من 28 مركب الذي تم التعرف عليها. كانت الخمس العينات المحللة للزيوت الطيارة لنبته *Origanum glandulosum* جد متقاربة نوعيا و كيميا. تم التعرف على اثنا عشر مركبا في هذه الزيوت مع سيادة التمول (41.0% - 48.8%). الزيوت الأساسية للنباتات *Ammoïdes verticillata*، *Mentha pulegium* و *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* هي جد غنية بأحاديات التربين. التمول (48.7% - 51.6%) هو المركب السائد للزيت الأساسي ل *Ammoïdes verticillata*. الزيوت الطيارة ل *Mentha pulegium* هي غنية بالبلقون و المنطون. هذان الأخيران يمثلان: (62،7-78،0%) و (7،7 - 23،1%) على الترتيب، أي حوالي 85،7 إلى 86،7% من التركيبة الكيميائية الإجمالية. في المجموع 21 مركبا تم التعرف عليها في زيت *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* مع وفرة البلقون (33.3% - 35.5%)، متبوع بمركب الإزمتون (17.2% - 24.1%)

فيما يخص القدرة المضادة للبكتيريا للمواد الطبيعية لهذه النباتات على السلالات المرجعية و أخرى ذات مصدر استشفائي، أتضح أن الزيت الأساسي ل *Satureja calamintha* أكثر نشاطا على أغلبية البكتيريا مقارنة بزيوت *Mentha pulegium* و *Ziziphora hispanica* و اللذان يمتلكان نشاطا محصورا إلا على *Staphylocoques*، *Salmonelle* و العينة المرجعية ل *E. coli*. فيما يخص الزيوت الأخرى و التي لها نشاطا مضادا كبيرا للبكتيريا، لقد قمنا بتحديد ثلاثة عوامل: CMI، CMB، QMI. الزيت الأساسي ل *Thymus fontanesii* يبقى الأكثر فعالية. و مع ذلك يمكننا وصف الزيوت الطيارة ل *Origanum glandulosum* و *Ammoïdes verticillata* بأنها نشيطة على جميع البكتيريا المجربة. السلالات *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* و المرجعية ل *E. coli* هم الأكثر حساسية لهذه المواد. بالعكس إن السلالات *Pseudomonas aeruginosa* أثبتت أنها جد مقاومة لهذه الزيوت الأساسية. إن CMBs المحصل عليها بوجود التوين 80 هم أعلى و بوضوح من CMBs المحصل عليها بوجود الأغار أو الإيتانول.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية، ^{13}C RMN، CPG-Ir، CPG/SM، القدرة المضادة للبكتيريا، CMI، CMB، QMI، *Ziziphora hispanica* L.، *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut.، *Origanum glandulosum* Desf.، *Ammoïdes verticillata* Desf.، *Mentha pulegium* (L.)، *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.

Table des matières

Introduction	1
Première partie : Synthèse Bibliographique	5
Chapitre I : Synthèse Bibliographique des différentes plantes étudiées	6
I.1. <i>Ziziphora hispanica</i>	6
I.1.1. Présentation de la plante	6
I.1.2. Description botanique	
I.1.2.1. Caractères botaniques	7
I.1.2.2. Systématique de <i>Ziziphora hispanica</i>	7
I.1.3. Propriétés thérapeutiques	7
I.1.4. Composition chimique	8
I.2. <i>Thymus fontanesii</i>	9
I.2.1. Présentation de la plante	9
I.2.2. Description botanique	10
I.2.2.1. Caractères botaniques	10
I.2.2.2. Systématique de <i>Thymus fontanesii</i>	11
I.2.3. Propriétés thérapeutiques	11
I.2.4. Composition chimique	12
I.3. <i>Origanum glandulosum</i>	13
I.3.1. Présentation de la plante	13
I.3.2. Description botanique	15
I.3.2.1. Caractères botaniques	15
I.3.2.2. Systématique d' <i>Origanum glandulosum</i>	15
I.3.3. Propriétés thérapeutiques	16
I.3.4. Composition chimique	16
I.4. <i>Ammoïdes verticillata</i>	18
I.4.1. Présentation de la plante	18
I.4.2. Description botanique	19
I.4.2.1. Caractères botaniques	19
I.4.2.2. Systématique d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	19
I.4.3. Propriétés thérapeutiques	20
I.4.4. Composition chimique	22

I.5. <i>Mentha pulegium</i>	26
I.5.1. Présentation de la plante	26
I.5.2. Description botanique	26
I.5.2.1. Caractères botaniques	26
I.5.2.2. Systématique de <i>Mentha pulegium</i>	27
I.5.3. Propriétés thérapeutiques	27
I.5.4. Composition chimique	28
I.6. <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>Nepeta</i>	31
I.6.1. Présentation de la plante	31
I.6.2. Description botanique	32
I.6.2.1. Caractères botaniques	32
I.6.2.2. Systématique de <i>Satureja calamintha</i>	33
I.6.3. Propriétés thérapeutiques de cette plante	33
I.6.4. Composition chimique	33
Chapitre II : Techniques d'analyse des huiles essentielles	37
II.1. Identification des constituants d'un mélange complexe	37
II.1.1. Méthodes d'analyse par couplage (chromatographie – spectroscopie) : Voie A	40
II.1.2. Identification des constituants après purification : Voie B	41
II.1.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable : Voie C	42
II.1.3.1. Intérêt de la RMN du carbone-13	43
II.1.3.1.1. Identification des constituants en mélange	43
II.1.3.1.2. Observation et individualisation des signaux	44
II.1.3.2. Attribution des signaux	45
II.1.3.3. La méthode d'analyse développée au laboratoire par l'équipe « Chimie et Biomasse »	46
Chapitre III : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	52
III.1. Activité antibactérienne, Mécanismes d'action et résistance aux antibiotiques	52
III.1.1. Mécanismes de résistance	53
III.1.1.1. Mécanismes génétiques	53
III.1.1.2. Mécanismes biochimiques	53
III.2. Les huiles essentielles	54
III.2.1. Définition	54
III.2.2. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	54
III.2.2.1. En désinfection de l'air	54

III.2.2.2. En agroalimentaire	55
III.2.2.3. En traitement des infections	56
III.2.3. Mécanisme d'action des huiles essentielles	56
III.2.3.1. Mode d'action contre les bactéries	56
III.2.3.2. Mode d'action contre les champignons	57
Deuxième partie : Partie expérimentale	58
I. Introduction	59
II. Matériel végétal	60
II.1. Situations géographiques des stations d'étude	60
II.2. La récolte du matériel végétal	63
II.3. Identification botanique	63
II.4. Extraction des huiles essentielles par Hydrodistillation	63
III. Analyses des huiles essentielles	64
III.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	64
III.1.1. Conditions opératoires	64
III.1.2. Identification des constituants	64
III.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	65
III.2.1. Conditions opératoires	65
III.2.2. Identification des constituants	65
III.3. Analyse par spectroscopie de la résonance magnétique du carbone 13 (RMN ¹³ C)	66
III.3.1. Conditions opératoires	66
III.3.2. Identification des constituants	66
III.4. Fractionnement de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	66
IV. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes espèces végétales	68
IV.1. Provenance des germes étudiés	68
IV.2. Vérification de la purification des bactéries et identification des souches d'origine hospitalière	69
IV.2.1. Identification des bactéries	70
IV.2.1.1. Caractères étudiés	70
IV.3. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes	

espèces végétales	71
IV.3.1. Méthode de diffusion par disque (Aromatogramme)	71
IV.3.2. Méthode de contact direct en milieu gélosé	71
IV.3.2.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	72
IV.3.3. Méthode de contact direct en milieu liquide (Technique de Maruzzella)	73
IV.3.2.1. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMBs)	73
IV.3.4. Méthode de microatmosphère	75
IV.4. Préparation des inoculums	76
V. Etude statistique	76
Troisième partie : Résultats et discussion	77
I. Caractères organoleptiques	78
II. Rendements en huiles essentielles des différentes plantes	78
III. Analyse des huiles essentielles des différentes plantes	81
III.1. Analyse de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	81
III.2. Analyse de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	92
III.3. Analyse de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	98
III.4. Analyse de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	102
III.5. Analyse des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> et de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>Nepeta</i>	107
IV. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes	117
IV.1. Identification des bactéries d'origine hospitalière	119
IV.2. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes	122
IV.2.1. Détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion par disque (aromatogramme)	122
IV.2.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu gélosé et détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	128
IV.2.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu liquide et détermination des concentrations minimales bactéricides (CMBs)	133
IV.2.4. Activité antibactérienne de la phase volatile des huiles essentielles et détermination des quantités minimales inhibitrices (QMI)	139
V. Etude statistique	148
V.1. Méthode de l'aromatogramme	148
V.2. Méthode de contact direct en milieu gélosé	152
V.3. Méthode de contact direct en milieu liquide	155

V.4. Méthode de microatmosphère	167
Conclusion	172
Références bibliographiques	180
Annexes	206
Publications	

Table des illustrations

Liste des tableaux

Tableau (1) : Composé majoritaire des huiles essentielles des différentes espèces du genre <i>Ziziphora</i>	9
Tableau (2) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	13
Tableau (3) : Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Origanum gladulosum</i>	17
Tableau (4) : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur la plante <i>Ammoïdes verticillata</i>	21
Tableau (5) : Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles entre la partie aérienne et les graines d'Ajowan	23
Tableau (6) : Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle d'Ajowan extraite par Co ₂ supercritique et par hydrodistillation	24
Tableau (7) : Composition de l'huile essentielle de <i>Trachyspermum copticum</i> (L.) Link	24
Tableau (8) : Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	25
Tableau (9) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	29
Tableau (10) : Composition chimique de l'huile essentielle <i>Mentha pulegium</i>	30
Tableau (11) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i>	34
Tableau (12) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> (L.) Savi subsp. <i>nepeta</i>	35
Tableau (13) : Provenance des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations	61
Tableau (14) : Fractionnement de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	67
Tableau (15) : Provenance des germes étudiés	69
Tableau (16) : Liste des tests étudiés au niveau des plaques API	70
Tableau (17) : Gamme de concentration (en µg/ml) des huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu gélosé	72
Tableau (18) : Gamme de concentration (en µg/ml) d'huile essentielle utilisées pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu gélosé	72

Tableau (19) : Gamme de concentration (en µg/ml) des huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu liquide	73
Tableau (20) : Gamme de concentration (en µg/ml) d'huile essentielle utilisées pour la détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu liquide	74
Tableau (21) : Caractéristiques organoleptiques des différentes espèces étudiées	78
Tableau (22) : Rendements (%) en huiles essentielles des différentes plantes	207
Tableau (23) : Etages bioclimatiques, altitude et rendements en huiles essentielles	79
Tableau (24) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	81
Tableau (25) : Fractionnement de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	83
Tableau (26) : Composés identifiés dans la première fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i> éluée avec le pentane	83
Tableau (27) : Composés identifiés dans la deuxième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i> éluée avec le mélange pentane/oxyde de diéthyle (95/5)	85
Tableau (28) : Composés identifiés dans la troisième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i> éluée avec de l'oxyde de diéthyle	87
Tableau (29) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	90
Tableau (30) : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	96
Tableau (31) : Teneurs des composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i>	97
Tableau (32) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de d'<i>Origanum glandulosum</i> des différentes stations	99
Tableau (33) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i>	103
Tableau (34) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	108
Tableau (35) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i>	112
Tableau (36) : Liste des bactéries utilisées pour l'étude de pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes	117
Tableau (37) : Caractères morphologiques et type respiratoire des différentes souches	120

Tableau (38) : Identification des entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par plaque API 20 E	121
Tableau (39) : Identification du <i>Staphylococcus aureus</i> par plaque API STAPH	121
Tableau (40) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles à composé majoritaire à pulégone relatives aux différentes souches selon la méthode de Vincent	123
Tableau (41) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles riches en phénols (thymol ou carvacrol) sur différentes souches selon la méthode de Vincent	208
Tableau (42) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> selon la méthode de contact direct	129
Tableau (43) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'<i>Origanum glandulosum</i> selon la méthode de contact direct	129
Tableau (44) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i> selon la méthode de contact direct	130
Tableau (45) : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	209
Tableau (46) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i> selon la méthode de Maruzzella	134
Tableau (47) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> et d'<i>Origanum glandulosum</i> selon la méthode de Maruzzella	135
Tableau (48) : Concentrations minimales bactéricides (CMB) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	210
Tableau (49) : Effet de la phase volatile des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance des bactéries	140
Tableau (50) : Quantité minimales inhibitrices (QMI) en µl des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	211
Tableau (51) : Rapport CMB/CMI des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	212

Liste des figures

Figure (1) : Les méthodes d'analyse d'un mélange complexe	39
Figure (2) : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone – 13	48
Figure (3) : Situation géographique des stations d'étude	62
Figure (4) : Rendements (%) en huiles essentielles des différentes plantes	78
Figure (5) : Spectre RMN ¹³ C de l'huile essentielle brute de <i>Ziziphora hispanica</i> (Z 1 2005)	82
Figure (6) : Spectre RMN ¹³ C de la première fraction l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	84
Figure (7) : Structure des composés identifiés par RMN ¹³ C dans la première fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	85
Figure (8) : Spectre RMN ¹³ C de la deuxième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	86
Figure (9) : Structure des composés identifiés par RMN ¹³ C dans la deuxième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	86
Figure (10) : Spectre RMN ¹³ C de la troisième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	87
Figure (11) : Structure des composés identifiés par RMN ¹³ C dans la troisième fraction de l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	88
Figure (12) : Structure des composés identifiés par CPG-SM dans l'huile essentielle de <i>Ziziphora hispanica</i>	89
Figure (13) : Spectre RMN ¹³ C de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> (échantillon de Remchi)	93
Figure (14) : Structure des composés identifiés par RMN ¹³ C dans l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	94
Figure (15) : Structure des composés identifiés par CPG-SM dans l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	95
Figure (16) : Spectre RMN ¹³ C de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i> (échantillon de Seb dou)	99
Figure (17) : Structure des monoterpènes identifiés par RMN ¹³ C dans l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	100

Figure (18) : Spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i> (échantillon récolté durant l'année 2004)	104
Figure (19) : Structure des monoterpènes identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i>	104
Figure (20) : Spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> (échantillon récolté durant l'année 2004)	109
Figure (21) : Structure des molécules identifiées par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	110
Figure (22) : Spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i> (échantillon récolté durant l'année 2005)	113
Figure (23) : Structures des molécules identifiées par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i>	114
Figure (24) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles riches en phénols (thymol ou carvacrol) relatives aux différentes souches selon la méthode de Vincent	126
Figure (25) : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	131
Figure (26) : Concentrations minimales bactéricides (CMB) en µg/ml de l'huile essentielle d'<i>Ammoïdes verticillata</i> en fonction des trois émulsifiants (Tween, agar, éthanol) relatives aux bactéries testées	136
Figure (27) : Concentrations minimales bactéricides (CMB) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testés	138
Figure (28) : Quantités minimales inhibitrices (QMI) en µl des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées	142

Liste des photos

Photo I : <i>Ziziphora hispanica</i>	6
Photo II : <i>Thymus fontanesii</i>	10
Photo III : <i>Origanum glandulosum</i>	14
Photo IV : <i>Ammoïdes verticillata</i>	18
Photo V : <i>Mentha pulegium</i>	26
Photo VI : <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i>	31
Photo VII : Aromatogramme : <i>E. coli</i> (E ₆) (HE d' <i>Origanum glandulosum</i>)	127
Photo VIII : Aromatogramme : <i>Staphylococcus aureus</i> (St ₃) (Huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>)	127
Photo IX : Contact direct : <i>E. coli</i> à la dilution 1/6 (Huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>)	133
Photo X : Contact direct : <i>E. coli</i> à la dilution 1/5 (Huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>)	133
Photo XI : Milieu liquide (huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i>) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	137
Photo XII : Milieu liquide : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₂) à la dilution 1/1,8 (huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i> en présence d'éthanol)	137
Photo XIII : Milieu liquide : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₂) à la dilution 1/1,7 (huile essentielle d' <i>Ammoïdes verticillata</i> en présence d'éthanol)	137
Photo XIV : Milieu liquide : <i>Enterobacter cloacae</i> à la dilution 1/25 (Huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>)	139
Photo XV : Milieu liquide : <i>Enterobacter cloacae</i> à la dilution 1/24 (Huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>)	139
Photo XVI : Microatmosphère : <i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₁) à la QMI 120 µl (Huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>)	141
Photo XVII : Microatmosphère : <i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₁) au niveau du témoin	141

Liste des annexes

Annexe I : Rendements en huiles essentielles des différentes plantes	207
Annexe II : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i> d' <i>Origanum glandulosum</i> et d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	208
Annexe III : Chromatogrammes enregistré par CPG sur colonnes apolaire et polaire des huiles essentielles des plantes étudiées	213

Abréviations

ATTC :	American type culture collection
A. :	Apiacées
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPGP :	Chromatographie en phase gazeuse préparative
HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance
CC :	Chromatographie sur colonne
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CMB :	Concentration minimale bactericide
°C :	Degré Celsius
FID :	Détecteur à ionisation de flamme
g :	Gramme
h :	Heure
HE :	Huile essentielle
IE :	Impact électronique
IK :	Indice de Kovats
Ir :	Indice de rétention
IRFT :	Infrarouge Transformé de Fourier
L :	Litre
L. :	Lamiacées
m :	Mètre
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
µm :	Micromètre
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
min :	Minute
OMS :	Organisation Mondiale de Santé
ppm :	Partie par million
w :	Poids
% :	Pourcentage
QMI :	Quantité minimale inhibitrice
RMN ¹H / ¹³C :	Résonance Magnétique Nucléaire du proton / du carbone

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Elles font partie de l'héritage traditionnel et médical de tous les peuples. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. Les plantes sont de véritables pharmacies naturelles que la nature a établie sur cette terre afin de vaincre la souffrance, prévenir les maux, voir les guérir et d'améliorer la santé des hommes (**Larousse, 2001 ; Beloued, 2001**).

Actuellement, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique car les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Larousse, 2001**). Le développement des techniques d'analyses chimiques a permis de révéler qu'une espèce végétale peut synthétiser des milliers de constituants chimiques différents, ceux-ci appartiennent à deux types de métabolisme : primaire et secondaire.

Le métabolisme secondaire, modelé par le temps et l'évolution, caractérise le profil chimique original de chaque espèce végétale, conduisant à une grande biodiversité moléculaire (**Wichtl et Anton, 1999**).

La pharmacologie utilise ces molécules car elles ont un effet spécifique sur d'autres organismes, parmi ces substances, les huiles essentielles qui caractérisent les plantes aromatiques (**Remmal et al, 1993**).

Aujourd'hui, les traitements par les plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérées comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries se sont peu à peu adaptées aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Essawi et Srour, 2000 ; Larousse, 2001**).

La résistance aux antibiotiques est devenue un grave problème de santé public touchant la quasi-totalité des agents antibactériens dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques perdent de leur efficacité et les maladies que l'on croyait éradiquées réapparaissent. Des bactéries autrefois sensibles développent donc des résistances à des médicaments jusque-là efficaces. Cette diminution de l'efficacité des moyens de lutte oblige donc à explorer de nouvelles pistes, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides.

La nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche d'un principe actif dans les produits naturels d'origine végétale, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, issues de plantes aromatiques qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies et pour améliorer santé et bien être.

En effet, les essences naturelles ont un pouvoir bactériostatique qu'elles doivent à leurs composés phénoliques, terpéniques et aussi dans une plus faible mesure, à leurs alcools et aldéhydes (Meyer et al., 1994).

L'Algérie est dotée d'un patrimoine floristique tout aussi riche que varié, notamment dans le domaine des plantes aromatiques. Cette richesse se doit aujourd'hui d'être exploitée, et plus particulièrement en ce qui concerne l'extraction des huiles essentielles vu l'importance économique qu'elles représentent du fait de leurs propriétés biologiques, thérapeutiques, odoriférantes....., de leur impact au niveau de l'environnement et de leurs multiples utilisations dans diverses industries (pharmaceutique, cosmétique et alimentaire).

Ainsi, dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à l'étude des plantes suivantes :

Ammoïdes verticillata, *Thymus fontanesii*, *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium*, *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* et *Ziziphora hispanica*. Ces plantes poussant à l'état spontané, sont très utilisées par la population locale et possédant principalement des propriétés antalgiques, anti-infectieuses et antispasmodiques. Les huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata*, d'*Origanum glandulosum* et de *Thymus fontanesii*, sont très riches phénols (thymol et carvacrol) (Kambouche et El-Abed, 2003, Sari et al., 2006 ; Kabouche et al., 2005) doués d'une activité antimicrobienne considérable (Burt, 2004). Les huiles essentielles de *Mentha pulegium*, de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* et de *Ziziphora hispanica* sont caractérisées par une prédominance en pulégone (Velasco Neguerela et Mata Rico, 1986 ; Daferera et al., 2003 ; Baldovini et al., 2000). A l'issue de ces appréciations, les huiles essentielles de ces plantes sont susceptibles d'avoir un intérêt industriel, de manière à pouvoir les commercialiser.

Par ailleurs, la caractérisation et la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, ont fait l'objet que de deux travaux, celui de Ghannadi et al., en 2004 et de Kabouche et al., en 2005.

Par contre, la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, a fait l'objet d'une seule étude, celle de Velasco Neguerela et Mata Rico en 1986.

Ainsi, le principal objectif visé durant ce travail, consiste à la contribution à une bonne connaissance de la composition chimique des huiles essentielles de ces espèces végétales et à l'étude de leur pouvoir antibactérien.

Dans la première partie de ce manuscrit, Nous avons commencé par une étude bibliographique qui comporte 3 chapitres. Dans le premier chapitre, nous rappelons la

description (les caractères botaniques et la systématique) des différentes espèces végétales, les propriétés thérapeutiques et les travaux déjà réalisés sur ces plantes. Dans le deuxième, chapitre, nous avons évoqué les principales techniques d'analyse des huiles essentielles et nous avons présenté la méthode d'analyse par RMN du carbone-13 mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse. Le dernier chapitre portera sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles, leurs utilisations dans différents domaines ainsi que leurs mécanismes d'action sur les microorganismes.

Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale ou nous présenterons les techniques utilisées dans ce travail et qui se déroule en deux axes :

Dans le premier axe, nous avons effectué une analyse chimique dont les étapes sont les suivantes :

- Obtention des huiles essentielles des différentes espèces végétales.
- Détermination de la composition chimique des huiles essentielles, par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques (CPG-Ir, CC, CPG-SM et RMN ¹³C pour l'analyse des mélanges, méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressées au pouvoir antibactérien des huiles essentielles de ces espèces végétales vis-à-vis de 18 souches bactériennes. Pour cela, nous avons évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles en effectuant plusieurs méthodes (aromatogramme, contact direct en milieu gélosé et en milieu liquide et microatmosphère).

Dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus concernant la caractérisation chimique des huiles essentielles des différentes espèces végétales, l'identification des bactéries et l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des différentes plantes.

Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Synthèse Bibliographique des différentes plantes étudiées

I.1. *Ziziphora hispanica*

I.1.1. Présentation de la plante

Ziziphora hispanica (L.) est une plante odorante qui appartient à la famille des Lamiacées. Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense, fraîche et pénétrante, rappelant celle de la menthe pouliot.

Selon les traditions iraniennes, la partie aérienne séchée de cette plante est fréquemment utilisée pour aromatiser les plats culinaires. Elle est considérée également bénéfique pour la santé (Sezik et Tumen, 1986 ; Zargari, 1995).



Photo I : *Ziziphora hispanica* (Anonyme I)

Noms vernaculaires :

- *En Français* :
 - Menthe pouliot des lieux secs (par traduction littérale de sa désignation en langue arabe) (Boullard, 2001).
- *En Arabe* :
 - Fliou

Nom scientifique :

- *Ziziphora hispanica* L. (Quézel et Santa, 1963).

I.1.2. Description botanique

Le genre *Ziziphora* regroupe 5 espèces qui poussent à l'état spontané en Turquie, Iraq, Afghanistan et partout en Iran. Ces espèces sont : *Ziziphora clinopodioides* Lam., *Ziziphora capitata* L., *Ziziphora persica* Bunge., *Ziziphora tenuior* L. et *Ziziphora taurica* Boiss. qui

regroupe 2 sous-espèces : *Z. taurica* subsp. *taurica* et *Z. taurica* subsp. *cleonioides* (**Rechinger, 1982; Baser, 2002**).

I.1.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Ziziphora*, appartenant à la famille des Lamiacées, est une petite plante annuelle. En Algérie, ce genre est représenté par 3 espèces : *Ziziphora capitata* L., *Ziziphora hispanica* L. et *Ziziphora tenuior* L. (Desf.) (**Quézel et Santa, 1963**).

L'espèce *Ziziphora hispanica* pousse spontanément dans les régions Ibéro-Mauritaniennes, au niveau des pelouses arides. Elle a des inflorescences spiciformes formées de verticillastres superposées pauciflores. Les feuilles, toutes semblables, sont ovales lancéolées et ciliées sur les marges (**Quézel et Santa, 1963**).

I.1.2.2. Systématique de *Ziziphora hispanica*

D'après **Quézel et Santa (1963)**, **Tutin (2001)**, et **Guignard et Dupont (2004)**, la classification qu'occupe *Ziziphora hispanica* dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Ziziphora</i>
Espèce :	<i>Ziziphora hispanica</i> L.

I.1.3. Propriétés thérapeutiques

Le *Ziziphora* est reconnue en médecine traditionnelle, pour ses activités antiseptique, apéritive et carminative (**Baytop, 1999**). Il est par conséquent indiqué pour ses propriétés antidiarrhéiques, antipyrétiques (**Ozel et al., 2005**), pour le traitement du rhume et de la toux (**Zargari, 1995**). En médecine traditionnelle, cette plante jouit d'une grande faveur populaire en Iran et en Turquie, son infusion est utile comme sédatif, carminatif et stomachique (**Ozturk et al., 1995**).

Enfin, **Meral et al. (2002)** ; **Salehi et al. (2005)**, rapportent que cette plante a plusieurs utilisations en phytothérapie et possède une activité antioxydante appropriée.

I.1.4. Composition chimique

L'analyse chimique des huiles essentielles des différentes espèces du genre *Ziziphora* a fait l'objet de très peu de travaux (Tableau 1), permettant d'avancer une prédominance de la pulégone :

Les premiers travaux ont été réalisés par **Sezik et al. (1991)**, qui rapportent que l'huile essentielle de *Z. tenuior* est caractérisée par une richesse en pulégone, de l'ordre de 87,1%.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Z. taurica* subsp. *cleonioides*, espèce endémique de Turquie, révèle des pourcentages élevés en pulégone (81,9%), suivi de limonène (4,5%) et de pipériténone (2,3%) (**Meral et al., 2002**).

D'autre part, **Salehi et al. (2005)**, rapportent que l'huile essentielle de *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*, poussant à l'état spontané en Iran, contient une forte teneur en pulégone (45,8%). D'autres composés sont également présents en quantités appréciables : la pipériténone (17,4%), le *p*-menth-3-en-8-ol (12,5%), le thymol (8,0%), le 1,8-cinéole (2,7%), le néo-menthol (2,1%), la menthone (1,8%), l'isomenthol (1,6%), le pipéritone (1,4%) et le germacrène D (1,1%).

En outre, les huiles essentielles de *Z. clinopodioides*, poussant à l'état spontané en Turquie, est caractérisée par une prédominance des composés suivants : le 1,8-cinéole (7,4%), le menthol (8,9%), le menthone (17,1%), l'isomenthone (8,0%) et la pulégone (33%) (**Schulz et al., 2005**).

Enfin, **Ozel et al. (2005)** ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle de *Z. taurica* subsp. *taurica*, récolté en Turquie. La pulégone est également le composé majoritaire avec une teneur de (37,2%). D'autres composés sont également identifiés : le *cis*-carvéol (8,2%), le *trans*-carvéol (6,9%), la verbénone (4,1%), le bornéol (3,7%), le *cis*-verbénol (3,5%), l'oxyde de limonène (3,2%), l' α -pinène (2,5%), le menthofuranone (2,5%) et le carvacrol (2,3%).

Par contre, la caractérisation de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* a fait l'objet d'un seul travail effectué par **Velasco Negueruela et Mata Rico en 1986**. L'étude menée par ces auteurs sur l'huile essentielle de cette plante récoltée en Espagne, révèle une grande richesse en pulégone soit entre 64,5 et 76,7%, suivi de pipériténone (11,7 – 16,7%). Ces auteurs avancent également l'existence d'autres composés, à savoir : isopulégol, *trans*-isopipériténol, δ -cadinène et *cis*-nérolidol.

Tableau (1) : Composé majoritaire des huiles essentielles des différentes espèces du genre *Ziziphora*

Différentes espèces du genre <i>Ziziphora</i>	Composé majoritaire (%)	Références bibliographiques
<i>Z. tenuior</i>	Pulégone (85 – 87)	Baser (2002)
<i>Z. taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i>	Pulégone (66 – 78)	Baser (2002)
<i>Z. taurica</i> subsp. <i>taurica</i>	Pulégone (65)	Baser (2002)
<i>Z. clinopodioides</i>	Pulégone (22)	Baser (2002), Ozturk et Ercisli (2007)
<i>Z. persica</i>	Thymol (31)	Baser (2002)
	Pulégone (79,3)	Ozturk et Ercisli (2006)
	Pulégone (27,8)	Rustaiyan et al. (2006)
<i>Z. hispanica</i>	Pulégone (64,5 - 76,7)	Velasco Negueruela et Mata Rico (1986)

I.2. *Thymus fontanesii*

I.2.1. Présentation de la plante

Le mot « thym » provient du terme grec « Thymos » qui signifie « odeur ». Son parfum est agréable, fort, frais et balsamique (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Les philosophes de la Rome Antique avaient coutume de boire une infusion de thym avant de commencer à travailler car en tant que stimulant, il agit à la fois au niveau de la psyché, éveillant l'intelligence, et améliorant la mémoire et la capacité de concentration, en cas de fatigue mentale, de stress, de surmenage et au niveau physique, activant la circulation artérielle, augmentant la tension, tonifiant le foie, améliorant la digestion, renforçant les défenses immunitaires (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Le thym est largement utilisé en qualité de plante aromatique dans les préparations culinaires tels que les soupes, les sauces et les viandes (**Karawya et Hifnawy, 1974 ; Reddy et al., 1998**) et en particulier dans la cuisine méditerranéenne (**Richard et al., 1985**).



Photo II : *Thymus fontanesii*

Noms vernaculaires :

- ***En Français :***
 - Thym (Quézel et Santa, 1963).
- ***En Arabe :***
 - Zaateur (Quézel et Santa, 1963).
 - Zaatar (Kabouche et al., 2005).

Nom scientifique :

- *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. (Quézel et Santa, 1963)

I.2.2. Description botanique

Le thym est un arbuste odorant qui pousse spontanément dans le vieux continent, dans la région Macaronisienne (les Canaries, les Açores et le Madère), dans le Nord de l'Afrique (le Maroc, la Tunisie, l'Algérie et la Libye), dans la péninsule de Sinaï (l'Égypte), dans la péninsule Ibérique (l'Espagne) ainsi qu'en Sibérie et en Europe Nordique. Cependant, la plupart des espèces se concentrent dans le pourtour du bassin Méditerranéen (Morales, 1997 ; Salgueiro et al., 1997 ; Pedersen, 2000 ; Stahl-Biskup, 2002).

I.2.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Thymus* (Tourn.) L. est une plante sous-ligneuse, érigée ou prostrée et odorante.

En Algérie, ce genre regroupe 12 espèces qui sont : *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. et Link., *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Thymus commutatus* (Ball.) Batt., *Thymus dreatensis*

Batt., *Thymus numidicus* Poiret., *Thymus guyonii* de Noé, *Thymus lanceolatus* Desf., *Thymus pallidus* Coss., *Thymus glandulosus* Lag., *Thymus hirtus* Willd., *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., *Thymus ciliatus* Desf. qui regroupe 3 sous-espèces qui sont : *eu-ciliatus* Maire, *coloratus* (Boiss. et Reut.) Batt. et *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. (**Quézel et Santa, 1963**).

L'espèce *Thymus fontanesii* est une plante endémique d'Algérie et de Tunisie, qui se trouve dans le Tell, au niveau des pelouses et des garrigues. Cette espèce a un calice à 5 dents toutes longuement subulées bien plus longue que le tube, et à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur. Les tiges sont dressées et robustes. Les feuilles oblongues-lancéolées sont plus ou moins interrompues vers le bas. Les fleurs blanches ou pâles sont à peine plus longues que le calice (**Quézel et Santa, 1963**).

I.2.2.2. Systématique de *Thymus fontanesii*

D'après **Quézel et Santa (1963)**, **Morales (1997)**, **Pedersen (2000)** et **Guignard et Dupont (2004)**, la classification qu'occupe *Thymus fontanesii* dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Thymus</i>
Espèce :	<i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut.

I.2.3. Propriétés thérapeutiques

Le thym est une plante qui a une longue tradition. Il est utilisé principalement dans le domaine médical pour ses propriétés antiseptique, antispasmodique et antitussive (**Karawya et Hifnawy, 1974 ; Salgueiro et al., 1997**).

Les 2 grandes qualités de l'essence de thym sont sa forte action stimulante et son remarquable et puissant pouvoir antimicrobien, car le thym était utilisé comme « antibiotiques des pauvres ». En effet, il a une action très intéressante sur les maladies microbiennes, et c'est le meilleur antiseptique que l'on puisse trouver dans la nature. L'huile essentielle de thym est généralement utilisée comme agent antiseptique dans beaucoup de préparations pharmaceutiques et comme aromatisant dans plusieurs préparations alimentaires (**Papageorgio, 1980**). Son activité bactéricide à l'encontre de nombreux germes pathogènes a

été largement prouvée (**Richard et al., 1985 ; Ruberto et al., 1993 ; Lattaoui et Tantaoui-Elaraki ; 1994 ; Tzakou et al., 1998 ; Juliano et al., 2000 ; Karaman et al., 2001**).

Il est par conséquent indiqué en cas d'infections respiratoires telles que la bronchite, la grippe, la toux et les maux de gorge. Ainsi, il est possible de l'employer dans un diffuseur de parfum pour désinfecter la chambre d'un malade (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

D'autres chercheurs avancent que l'huile essentielle de thym possède une activité antifongique (**Ruberto et al., 1993**) et acaricide vis-à-vis de *Varroa destructor* (parasite qui affecte les abeilles) (**Aviana et al., 2002**).

L'huile essentielle de thym est caractérisée par un fort potentiel antimicrobien (**Cosentino et al., 1999**) et par un remarquable effet antioxydant (**Economou et al., 1991 ; Schwartz et al., 1996 ; Draglant et al., 2003**), liés principalement à la présence de composés phénoliques en grandes proportions dans cette huile essentielle. Le thymol, le carvacrol et le *p*-cymène-2,3-diol isolé à partir de l'huile essentielle du thym confirment également cette activité antioxydante (**Ternes et al., 1995**).

Thymus fontanesii est utilisé traditionnellement comme antiseptique, antispasmodique et antitussive, possède des propriétés carminative, stomachique, expectorante, anthelminthique, diurétique et est conseillée contre le rhume, la bronchite et les troubles gastro-intestinaux (**Ghannadi et al., 2004 ; Kabouche et al., 2005**).

Par ailleurs, **Kabouche et al., en 2005**, ont noté une forte activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, lors de l'étude du pouvoir antimicrobien de cette huile essentielle sur plusieurs souches bactériennes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli*.

I.2.4. Composition chimique

Le genre *Thymus* regroupe un grand nombre d'espèces et de variétés. La caractérisation des huiles essentielles du genre *Thymus* a fait l'objet de plusieurs travaux (**Vila et al., 1995 ; Guillen et Manzanos, 1998 ; Lozeine et al., 1998 ; Saez et al., 1998 ; Tumen et al., 1998**), permettant d'avancer l'existence d'une variabilité chimique de cette huile essentielle (**Stahl-Biskup, 1991**).

Il a été démontré que les huiles essentielles des différentes espèces du genre *Thymus* sont caractérisées par une prédominance du thymol et/ou du cavacrol, suivis par le linalol, le *p*-cymène, le γ -terpinène, le bornéol, le terpinéol-4 et le 1,8-cinéole (**Guillen et Manzanos,**

1998 ; Rustaiyan *et al.*, 1999 ; Miri *et al.*, 2002 ; Stahl-Biskup, 2002 ; Sajjadi, 2003 ; Sajjadi et Khatamsaz, 2003 ; Bousmaha-Marroki, 2007).

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a fait l'objet d'un seul travail réalisé par Ghannadi *et al.*, en 2004. Cette espèce présente un rendement en huile essentielle faible de l'ordre de 1,9%. L'analyse chimique par CPG-SM de l'huile essentielle de cette plante récoltée à Sétif (Algérie), a révélé l'existence d'un seul composé majoritaire, le thymol (67,8%) suivi du γ -terpinène (15,9%) et du *p*-cymène (13,0%) (Tableau 2). Ces mêmes résultats ont été rapportés récemment par Kabouche *et al.*, en 2005, lors de l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*.

Tableau (2) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* (Ghannadi *et al.*, 2004)

Composés	Teneur (%)	Composés	Teneur (%)
α -Thujène	0,1	<i>Cis</i> -hydrate de sabinène	t
α -Pinène	t	Linalol	0,3
1-Octen-3-ol	t	Terpinène-4-ol	0,1
Myrcène	0,2	α -Terpinéol	0,1
α -Terpinène	0,1	Méthyl éther de thymol	t
<i>Para</i> -Cymène	13,0	Thymol	67,8
Limonène	0,1	Carvacrol	1,7
γ -Terpinène	15,9		

t : Trace

I.3. *Origanum glandulosum*

I.3.1. Présentation de la plante

L'origan est souvent considéré comme une forme sauvage de la marjolaine, c'est l'ornement odorant des montagnes. Cependant, le terme origan provient de deux mots grecs « Oros » et « Genos » c'est-à-dire « Eclat des montagnes » (Richard, 1974).

Origanum glandulosum (Syn. *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Ietswaart, 1980) est une plante odorante qui appartient à la famille des Lamiacées. Il est endémique (Boulos, 1983 ; Baba Aïssa, 1999) et pousse spontanément dans le nord de l'Afrique (en Algérie et en Tunisie en particulier) (Quézel et Santa, 1963 ; Sari, 1999).

La saveur de cette plante est fortement aromatique et piquante et son odeur est forte, fraîche et balsamique. Les espèces du genre *Origanum* sont utilisées comme des désinfectants

puissants et comme des agents odoriférants dans les produits cosmétiques (**Richard, 1974 ; Chiej, 1984**).

Cette plante est très utilisée dans les préparations culinaires (soupes et en particulier avec les viandes et les poissons grillés) et est employée en industrie alimentaire en tant qu'épices (**Garland, 1980 ; Baser et al., 1993 ; Ruberto et al., 2002**).

Traditionnellement, les turques pulvérisés leurs corps de poudre de cette plante car elle a une action stimulante. En effet, c'est une plante rééquilibrante et sédative en cas d'insomnie et de nervosité (**Padrini et Lucheroni, 1996 ; Belhattab et al., 2005**).

Par ailleurs, *Origanum glandulosum* est considérée essentiellement comme une plante médicinale pour traiter les maladies sévères (**Mahmoudi, 1990**).

Enfin, l'huile essentielle de cette plante possède une activité antioxydante considérable qui est due à la présence des phénols (thymol et carvacrol) (**Ruberto et al., 2002**).



Photo III : *Origanum glandulosum* (Anonyme II)

Noms vernaculaires :

- ***En Français :***
 - Marjolaine sauvage, Grande marjolaine, Pied de lit (**Garnier et al., 1961**), Origan (**Fourment et Roques, 1941 ; Garnier et al., 1961**)
- ***En Arabe :***
 - Zateur (**Quézel et Santa, 1963**)
 - Zaâter (**Baba Aïssa, 1991 ; Sari et al., 2006**)

Noms scientifiques :

- *Origanum glandulosum* Desf. (**Quézel et Santa, 1963**) (Syn. *Origanum vulgare* (L.) subsp. *glandulosum* (**Ietswaart, 1980**)).

I.3.2. Description botanique

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des Lamiacées, comporte plusieurs espèces aromatiques, il est originaire du Sud-Est méditerranéen et de l'Asie occidentale (**Vokou et al., 1993**). Ce genre regroupe 38 espèces qui sont largement répandus dans les régions Euro-sibérienne et Irano-sibérienne. Cependant, la plupart des espèces, environ 75% sont concentrés dans le pourtour méditerranéen et en particulier dans les régions méditerranéennes de l'Est. Dans l'espèce *Origanum vulgare*, il existe 6 sous-espèces qui diffèrent par le nombre des glandes, des bractées et des calices, ainsi que par la taille et la couleur des bractées et des fleurs (**Ietswaart, 1980 ; Greuter et al., 1986 ; Kokkini, 1996**).

I.3.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Origanum* (Tourn.) est une plante herbacée ou sous ligneuse à la base. En Algérie, ce genre regroupe 3 espèces qui sont : *Origanum majorana* (L.), *Origanum glandulosum* (Desf.) et *Origanum floribundum* (Munby) (**Quézel et Santa, 1963**).

L'espèce *Origanum glandulosum* pousse spontanément au niveau des broussailles et des garrigues. C'est une plante à tiges toutes dressées, (souvent rougeâtres et velues (**Baba Aïssa, 1999**)). L'inflorescence (blanchâtres ou roses (**Baba Aïssa, 1999**)) est en épis denses, à fleurs restants contiguës après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure qui est bien plus longue que la lèvre supérieure (**Quézel et Santa, 1963**). Le périanthe a un calice tubuleux à 5 dents égales. Il y a 4 étamines saillantes dont les anthères sont pourpres. Les fruits sont des akènes (**Baba Aïssa, 1999**).

I.3.2.2. Systématique d'*Origanum glandulosum*

Vu la large distribution géographique de l'origan et son immense variabilité génétique, la classification des différentes espèces et hybrides est une tâche très délicate (**Ietswaart, 1980**). D'après **Quézel et Santa (1963)**, **Ietswaart (1980)**, **Guignard et Dupont (2004)**, la classification qu'occupe *Origanum glandulosum* dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Origanum</i>
Espèce :	<i>Origanum vulgare</i> (L.)
Sous-espèce :	<i>glandulosum</i> (Desf.)

I.3.3. Propriétés thérapeutiques

L'origan est connu depuis l'antiquité pour ses qualités médicinales. En fait, une décoction de cette plante est utilisée contre la coqueluche, la toux, la fièvre, la bronchite (**Ruberto et al., 2002**), le rhume et le rhumatisme (**Mahmoudi, 1990**) alors que sous forme de poudre elle est employée pour soulager les douleurs rhumatismales (**Ruberto et al., 2002**).

C'est une plante apéritif, expectorante, carminatif (**Baba Aïssa, 1999**), stomachique (**Baba Aïssa, 1999 ; Sijelmassi, 1991**), stimulante (**Fourment et Roques, 1941; Baba Aïssa, 1999**) et possède des propriétés antiseptique, antitussif (**Baba Aïssa, 1999**) et antispasmodique (**Sijelmassi, 1991 ; Baba Aïssa, 1999**).

Cette plante jouit d'une grande faveur populaire en Algérie et en Tunisie comme remède contre la toux et les affections respiratoires. Par contre, l'origan du Maroc (*Origanum compactum*) est consommé sous forme d'infusion pour calmer les coliques (**Baba Aïssa, 1999**).

Belhattab et al. en **2004**, rapportent que les huiles essentielles de cette plante ont montré un effet inhibiteur sur les levures et les moisissures isolées à partir de l'hôpital central de Sétif.

Enfin, les huiles essentielles des différentes espèces d'*Origanum* ont des activités antibactériennes (**Pizzal et al., 2002 ; Sari et al., 2006**) et antifongiques (**Paster et al., 1995 ; Sari et al., 2006**).

I.3.4. Composition chimique

L'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans différentes régions en Algérie, a fait l'objet de quelques travaux, permettant d'avancer l'existence de différents types chimiques de cette espèce selon les composés majoritaires identifiés lors de l'étude de la variabilité de cette huile essentielle :

Ruberto et al. (2002), ont étudié la variabilité de la composition chimique de l'huile d'*Origanum glandulosum*, récolté dans 4 stations différentes dans la région de Sétif (Algérie). Ils signalent la présence de 2 chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol (Tableau 3).

L'analyse chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans la région d'Alger, effectuée par **Houmani et al. (2002)**, leur a permis d'obtenir des teneurs élevées en thymol (55,6%) suivi du *p*-cymène (12,5%), du γ -terpinène (11,20%) et de carvacrol (2,70%).

Par ailleurs, l'étude de la composition chimique d'*Origanum glandulosum* de la région de Sétif (Algérie), réalisée par **Belhattab et al.** en **2005**, leur a permis de mettre en évidence 29 composés qui représentent 89,4%. Ils ont trouvé que l'huile essentielle de cette plante extraite par hydrodistillation, présente une forte teneur en carvacrol (47%), suivi du γ -terpinène (13,4%), du *p*-cymène (11,2%) et du thymol (6,6%) (Tableau 3).

En **2006**, **Sari et al.**, ont effectué une étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans différentes régions de l'Est de l'Algérie. Ils ont identifiés 30 composés qui représentent un pourcentage variant entre 97,7% et 99,6%. Ils avancent l'existence de 2 chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol (Tableau 3).

En **2007**, les travaux réalisés par **Bendahou et al.**, sur l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* provenant de la région de Tlemcen, ont montré l'existence du thymol, comme composé majoritaire avec un pourcentage de l'ordre de 55,6%. Elle renferme également des quantités appréciables en d'autres composés à savoir : le *p*-cymène (12,5%), le γ -terpinène (11,2%) (Tableau 3).

Tableau (3) : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Composés identifiés	Ruberto et al. (2002)	Belhattab et al. (2005)	Sari et al. (2006)	Bendahou et al. (2007)
α -Thujène	0,3 – 0,7	0,3	t – 0,7	0,7
α -Pinène	0,5 – 0,6	0,7	0,1 – 0,7	0,6
Octen-3-ol	0,2 – 0,3	0,2	t – 0,8	0,3
3-Octanone	0,1 – 0,2	0,2	t – 0,3	0,1
β -Pinène	0,1	0,2	t – 0,1	1,4
β -Myrcène	0,8 – 1,4	1,6	0,2 – 1,5	1,4
α -Terpinène	0,7 – 1,6	1,5	0,2 – 2,0	0,6
<i>p</i> -Cymène	3,6 – 25,8	11,2	1,7 – 18,5	12,5
Limonène	0,2 – 0,3	0,3	0,1 – 0,8	2,5
γ -Terpinène	4,8 – 13,2	13,4	1,1 – 18,7	11,2
Linalol	1,0 – 1,2	1,0	0,4 – 0,9	1,2
Terpinèn-4-ol	0,1 – 0,8	0,4	t	0,4
α -Terpinéol	0,2 – 0,6	0,5	t – 1,6	t
Thymol	7,7 – 37,8	6,6	18,5 –	55,6
Carvacrol	18,3 – 63,7	47,0	73,1	2,7
<i>trans</i> -Caryophyllène	0,7 – 1,3	-	7,6 – 72,6	0,9
β -Sesquiphellandrène	0,5 – 1,0	0,7	-	0,8
Oxyde de caryophyllène	0,1 – 0,7	0,4	0,2 – 0,8 0,2 – 0,7	0,2

t : Trace ; - : Composé non identifié ; Les teneurs sont données en pourcentage.

I.4. *Ammoïdes verticillata*

I.4.1. Présentation de la plante

L'*Ammoïdes* est une plante qui appartient à la famille des Apiacées. Son appellation dans notre pays est Nounkha ou Nûnkha tirée du nom Perse « Nankhah » qui est utilisée en Iran, comme aromate dans le pain. En effet, « Nan » et « Khah » signifient respectivement pain et goût (**Baytop et Sütlüpınar, 1986**).

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



Photo IV : *Ammoïdes verticillata*

Noms vernaculaires :

Cette espèce est connue sous les noms vulgaires Nounkha, Nûnkha et Nanoukha (**Merad, 1973 ; Sijelmassi, 1991; Trabut, 1935**). Mais, elle est surtout connue dans le monde sous le nom suivant :

- En Français : Ajowan (**Wehmer, 1931, AFNOR**).
- En Arabe : Taleb El Koubs (**Narayana et al., 1967**).

Noms scientifiques :

- *Ammoïdes* ou *Ptychotis verticillata* (Desf.) Briq. (**Quézel et Santa, 1963**).
- *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Syn. *Carum copticum* (L.) Benth et Hook (**Wehmer, 1931 ; Quézel et Santa, 1963 ; Narayana et al., 1967 ; Grosjean, 2004**).
- *Trachyspermum copticum* (**Schirner, 2004**).

La dénomination usuelle de la plante est Ajowan et la désignation botanique est *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex. Turr., alors que la désignation botanique usuelle en France est *Carum copticum* Benth. et Hook. ; *Ptychotis ajowan* D. C. ou bien *Trachyspermum copticum* Link. (**AFNOR, 1992**).

I.4.2. Description botanique

I.4.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Ammoïdes* appartient à la famille des Apiacées. Elle pousse spontanément en Egypte et en Afrique du Nord (Maroc, Algérie et Tunisie) ainsi qu'en Asie (Inde, Iran et Pakistan). Cependant, les principaux pays cultivateurs sont l'Égypte, l'Iran et surtout l'Inde (**Quézel et Santa, 1963 ; Baytop et Sütllüpinar, 1986 ; Khajeh et al., 2004**).

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

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

I.4.2.2. Systématique d'*Ammoïdes verticillata*

Ammoïdes (ou *Ptychotis*) *verticillata* est classée selon la clé de détermination botanique, d'après **Quézel et Santa (1963)**, et **Guignard et Dupont (2004)** comme suit :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Apiales
Famille :	Apiacées

Genre : *Ammoïdes* Desf. (ou *Ptychotis* Koch.)
Espèce : *Ammoïdes* (ou *Ptychotis*) *verticillata* Desf.

I.4.3. Propriétés thérapeutiques

Les qualités thérapeutiques d'*Ammoïdes verticillata* sont connues depuis les plus anciens dans la médecine populaire locale. En effet, Ibn El Beithar, dans son traité des simples, à l'article Athrilal signale que cette plante était utilisée dans le traitement de la lèpre par une section de la tribu des Oudjeham, près de Bougie en 1220 (**Trabut, 1935**).

Ammoïdes verticillata est une plante qui possède de nombreuses et précieuses propriétés médicinales (**Ambasta et al., 1986**). Elle est considérée surtout comme une panacée (**Kambouche et al., 2003**). En effet, c'est une espèce aromatique utilisée comme fébrifuge (**Sijelmassi, 1991 ; Ziyat et al., 1997**), conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension et/ou le diabète (**Ziyat et al., 1997**).

Cette plante possède également des propriétés antiallergique, anthelminthique (**Grosjean, 2004**), antibactérienne majeure à large spectre d'action, antifongique (**Dubey et Mishra, 1990 ; Grosjean, 2004**), antivirale (**Grosjean, 2004**) et hypocholestérolémiant (**Agrawala et Pant, 1986**).

Elle a également un effet expectorant (**Ambasta et al., 1986**), antalgique (**Grosjean, 2004**), carminatif, digestif (**Baba Aissa, 1999 ; Schirner, 2004**) et diurétique (**Baba Aissa, 1999 ; Boskabady et Shaikhi, 2000**).

Elle est utilisée comme apéritif, emménagogue (**Baba Aissa, 1999**) et dans le traitement du vitiligo en Egypte (**Belekhdar, 1997**).

En outre, les graines d'*Ammoïdes verticillata* sont utilisées communément comme remède en cas de colique, de diarrhée, de dyspepsie, d'hypertension, de complications hépatobiliaires (**Avesina, 1985**) de choléra (**Avesina, 1985 ; Schirner, 2004**) d'asthme (**Avesina, 1985 ; Boskabady et Shaikhi, 2000 ; Schirner, 2004**), de troubles intestinaux (**Schirner, 2004**) de vomissements, de troubles du tractus urinaire, dans la dilatation des bronches et est conseillée comme analgésique (**Boskabady et Shaikhi, 2000**).

Les huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* ont un champ d'action à spectre très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries (**Abdelouahid et Bekhechi, 2002**) que celle des levures et des moisissures (**Srivastava et al., 1999 ; Abdelouahid et Bekhechi, 2002**). D'ailleurs, elle est cultivée en Inde depuis des millénaires pour son huile essentielle qui est employée dans la fabrication des bains de bouche et des dentifrices car elle est très

riche en thymol. Ce dernier est également très utilisé en médecine contre la toux, l'irritation de la gorge et dans des cas de choléra (**Bhargava et HaKsar, 1961 ; Joshi et al., 1963**).

Une enquête thérapeutique a été réalisée auprès des herboristes et des gens de la campagne de la région de Tlemcen. Les informations qu'on a pu recueillir, ont montré que cette plante a des usages culinaires et surtout thérapeutiques et sont résumés dans le tableau (4) (**Bekhechi, 2002**).

Tableau (4) : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur la plante *Ammoïdes verticillata* (Bekhechi, 2002)

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
Plante entière	Fièvre Rhumes grippes Maladies broncho-pulmonaires	Bouillir de l'eau avec la plante, mettre une serviette sur la tête, et inhaler les vapeurs dégagées. Ensuite, boire une tasse de cette décoction filtrée avant de se coucher.
	Fièvre typhoïde Antipyrétique Dépuratif Antispasmodique Affections rénales	Décoction ou infusion
	Règles douloureuses	Infusion
	Régulateur dermique	Décoction
	Asthme Douleurs gastriques Parasites intestinaux	Mélanger la plante lavée, séchée et broyée avec du miel. Prendre 1 à 2 cuillerées par jour.
	Céphalée migraines	Décoction ou infusion avec un citron. Boire une tasse le soir avant de se coucher.
	Sinusite	Mettre la plante dans de l'eau bouillante, laisser infuser, ensuite mélanger avec du henné et mettre sur les endroits atteints (Sinus osseux de la face).
	Rafraîchissante	Faire une décoction avec une tranche de citron, laisser refroidie puis mettre au réfrigérateur (boire comme une boisson rafraîchissante).
	Feuilles et fleurs	Condiment culinaire

Feuilles	Irritations dermiques Abscess - furoncle	Faire bouillir dans très peu d'eau, une poignée de feuilles fraîches. Lorsque le liquide est presque complètement évaporé, mettre les feuilles cuites sur une serviette et les écraser pour en supprimer le suc. Laisser refroidir le cataplasme, puis l'appliquer sur la partie atteinte.
Racines	Diarrhée	Faire bouillir pendant 20 minutes dans un litre d'eau des racines séchées au soleil. Filtre la décoction, la sucrer avec un peu de miel et la boire en trois fois au cours de la journée.
	Diurétique	Mettre dans un litre d'eau bouillante des racines. Filtrer, quand l'infusion est devenue tiède, sucrer avec un peu de miel. Consommer le tout dans la journée.

I.4.4. Composition chimique

Les huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* ont fait l'objet de plusieurs travaux décrivant leurs compositions chimiques très variés :

Les premiers travaux effectués par **Nigram et al.** en **1963**, rapportent que La composition chimique de l'huile essentielle extraite des graines d'Ajowan provenant d'Inde est la suivante : α -pinène (1,8%), camphène (0,5%), β -pinène (3,5%), myrcène (0,3%), δ -3-carène (0,5%), limonène (5,1%), γ -terpinène (34,9%), *p*-cymène, une faible quantité de carvacrol et du thymol comme composé majoritaire.

Une étude de la composition chimique (Tableau 5) de l'huile essentielle des graines et de la partie aérienne de cette plante, effectuée par **Balbaa et al.** en **1973**, révèle l'existence de deux groupes chimiques, soit : thymol/*p*-cymène/ γ -terpinène (graines) ; γ -terpinène/*p*-cymène/thymol (partie aérienne).

Tableau (5) : Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle entre la partie aérienne et les graines d'Ajowan (Balbaa et al., 1973)

Composés	Huile essentielle des graines	Huile essentielle de la partie aérienne
α -Pinène	0,41 - 0,80	1,30 – 2,30
β -Pinène	1,81 – 3,30	2,20 – 2,80
δ -3-Carène	0,20 – 0,50	0,52 – 1,90
Myrcène	0,08 – 0,10	t – 0,10
Limonène	0,08 – 0,20	2,20 – 2,40
γ -Terpinène	23,80 – 24,50	55,20 – 64,10
<i>p</i> -Cymène	23,60 – 24,00	16,40 – 20,10
Thymol	41,00 – 44,00	6,00 – 10,50
Carvacrol	1,00 – 4,70	1,00 – 3,00

t : Trace ; Les teneurs sont données en pourcentage.

Par ailleurs, en Pakistan **Ashraf et Batty (1975)** avancent que les composants de l'huile essentielle des graines d'Ajowan sont : α -pinène (0,33 – 0,63%), camphène (0,56 – 0,63%), β -pinène (1,24 – 1,56%), δ -3-carène (0,42 – 0,80%), limonène (0,25 – 2,25%), γ -terpinène (18,70 – 20,35%), *p*-cymène (20,80 – 23,78%), carvacrol (4,50 – 6,80%) et le thymol comme composé majoritaire avec un pourcentage variant entre 45,20 et 48,50%.

Srinivas (1986) a déterminé la composition chimique de l'huile essentielle d'Ajowan. Le thymol est le composé majoritaire avec une teneur de 36,88%. D'autres composés sont présents dans cette huile en quantités appréciables : le *p*-cymène (21,38%), le carvacrol (16,42%) et le γ -terpinène (14,63%).

D'autre part, l'analyse chimique (Tableau 6) de l'huile essentielle d'Ajowan extraite par CO₂ supercritique à différentes températures et par hydrodistillation, révèle des pourcentages élevés en thymol (**Kumar et al., 1992**).

Tableau (6) : Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle d'Ajowan extraite par CO₂ supercritique et par hydrodistillation (Kumar et al., 1992)

Composés	Extraction par CO ₂ supercritique			Extraction par hydrodistillation
	10°C	15°C	25°C	
α-Pinène	0,23	0,27	0,10	0,49
β-Pinène	0,80	0,24	0,15	2,39
Myrcène	0,24	0,29	0,17	0,26
Limonène	0,22	0,19	0,13	0,33
γ-Terpinène	7,67	9,45	5,56	18,94
p-Cymène	15,07	12,25	8,11	21,00
Thymol	71,39	74,10	80,21	53,75
Carvacrol	0,24	0,36	0,30	-

Les teneurs sont données en pourcentage.

En 1993, Chialva et al. ont pu identifier 26 composés dans l'huile essentielle d'Ajowan provenant de Turquie, avec une prédominance du thymol, suivi du γ-terpinène et du p-cymène (Tableau 7).

Tableau (7) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Trachyspermum copticum* (L.) Link (Chialva et al., 1993)

Composés	(%)	Composés (suite)	(%)	Composés (suite)	(%)
α-Pinène	0,32	β-Phellandrène	0,18	α-Terpinéol	0,19
α-Thujéne	0,20	1,8-Cinèole	t	β-Selinène	t
Camphène	t	γ-Terpinène	11,86	Carvone	t
β-Pinène	3,31	p-Cymène	15,57	Cumin aldehyde	t
Sabinène	t	Terpinolène	t	(E)-Anéthole	t
δ-3-Carène	t	trans- Hydrate de sabinène	0,19	Méthyl eugénol	t
Myrcène	0,56	cis- Hydrate de sabinène	0,29	Thymol	61,31
α-Terpinène	t	Terpinène-4-ol	1,13	Carvacrol	0,60
Limonène	2,08	Méthyl chavicol	t		

t : Trace

En 1998, une étude de la composition chimique de l'huile essentielle des graines d'Ajowan provenant d'Inde, a permis à Choudhury et al., de mettre en évidence une forte teneur en limonène (38,1%) et en carvone (46,2%). Ce type chimique a été signalé que par ces auteurs. Ils avancent également l'existence d'autres composés qui n'ont pas été identifiés

précédemment : le α -phellandrène (0,5%), le *cis*-dihydrocarvone (1,1%), le *trans*-hydrocarvone (2,5%), la myristicine (2,4%) et le dill apiole (8,9%).

En 2002, **Gersbach et Reddy** ont analysé l'huile essentielle de *Carum copticum* provenant d'Australie, ce qui leur a permis d'identifier les composés suivants : thymol (45,60%), γ -terpinène (23,8%), *p*-cymène (21,25%), β -pinène (3,44%), α -pinène (1,40%), carvacrol (1,20%), camphène (0,88%), β -myrcène (0,65%) et limonène (0,51%).

En 1999, **Singh et Tripathi** confirment que l'huile essentielle de *Trachyspermum ammi* est très riche en phénols (thymol), suivi du *p*-cymène.

En 2004, **Khajeh et al.**, rapportent que l'huile essentielle de *Carum copticum* provenant d'Inde renferme les composants suivants : le thymol (49%), le γ -terpinène (30,8%), le *p*-cymène (15,7%), le β -pinène (2,1%), le limonène (0,7%), l' α -thujène (0,4%), le myrcène (0,8%), l' α -terpinène (0,5%).

Enfin, l'analyse chimique des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* d'Algérie a fait l'objet de deux travaux. Les premiers ont été réalisés par **Kambouche et El-Abed** en 2003, qui ont hydrodistillé les parties aériennes de cette plante, récolté dans la région d'Oran.

L'huile essentielle obtenue a été analysée par CPG-Ir, CPG-SM et par RMN ^{13}C et RMN ^1H , ce qui a permis l'identification de 20 composés (Tableau 8) représentant 99,9% de la composition globale. L'isothymol est le composé majoritaire avec une teneur de 51,20%. Plus récemment, **Bendahou (2007)** a décrit l'analyse par CPG et CPG-SM de l'huile essentielle de cette même espèce poussant spontanément dans la région de Terni (Tlemcen) qui a révélé une forte teneur en thymol (50,1%) (Tableau 8).

Tableau (8) : Principaux composés de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

Composés identifiés	Kambouche et El-Abed (2003)	Bendahou et al. (2007)
α -Thujène	0,08	0,3
α -Pinène	0,62	1,0
Sabinène	0,13	t
β -Pinène	0,16	0,1
Myrcène	0,40	0,6
<i>p</i> -Cymène	14,08	15,6
Limonène	11,89	15,0
γ -terpinène	6,79	6,6
Linalol	t	0,1
Terpinèn-4-ol	0,79	0,2
α -Terpinéol	0,08	0,1
Isothymol	51,20	-
Thymol	12,96	50,1
Carvacrol	-	8,8

t : Trace ; - : Composé non identifié ; Les teneurs sont données en pourcentage.

I.5. *Mentha pulegium*

I.5.1. Présentation de la plante

Mentha pulegium (L.) est une plante odorante qui appartient à la famille des Lamiacées. Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense, fraîche et pénétrante. Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex*, la puce car la plante a la propriété d'éloigner les puces. La menthe est utilisée dans les produits cosmétiques et dans les préparations culinaires pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons. Elle est considérée également bénéfique pour la santé (Sivropoulou et al., 1995 ; Padrini et Lucheroni, 1996).



Photo V : *Mentha pulegium* (Anonyme III)

Noms vernaculaires :

- ***En Français :***
 - Menthe pouliot (Fourment et Roques, 1941 ; Fournier, 1947-1948 ; Lemordant et al., 1977).
- ***En Arabe :***
 - Fliou (Trabut, 1935 ; Fourment et Roques, 1941 ; Lemordant et al., 1977 ; Bellakhdar, 1978)
 - Feliou (Quézel et Santa, 1963).

Nom scientifique :

- *Mentha pulegium* (L.) (Quézel et Santa, 1963)

I.5.2. Description botanique

I.5.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Mentha* appartenant à la famille des Lamiacées, est très répandu dans le nord de l'Europe, dans la région méditerranéenne et dans l'Asie (Quézel et Santa, 1963 ; Marrotti et al., 1994).

En Algérie, le genre *Mentha* regroupe 5 espèces qui sont : *Mentha rotundifolia* (L.), *Mentha longifolia* (L.) Huds., *Mentha spicata* (L.) em. Huds., *Mentha aquatica* (L.), et *Mentha pulegium* (L.).

L'espèce *Mentha pulegium* (L.) est très abondante et pousse spontanément en Algérie surtout dans le Tell (Quézel et Santa, 1963).

Elle se répand dans les terres inondées en hiver, au bord des ruisseaux et des marécages. On la trouve en Algérie et en général dans tout le nord de l'Afrique, dans l'Europe ainsi que dans les régions d'Asie et d'Amérique (Quézel et Santa, 1963 ; Panetta, 1985).

C'est une plante glabre de 10 – 30 cm à inflorescences formées de nombreux verticillatres denses, feuillés et distants. Le calice est presque bilabié (Quézel et Santa, 1963).

Mentha pulegium est une plante à tiges dressées. Le calice est à cinq dents pileuses, à gorge obstruée de poils à la maturation. La corolle est à gorge pileuse, bossée d'un côté à la gorge. Les feuilles sont pétiolées (Raybaud, 1985).

I.5.2.2. Systématique de *Mentha pulegium*

Selon Quézel et Santa (1963) ; Guignard et Dupont (2004), la classification qu'occupe *Mentha pulegium* dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Mentha</i> (Tourn.) L.
Espèce :	<i>Mentha pulegium</i> (L.)

I.5.3. Propriétés thérapeutiques

Connue depuis l'antiquité, la menthe pouliot figure parmi les plantes les plus communément utilisées en médecine traditionnelle (Boullard, 2001). En fait, une infusion de feuilles et/ou de sommités fleuries est recommandée contre la toux, l'asthme (Garnier, 1961 ; Debuigue, 1984 ; Sijelmassi, 1991), le diabète (Ziyyat et al., 1997), la fièvre, les brûlures, l'eczéma, les démangeaisons ou bien pour arrêter la sécrétion lactée (Garnier,

1961 ; Sijelmassi, 1991) et a des propriétés insecticide, cholagogue, antiseptique, antispasmodique (Fourment et Roques, 1941 ; Fournier, 1947 – 1948 ; Lemordant et al., 1977 ; Raybaud, 1985 ; Bellakhdar, 1987 ; Bellakhdar et al., 1991 ; Sijelmassi, 1993 ; Lorenzi et Matos, 2002), antitussive, conseillée pour l'hygiène buccale, contre les maux de tête, les frissons et les infections broncho-pulmonaires (Bellakhdar et al., 1991 ; Sijelmassi, 1993 ; Lorenzi et Matos, 2002). Par ailleurs, une infusion, un cataplasme ou une inhalation de la plante fraîche est conseillée dans le cas d'une bronchite, d'une cataracte, d'un rhume et d'une infection de la gorge. En outre, une infusion de sommités fleuries a un effet expectorant, désinfectant (Fourment et Roques, 1941 ; Fournier, 1947 – 1948 ; Lemordant et al., 1977 ; Bellakhdar, 1987) et est utilisée pour le traitement des peaux grasses. Enfin, une infusion de la partie aérienne a également un effet tonique, digestive et carminative (Bellakhdar et al., 1991 ; Sijelmassi, 1993).

Concernant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, Sivropoulou et al. en 1995, ont testé le pouvoir antimicrobien des produits naturels de cette espèce, par la méthode de diffusion sur disques, contre les bactéries suivantes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. Ils ont constaté que cette huile présente une faible activité contre l'ensemble des souches testées. Par ailleurs, Daferera et al. en 2003 avancent également une faible activité antifongique de l'huile essentielle de cette même plante.

De même, en 2005, Teixeira Duarte et al. ont déterminé le pouvoir antifongique de cette huile contre *C. albicans* qui se révèle moyennement sensible. Cette faible activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a déjà été confirmée par Arras et Usai en 2001.

Franzios et al. (1997) ont testé l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur *Drosophila melanogaster* et ils ont trouvé que cette huile causait la mort d'un grand nombre de larves due à la présence de la pulégone. Lamiri et al. (2001) ont étudié également le pouvoir insecticide de l'huile essentielle de cette même plante sur *Mayetiola destructor* (Say). Ils ont constaté que cette huile est très toxique pour les adultes et les œufs de cette espèce (100% de mortalité).

I.5.4. Composition chimique

Les diverses études effectuées sur la caractérisation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont permis d'avancer l'existence d'une variabilité chimique de cette huile essentielle :

La première étude effectuée sur la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est celle de **Zwaving et Smith** en **1971**, qui ont identifié les composés suivants : la pipéritone (70%), le limonène (11%), le menthone (8%) et l'isomenthone (7%), l'octanol-3 (1%) et l'octyl-3-acétate (0,8%), à partir de pieds récoltés en Australie.

Skrubis (1972) rapporte que *Mentha pulegium* poussant à l'état spontané en Grèce, contient les constituants suivants : l' α -pinène (1,2%), le camphène (0,7%), le limonène (0,1%), le menthol (0,7%), l'eugénol (1,6%) et la pulégone (61,9%).

Proença Da Cunha et al. (1976), ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* récolté en Angola. Ils ont trouvé que cette huile a la composition chimique suivante : l' α -pinène (2,60%), le β -pinène (1,44%), le camphène (1,06%), le limonène (1,45%), le *p*-cymène (3,05%), l'isomenthone (5,02%), l'isopulégone (6,80%), la *cis/trans*-isopulégone (10,07%), le menthol (16,24%) et la pulégone (42%).

Lawrence en **1978**, a comparé la composition chimique des huiles essentielles de plusieurs échantillons de *Mentha pulegium* récolté en Espagne. Les composés identifiés sont rapportés dans le tableau (9).

Tableau (9) : Composition de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (Lawrence, 1978)

Composés identifiés	(%)	Composés (suite)	(%)
α -Pinène	0,2 – 0,3	Isomenthone	1,4 – 8,6
β -Pinène	0,3 – 0,4	Acétate de néo-isomenthyl	t – 0,5
Sabinène	t – 0,3	<i>cis</i> -Isopulégone	0,5 – 0,8
Myrcène	t – 0,1	<i>trans</i> -Isopulégone	0,2 – 1,6
Limonène	0,1 – 0,7	β -Caryophyllène	t – 0,3
1,8-Cinèole	0,1 – 0,4	néo-Isomenthone	t – 0,9
<i>Cis/trans</i> -Ocimène	t	D-Germacrène	t – 0,4
<i>p</i> -Cymène	t – 0,2	Pipéritone	0,1 – 0,2
3-Octyl-acétate	t – 1,0	Isopipériténone	t – 0,1
Octan-3-ol	0,6 – 1,2	Pipériténone	0,8 – 2,5
1-Octan-3-ol	t – 0,2	Menthone	10,0 – 16,0
Menthofurane	t – 0,3	Pulégone	67,6 – 79,4

t : trace

Bigo De Grosso et Moyna (1985) rapportent que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* provenant d'Uruguay contient les composants suivants : α -pinène (t – 0,4%), β -

pinène (t), α -phellandrène (t), limonène (0,2%), 1,8-cinéole (t – 0,1%), 3-octanol (0,2 – 1,5%), menthone (4,2 – 5,6%), néo-menthol (1,6 – 4,2%), β -caryophyllène (0,9 – 1,4%), menthol (0,3 – 3,6%), isomenthone (35,6 – 40,6%) et pulégone (26,8 – 41,1%).

Montes et al. En **1986**, avancent que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a la composition chimique suivante : α -pinène, camphène, β -pinène, limonène, α -phellandrène, *p*-cymène, 1-méthylcyclohexanol, 3-octanol, menthone, menthofurane, méthyl acétate, néo-menthol, menthol, isomenthol et la pulégone avec un pourcentage de 92,6%.

En **1995**, les travaux réalisés par **Sivropoulou et al.**, sur l'huile essentielle *Mentha pulegium* provenant de trois régions différentes de Grèce, ont montré l'existence de trois types chimiques différents à savoir : Pulégone/piperitone ; Pulégone/isomenthone ; Isomenthone/menthone. Le tableau (10) fait état des composés identifiés dans cette huile essentielle, et de leurs teneurs.

Tableau (10) : Composition chimique de l'huile essentielle *Mentha pulegium* (Sivropoulou et al., 1995)

Régions	Station	Station	Station
Composés	(1)	(2)	(3)
Menthol	t	0,4	0,1
Isomenthol	0,2	1,3	0,1
Néomenthol	0,6	0,6	t
Menthone	1,7	1,0	10,3
Isomenthone	0,2	4,5	77,5
Pulégone	50,6	44,7	1,0
Isopulégol	0,2	0,4	0,3
Pipéritone	13,4	1,9	0,3

t : Trace ; Les teneurs sont données en pourcentage.

Une étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, poussant à l'état spontané au Maroc, a permis à **Lamiri et al.** en **2001**, de mettre en évidence une forte teneur en pulégone (61,9%), en eucarvone (5,8%) et en caryophyllène (3,9%).

Enfin, en **2003**, **Chebli et al.** ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* provenant du Maroc. Les composés identifiés représentent un pourcentage de 97,1% de la composition globale : α -thujène (0,3%), α -pinène (0,5%), octen-3-ol (2,4%), camphène (0,2%), β -pinène (0,4%), myrcène (0,7%), 1,8-cinéole (0,3%), limonène (0,6%), menthadiène-3,8 (5,3%), pulégone (85,4%) et pipéritone (1,0%).

Daferera et al. (2003) avancent que les composés majoritaires présents dans l'huile essentielle de cette même espèce sont : *trans*-menthone (1,2%), *cis*-menthone (15,0%) et la pulégone (76,5%).

Selon, l'ensemble des travaux réalisés dans le monde sur la caractérisation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, nous pouvons conclure que cette huile est très riche en pulégone, suivi de menthol, ou de pipéritone, ou de menthone et/ou d'isomenthone.

I.6. *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*

I.6.1. Présentation de la plante

Satureja calamintha est une plante odorante, à l'arôme sauve du type menthe, qui appartient à la famille des Lamiacées. Son odeur est frais et herbeux (**Adzet et Passet, 1972 ; Padrini et Lucheroni, 1996**).

C'est une herbe aromatique, très utilisée dans les préparations culinaires (soupes, sauces, etc.) et entrent dans la composition de plusieurs recettes des festins religieux grâce à ses propriétés digestives et antitoxiques (**Simonpoli, 1993 ; Padrini et Lucheroni, 1996**). En effet, elle facilite la digestion en stimulant la production de la bile et prévient la fermentation intestinale (**Padrini et Lucheroni, 1996**).



Photo VI : *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (Anonyme IV)

Noms vernaculaires :

- ***En Français :***
 - Sarriette (**Adzet et Passet, 1972**).
 - Pouliot des montagnes (**Baba Aïssa, 1999**).

- *En Arabe :*

- Meuta, Nabta (Quézel et Santa, 1963).

Noms scientifiques :

- *Satureia calamintha* (Adzet et Passet, 1972).
- *Satureja calamintha* (L.) Scheele (Syn. *Calamintha officinalis* Moench) subsp. *nepeta* (L.) Briq. (Quézel et Santa, 1963 ; Gamisans et Jeanmonod, 1993).
- *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Pignatti, 1982 ; Gamisans et Jeanmonod, 1993).

I.6.2. Description botanique

I.6.2.1. Caractères botaniques

Le genre *Satureja* appartient à la famille des Lamiacées. Il regroupe plus de 30 espèces qui se distribuent dans le pourtour méditerranéen et se développent dans des régions arides, chaudes et rocheuses (Silic, 1979 ; Slavkovska et al., 2001).

Satureja calamintha est une espèce très répandue autour de la région méditerranéenne, c'est également une espèce eurasiatique qui pousse spontanément en Italie et en Corse (Ristorcelli et al., 1996 ; Fraternali et al., 1998 ; Baldovini et al., 2000).

En Algérie, ce genre comporte 4 sous-genres qui sont : *Micromeria*, *Acinos*, *Clinopodium* et *Calamintha* qui regroupe 5 espèces qui sont : *S. baborensis* (Batt.) Briq., *S. candidissima* (Munby) Briq., *S. pomelii* Briq., *S. hispidula* (Boiss. et Reut.) Maire et *S. calamintha* Scheele (Quézel et Santa, 1963).

Satureja calamintha est une plante vivace qui se trouve dans le Tell et surtout en montagnes (Quézel et Santa, 1963 ; Baba Aïssa, 1999). Les inflorescences sont en cymes lâches et pédonculées. Le calice reste tubuleux à maturité. Les corolles roses ou violacées sont bien plus longues que le calice. Elle pousse sur les pelouses, sur les broussailles et dans les forêts. Cette espèce regroupe 3 sous-espèces qui sont : *Satureja calamintha* Scheele subsp. *nepeta* (L.) Briq., *S. calamintha* Scheele subsp. *adscendens* (Jord.), *S. calamintha* Scheele subsp. *silvatica* Briq. (Quézel et Santa, 1963).

Par contre, Pignatti en 1982, subdivise cette espèce en 2 sous-espèces qui sont : *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* et *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball.

Satureja calamintha Scheele subsp. *nepeta* (L.) Briq. a un calice de 6 – 7 mm, à dents subégales, les inférieures à peine plus longues que les supérieures. La corolle est violet pâle et celle des fleurs hermaphrodites, est longue de 7 – 10 mm (Quézel et Santa, 1963).

I.6.2.2. Systématique de *Satureja calamintha*

D'après **Quézel et Santa (1963)** et **Guignard et Dupont (2004)**, la classification qu'occupe *Satureja calamintha* dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiacées
Genre :	<i>Satureja</i> (L.)
Espèce :	<i>Satureja calamintha</i> Scheele
Subespèce :	<i>nepeta</i> (L.) Briq.

I.6.3. Propriétés thérapeutiques

Plusieurs espèces du genre *Satureja* sont utilisées dans les préparations alimentaires comme épices et dans le domaine médical, comme antiseptique, antispasmodique, stimulante, diurétique, carminative et tonique (**Bandini et Pacchiani, 1981 ; Bellomaria et Della Mora, 1985 ; Souleles et al., 1987 ; Kokkalou et Stefanou, 1990 ; Tucker et Maciarello, 1991**).

Par ailleurs, *Satureja* est une plante considérablement utilisée en phytothérapie. En effet, une infusion des extrémités fleuries de cette plante est indiquée en cas de douleurs gastriques d'origine nerveuse, de diarrhée, de crampes abdominales, de parasites intestinaux et de toux (**Padrini et Lucheroni, 1996**). On l'emploie aussi comme antifongique, antibactérien et antiviral quelques fois. Ainsi, elle possède des propriétés antiseptique et convient également dans l'anémie, et dans l'atonie intestinale avec fermentation, c'est un bon spasmodique (**Garnier et al., 1961**).

En outre, certains auteurs avancent que *Satureja calamintha* est une plante aromatique, utilisée comme stimulante, antiseptique (**Perrucci et al., 1994**), tonique, antispasmodique (**Perrucci et al., 1994 ; Baba Aïssa, 1999**), stomachique, carminatif, fébrifuge, sudorifique et expectorante (**Baba Aïssa, 1999**).

Enfin, il a été démontré que l'huile essentielle de cette plante a une activité antibactérienne (**Panizzi et al., 1993**) et antifongique (**Panizzi et al., 1993 ; Perrucci et al., 1994**).

I.6.4. Composition chimique

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* a fait l'objet de plusieurs travaux dont lesquels, les auteurs avancent l'existence de différents types chimiques au sein de cette espèce :

Les premiers travaux ont été réalisés par **Adzet et Passet** en **1972**, qui rapportent que l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* est riche en pulégone, menthone et menthol.

En **1986**, **De Pooter et Schamp**, avancent que l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* contient une forte teneur en pulégone et en isomenthone.

En **1987**, **De Pooter et al.**, ont étudié la variabilité de la composition chimique de l'huile de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* sur plusieurs échantillons provenant de la Belgique (Tableau 11). Ils ont trouvé que l'huile essentielle de cette plante est riche en oxyde de pipériténone, suivi de pulégone et d'oxyde de pipéritone.

Tableau (11) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (De Pooter et al., 1987)

Composés identifiés	(%)	Composés (suite)	(%)
α -Pinène	0,2 – 0,6	<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	0,1 – 2,4
β -Pinène	0,2 – 0,8	<i>cis</i> - Hydrate de sabinène	t – 0,1
Sabinène	0,1 – 0,5	Menthone	6,3 – 8,9
Myrcène	0,3 – 1,1	Isomenthone	t – 6,7
Limonène	0,7 – 4,6	Menthol	1,4 – 7,5
<i>cis</i> - β -Ocimène	0,1 – 0,9	Pipériténone	0,4 – 3,8
<i>trans</i> - β -Ocimène	t – 0,5	β -Caryophyllène	1,4 – 6,2
3-Octanol	0,1– 0,3	Germacrène D	0,4 – 1,6
α -Terpinène	t – 0,5	Oxyde de pipéritone	8,4 – 17,0
γ -Terpinène	0,2 – 0,9	Pulégone	11,5 – 33,2
Terpinolène	t – 0,3	Oxyde de pipériténone	5,9 – 37,8

t : Trace.

En **1993**, une étude de la composition chimique de l'huile essentielle de cette même plante, a permis à **Perez-Alonso et al.**, de mettre en évidence un autre type chimique, soit : carvone/1,8-cinèole.

En **1996**, **Ristorcelli et al.**, ont effectué une analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* récolté en Corse (France). Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de cette région est à chimiotype menthone/pulégone. D'autres composés

sont présents en quantités appréciables : le limonène, l'isomenthone, le néo-menthol et le pipéritone.

En 1998, **Fraternale et al.**, ont étudié la composition de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* récolté à côté d'Urbino (Italie). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau (12).

Tableau (12) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Fraternale et al., 1998)

Composés	(%)	Composés	(%)	Composés	(%)
α -Pinène	0,2	Linalol	0,4	Thymol	1,2
Sabinène	0,2	néo-Menthol	0,4	4-Hydroxypiperitone	0,6
β -Pinène	0,3	(Z)-3-Hexenyl-2-	0,1	Diosphénol	0,8
3-Octanol	2,0	Méthyl butyrate		Piperitenone	0,1
Myrcène	0,3	Carvone	0,2	Eugénol	0,1
<i>p</i> -Cymène	0,2	Oxyde de pipéritone	68,0	Oxyde de Pipériténone	3,6
1,8-Cinéole	0,2	Piperitone	0,3	α -Copaène	0,1
Limonène	2,0	Isopulégyl acétate	2,3	β -Bourbonène	0,3
γ -Terpinène	0,2	néo-Menthyl acétate	0,1	β -Caryophyllène	1,3
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	0,2	Ψ -Diosphénol	0,1	Germacrène D	1,1
3-Nonanol	0,2			Oxyde de caryophyllène	0,2

Selon la littérature, les études menées sur cette plante, nous amènent à conclure que l'huile essentielle de cette espèce est caractérisée par une prédominance de monoterpènes possédant un squelette de type *p*-menthane. Ces travaux nous permettent d'avancer l'existence de trois types chimiques :

- ❖ Chimiotype à pulégone (composé majoritaire), associé à d'autres constituants : soit au menthone et/ou isomenthone (**De Pooter et Schamp, 1986 ; De Pooter et al., 1987 ; Velasco-Negueruela et al., 1987 ; Souleles et al., 1987 ; Ristorcelli et al., 1996 ; Şarer et Pançali, 1998**), soit au menthol et ses isomères (**Adzet et Passet, 1972 ; Velasco-Negueruela et al., 1996**), soit au pipériténone (**Akgül et al., 1991**), soit encore au pipéritone et oxyde de pipériténone (**De Pooter et Schamp, 1986**). Par ailleurs, l'étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* récoltée en Corse (France), montre que certains échantillons sont

caractérisés par une forte teneur en menthone, suivi de pulégone (**Ristorcelli et al., 1996**).

- ❖ Le deuxième type est caractérisé par une prédominance de l'oxyde de pipéritone et/ou de l'oxyde de pipériténone (**De Pooter et Schamp, 1986 ; kokkalou et Stefanou, 1990 ; Kirimer et al., 1992 ; Fraternali et al., 1998 ; Mastelic et al., 1998**).
- ❖ Un type chimique (Carvone/1,8-cinéole) particulier a été signalé uniquement par **Pérez-Alonso et al. en 1993**.

Baldovini et al. (2000) ont étudié l'évolution de la composition chimique de l'huile de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, au cours du cycle végétatif de la plante afin de déterminer la période propice pour la récolte. Ensuite, ils ont analysé 40 échantillons de l'huile essentielle de cette même espèce récoltée dans différentes régions en Corse, durant la période de pleine floraison, afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme chimique au sein de cette plante.

Ces auteurs ont pu identifier 28 composés dans ces échantillons qui ont été soumis à un traitement statistique des données. Ceci, leur permis de définir trois groupes d'huiles essentielles au sein de la population :

- Le premier groupe (16 échantillons) est caractérisé par une prédominance en menthone (teneur moyenne : 43,4%), suivi de la pulégone (18,9%), de l'oxyde de pipéritone (8,3%) et de limonène (5,2%).
- Les échantillons (11) appartenant au groupe II, sont caractérisés par une forte teneur en oxyde de pipéritone (pourcentage moyen : 30,5%), suivi de l'oxyde de pipériténone (12,5%). Le limonène est également présent en forte proportion (12,4%).
- Dans les échantillons (13) du groupe III, le pourcentage moyen de la pulégone est de l'ordre de 55,6%, suivi de menthone (20,0%) et de limonène (6,0%).

Chapitre II : Techniques d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges plus ou moins complexes dont les constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits aliphatiques non terpéniques (**Bruneton, 1999**).

Toutefois, la valorisation de ces composés naturels passe nécessairement par une étape de caractérisation (analyse chimique). En effet, la détermination de la composition chimique a intéressé de nombreux chercheurs et les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées ont permis d'identifier un très grand nombre de constituants des huiles essentielles.

Ainsi, il existe une ou plusieurs techniques chromatographiques (CCM, CPG, CLHP) permettant d'individualiser les constituants et une ou plusieurs techniques spectroscopiques (SM, RMN ¹³C) qui permettent de les identifier.

II.1. Identification des constituants d'un mélange complexe

D'une façon générale, l'analyse d'un mélange complexe peut être effectuée selon deux voies A et B schématisées sur la figure (1) :

- La voie A met en oeuvre le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques, permettant d'individualiser les constituants et d'une ou plusieurs techniques spectroscopiques qui permettent de les identifier. D'une manière générale, cette voie s'avère être fort bien adaptée aux analyses de routine où l'identification des constituants ne présentant pas de difficultés majeures (huiles essentielles déjà étudiées, contrôle de qualité, ...).
- La voie B requiert, dans un premier temps, la purification des constituants du mélange même lorsque ceux-ci sont présents en faible quantité. Dans un deuxième temps, ces composés sont identifiés à l'aide de diverses techniques spectroscopiques (SM, IRFT, RMN du proton ou du carbone-13, à une ou deux dimensions). Cette méthode est forcément indispensable dans le cas de molécules nouvelles. Elle est évidemment d'une grande fiabilité quand les molécules sont déjà décrites dans la littérature mais elle demande beaucoup de temps.

- Une autre approche, la voie C, peut être envisagée. Elle utilise la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du carbone-13 comme technique d'identification des constituants d'un mélange complexe, sans séparation ni dérivatisation préalables ou éventuellement après une étape de séparation aussi réduite que possible. De plus, cette technique peut être utilisée pour la quantification des composés difficilement quantifiables avec les techniques habituelles.

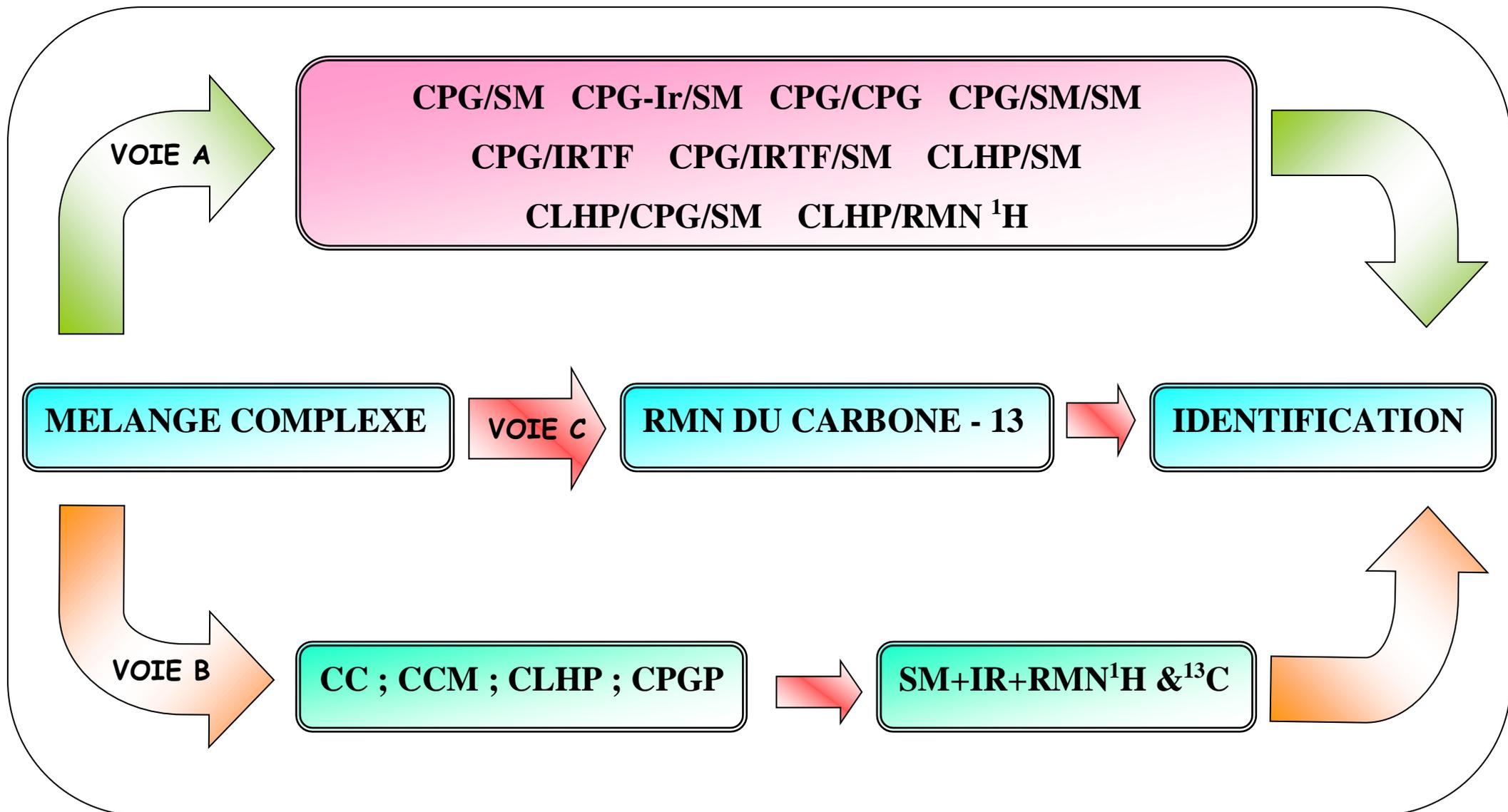


Figure (1) : Les méthodes d'analyse d'un mélange complexe

II.1.1. Méthodes d'analyses par couplage (chromatographie – spectroscopie) : Voie A

On attribue la découverte de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Synge, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage (**Martin et Synge, 1941 ; Arpino et al., 1995**).

La CPG est la technique la plus adaptée pour l'analyse des huiles essentielles compte tenu de la volatilité de leurs constituants (**Bruneton, 1999**).

C'est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Elle repose sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou aux dérivés de substances, qui se volatilisent dans des conditions de températures utilisées (**Pharmacopée Européenne, 2002**). Les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. L'identification d'une substance peut donc être facilitée par la connaissance de son temps de rétention. Les indices de rétention, plus fiables que les temps de rétention, sont privilégiés dans le cas d'analyse des huiles essentielles. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante (Indice de Kovats, IK) ou en programmation de température (Indices de rétention, IR) (**Kováts, 1965**).

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 co-éluer et présentent fortuitement des indices de rétention identiques.

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM) ou l'infrarouge (IRTF) qui permettent d'obtenir un spectre de la molécule et rendent possible la comparaison de ce spectre avec des spectres de molécules de référence. Ainsi, divers couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques sont utilisés :

1. Le couplage CPG-SM
2. Le couplage CPG-SM-SM
3. Le couplage CPG-IRTF
4. Le couplage CPG-CPG
5. Le couplage CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) avec une technique spectroscopique.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG-SM) est particulièrement intéressant pour l'identification des substances naturelles.

La SM est essentiellement employée pour déterminer la masse moléculaire des composés. Elle est fondée sur la mesure directe du rapport de la masse au nombre de charges élémentaires (m/z), positives ou négatives, d'ions en phase gazeuse obtenus à partir de la substance à analyser (**Fisher et Arnold, 2001, Pharmacopée Européenne, 2002**).

Le principe de cette technique de couplage consiste en une séparation des solutés dans le premier appareil (CPG-Ir). Ces derniers pénètrent ensuite dans l'ordre de leur élution dans le spectromètre de masse (SM) où ils vont subir une ionisation, puis une dissociation en fragments chargés positivement pour être analysés qualitativement.

Il existe un très grand nombre de techniques d'ionisation. La plus simple et la plus employée par les chimistes est la méthode de l'impact électronique (IE) qui est une technique d'ionisation forte. Dans la SM-IE, la source d'électron est un filament chauffé, ces électrons sont d'abord accélérés par un passage dans un champ électrique à grande différence de potentiel, avant de bombarder les molécules de l'échantillon en phase gazeuse (**Fisher et Arnold, 2001**).

Ainsi, le couplage de la CPG et de la SM en mode Impact Electronique (SM-IE) permet d'obtenir des informations structurales à partir des fragmentations observées et de connaître, dans la majorité des cas, la masse molaire d'un composé. Ce procédé permet donc d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales ou élaborées au laboratoire (**Adams, 1989 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Joulain et König, 1998 ; National Institute of Standards and Technology, 1999**).

L'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarités différentes (CPG), permet, en général, l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes dont les huiles essentielles (**Bilia et al., 2002 ; Adio et al., 2004 ; Chericoni et al., 2004 ; Senatore et al., 2004**). De plus, la mise au point d'un logiciel informatique qui tient compte simultanément des indices de rétention et des spectres de masse des composés, développé par **Vernin et al.** en **1986** et en **1988**, a facilité l'identification des constituants de nombreuses huiles essentielles.

I.1.2. Identification des constituants après purification : Voie B

L'identification de certains composés peut poser problème malgré l'utilisation de ces différentes techniques d'analyse complémentaires. En effet, certains constituants du mélange

peuvent être absents des bibliothèques de spectres commerciales ou construites au laboratoire. Ils doivent être isolés afin d'être identifiés par diverses méthodes spectroscopiques. Ces constituants peuvent être purifiés en utilisant différentes techniques chromatographiques comme la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP ou la chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP). La distillation fractionnée peut aussi être mise en œuvre. Après un degré de purification acceptable (supérieur à 95%), l'identification est ensuite effectuée par l'utilisation de plusieurs techniques spectroscopiques telles que l'ultra-violet (UV), l'infrarouge, la spectrométrie de masse, la RMN du proton et du carbone-13.

Bien que la purification suivie de l'identification de chaque constituant du mélange rende cette voie B longue à mettre en œuvre, celle-ci se révèle être particulièrement fiable et adaptée pour l'étude d'huiles essentielles de composition chimique complexe. D'ailleurs, elle connaît un regain d'intérêt pour l'analyse d'échantillons qui contiennent en particulier de nombreux sesquiterpènes oxygénés.

Ainsi, les nombreux travaux de **Weyerstahl et al.** menés sur diverses huiles essentielles extrêmement complexes (**Weyerstahl et al., 1996 ; Weyerstahl et al., 1997 ; Weyerstahl et Schlicht, 1997 ; Weyerstahl et al., 1999 ; Weyerstahl et al., 2000a, b, c**) illustrent bien l'intérêt de cette technique. Citons, à titre d'exemple, l'huile essentielle de vétiver d'Haïti qui est séparée en deux parties, une partie acide et une partie neutre. Ensuite, les auteurs ont effectué une séparation poussée de la fraction neutre qui est la plus importante, en combinant différentes techniques (distillation fractionnée, chromatographie sur colonne, transformation des alcools en éthers méthyliques). Au total, près de 150 constituants représentant pratiquement la totalité de la fraction neutre ont été identifiés en utilisant la CPG, la SM ainsi que la RMN (^1H et ^{13}C) (**Weyerstahl et al., 2000a**).

II.1.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable : Voie C

La voie A est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine, à l'opposé de la voie B qui garantit l'identification des composés. Cependant, les diverses étapes de fractionnement et de purification entraînent un investissement en temps très important. La voie B est donc généralement réservée à l'analyse des huiles essentielles complexes ainsi que des extraits. Une troisième voie (Voie C), intermédiaire par rapport aux précédentes, est basée sur l'étude du spectre de RMN du carbone-13 du mélange, sans séparation préalable pour l'identification et parfois pour la quantification des principaux constituants de mélanges

naturels. Cette technique a été développée au laboratoire et a fait l'objet de divers travaux depuis le début des années 1990.

La RMN du carbone-13 est utilisée depuis les années 80 pour confirmer l'identification, réalisée en général par CPG-SM, des constituants des mélanges complexes d'origines diverses : coupes pétrolières, produits agroalimentaires, huiles essentielles. Toutefois, bien qu'ayant donné des résultats intéressants et fiables, cette technique d'analyse n'était pas utilisée en temps que méthode propre d'identification, généralisable à différentes familles chimiques. En effet, au début la RMN servait à confirmer des molécules majoritaires proposées par CPG-IK ou par la CPG-SM. Dans ce contexte, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point et développé, depuis les années 90, une méthode d'analyse des mélanges complexes naturels basée sur la RMN du carbone-13, efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996).

II.1.3.1. Intérêt de la RMN du carbone-13

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment magnétique qui le rend environ 5700 fois moins sensible que le proton (Günther, 1994), le carbone-13 est malgré tout préféré aux autres noyaux car :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non-équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du carbone-13 autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule.
- Les spectres de RMN du carbone-13 peuvent être simplifiés par irradiation totale des hydrogènes, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. Cette irradiation permet d'augmenter l'intensité des signaux par l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) (Wilkinson et Neuhaus, 1989).
- Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles.
- Enfin, la RMN étant une technique non-destructive, l'échantillon peut être récupéré et éventuellement soumis à d'autres analyses.

II.1.3.1.1. Identification des constituants en mélange

L'identification des constituants d'un mélange par RMN du carbone-13 est basée sur la comparaison des déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux de composés

de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés. Il est donc nécessaire que l'enregistrement du spectre du mélange et des spectres des composés de référence soit réalisé avec des conditions expérimentales optimisées et standardisées afin d'éviter des variations importantes de déplacement chimique.

II.1.3.1.2. Observation et individualisation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dépend de la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B), du nombre d'acquisitions, de la masse de produit disponible, de sa solubilité dans le solvant choisi ainsi que de sa viscosité. L'augmentation du nombre d'accumulations permet de palier à un manque de sensibilité de l'appareil (pour les spectromètres de routine ou à champs moyen), mais cela entraîne un temps d'utilisation plus important. En effet, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisition, le temps d'analyse devient rapidement prohibitif.

Grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité du champ magnétique des aimants (la détection d'une dizaine de microgrammes de produit est réalisable en proton avec un 300 MHz alors que le seuil du microgramme peut être atteint, dans les mêmes conditions, avec un 400 MHz). D'autre part, plus le champ magnétique est élevé, plus la séparation des signaux de résonance des différents noyaux est importante. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (polymères et protéines par exemple) dont les spectres sont extrêmement complexes.

Tout au long de la chaîne de traitement du signal, un signal indésirable de caractère aléatoire, le bruit, se superpose au signal de la molécule à étudier. Les traitements du signal (FID) peuvent améliorer la résolution, plusieurs techniques sont possibles. Parmi celles-ci nous pouvons citer :

- l'utilisation de fenêtres réduites qui permet d'enregistrer le spectre sur la largeur voulue. Par exemple, en **1989**, **Aleman** qui, en enregistrant le spectre d'un mélange des deux diastéréoisomères du farnésane (2, 6,10-triméthyl dodécane) avec un appareil opérant à 5,8 T, a pu observer 29 signaux sur les 30 attendus, certains d'entre eux n'étant séparés que de 0,003 ppm ;

- la méthode du « Zero Filling » qui consiste à faire suivre par des valeurs numériques nulles les valeurs du signal numérisé du signal avant transformée de Fourier. Le zero-filling a pour but d'augmenter artificiellement la résolution numérique puisque la largeur spectrale ne change pas et que le nombre de points qui définit la taille du spectre augmente (**Günther, 1994**);

- la transformation de Lorentz-Gauss qui est utilisée pour faciliter la séparation de signaux de fréquences extrêmement voisines. L'utilisateur doit rechercher un compromis entre les différentes options qui lui permettent de modifier la résolution, la forme des raies, le rapport signal sur bruit et ceci en fonction du signal disponible et de la nature des informations recherchées dans le spectre, mais cette multiplication exponentielle entraîne des distorsions dans l'intensité des pics.

II.1.3.2. Attribution des signaux

L'intérêt de la spectroscopie de RMN réside dans sa capacité à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule. En effet, les déplacements chimiques des noyaux de carbone-13 subissent l'effet de l'environnement électronique des noyaux voisins. Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre. Le déplacement chimique est le paramètre essentiel pour l'identification d'un composé par RMN du carbone-13. De même, l'ensemble des déplacements chimiques des carbones d'une molécule constitue une série de données particulièrement caractéristiques.

Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structure différente présentent des spectres de RMN du ^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés, dans la mesure où la moindre modification structurale s'accompagne de variations, plus ou moins importantes mais généralement mesurables, des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones de la molécule.

De plus, les valeurs de déplacements chimiques d'une molécule sont indépendantes de la valeur du champ magnétique B_0 , des séquences impulsionnelles, des paramètres d'enregistrement des spectres et du traitement du signal. Elles sont aussi peu influencées par la présence d'autres molécules avec les faibles concentrations utilisées pour l'enregistrement des spectres. L'utilisation des spectres décrits dans la littérature comme données de référence pour l'identification des composés en mélange est possible. Néanmoins, la meilleure reproductibilité possible des déplacements chimiques ne sera obtenue qu'avec des conditions

d'analyse (concentration, nature du solvant) rigoureusement identiques. Il apparaît donc qu'un composé peut être identifié par la reconnaissance des déplacements chimiques de ses carbones dans le spectre d'un mélange.

Ainsi, chaque molécule est définie par une série de déplacements chimiques qui lui sont propres. Il est donc possible d'identifier un composé en comparant ses déplacements chimiques avec ceux de produits de référence. Il va sans dire que des résultats plus précis seront obtenus quand les spectres des composés de référence sont enregistrés au laboratoire avec les mêmes conditions analytiques (température, solvant, concentration, appareillage, ...) que celles du mélange inconnu, plutôt qu'en utilisant les données de la littérature (surtout si elles ne sont pas récentes).

On peut citer quelques exemples où la RMN du carbone-13 est utilisée pour identifier les constituants de mélanges complexes.

Formáček et Kubeczka ont réalisé des travaux sur l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles par RMN du carbone-13, en constituant leur propre bibliothèque de spectres et en analysant les huiles essentielles dans les mêmes conditions expérimentales. Ces auteurs ont montré qu'il était possible de confirmer la présence de terpènes dans une huile essentielle, par ailleurs mis en évidence par CPG (**Formáček et Kubeczka, 1982 ; Kubeczka et Formáček, 1984 ; Kubeczka et al., 1988**).

Une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13 a été développée par **Ferreira et al.** en **2001**. Elle est basée sur la comparaison du spectre du mélange avec de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Les valeurs des déplacements chimiques du mélange et la multiplicité de chacun des carbones déterminée par des séquences DEPT sont pris en compte par un logiciel informatique. Il propose une identification après consultation de la banque de spectres décrits dans la littérature.

II.1.3.3. La méthode d'analyse développée au laboratoire par l'équipe « Chimie et Biomasse »

Depuis plusieurs années, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du carbone-13 comme outil d'analyse des mélanges complexes. Cette méthode a pour but l'identification et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans une étape préalable de purification.

Elle est basée sur la comparaison des déplacements chimiques présents dans le spectre du mélange complexe avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques

de spectres (Figure 2). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges sont réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (concentration, nature du solvant, paramètres d'enregistrement des spectres). Un logiciel d'aide à l'identification a été mis au point et développé au laboratoire, il tient compte de plusieurs paramètres :

- Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;

- le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones de deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou quand les composés présents ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;

- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence.

De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

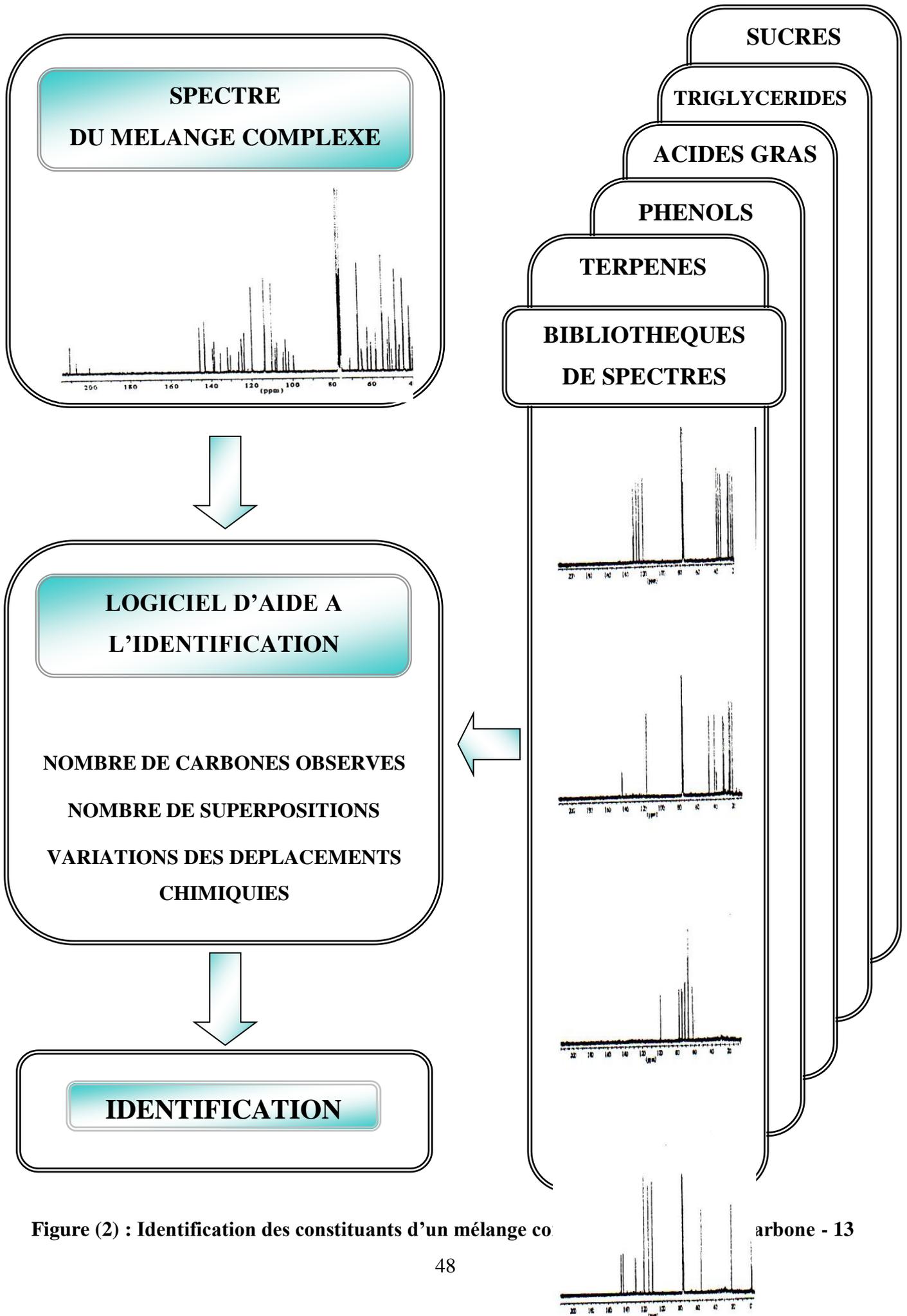


Figure (2) : Identification des constituants d'un mélange complexe

Cette méthode d'analyse, qui allie rapidité et fiabilité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Dans le domaine des huiles essentielles et avec un appareil de routine (4,7 Tesla soit 200 MHz en RMN du proton et 50 MHz en RMN du carbone-13), des résultats très intéressants ont été obtenus. Avec l'expérience acquise par cette équipe, Ils sont capables d'aboutir aux points suivants :

- Dans un même mélange, jusqu'à 24 composés ont été identifiés simultanément au cours d'une analyse.
- La teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre est de l'ordre de 0,5%.
- En général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires appartenant aux composés minoritaires.
- Le nombre de superpositions est limité et n'empêche pas l'identification d'un composé.
- Les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol...) dont certains carbones présentent de plus importantes variations de déplacement chimique selon la polarité et le caractère protique des autres constituants du mélange.

Cette méthode a été appliquée à différentes familles de composés (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental adapté. Pour cela, différentes bibliothèques de spectre de composés de référence appartenant à différentes familles ont été créées. Ces banques sont continuellement enrichies avec des spectres de produits isolés des mélanges naturels ou encore préparés par héli-synthèse.

A l'heure actuelle, la banque la plus importante enregistrée au laboratoire est celle des terpènes (mono-, sesqui- et diterpènes). Elle contient les données de plus d'un millier de molécules. Par ailleurs, d'autres bibliothèques élaborées à partir de données de la littérature récente ont été conçues. Ces données concernent d'une part les sesquiterpènes et les diterpènes et d'autre part les triterpènes, les sucres les lipides et les phénols.

Les composés volatils identifiés à partir du spectre de RMN du carbone-13, sont ensuite repérés sur le chromatogramme du mélange par comparaison de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire avec ceux des produits de référence, permettant ainsi de les quantifier. Dans le cas de molécules non volatiles ou thermosensibles, la quantification peut

être réalisée par RMN (Castola et al., 1999 ; Castola et al., 2000a ; Baldovini et al., 2001 ; Rezzi et al., 2002 ; Rezzi et al., 2005).

L'analyse par RMN du carbone-13 s'est révélée particulièrement efficace dans plusieurs cas. Nous rappelons ici quelques études réalisées au sein du laboratoire.

L'efficacité de la RMN ^{13}C a été illustrée par l'identification des stéréoisomères du farnésol dans l'huile essentielle de néroli (Bradesi et al., 1995). Elle a permis d'identifier aisément les α - et β - funébrènes des α - et β -cédrenes dans les huiles essentielles de bois de cèdre (Tomi et al., 1995) et de *Cupressus funebris* (Hoi et al., 1997). Elle s'est révélée efficace pour l'identification des deux aldéhydes sesquiterpéniques irréguliers possédant un squelette de type lavandulane dans l'huile essentielle de *Santolina corsica* (Ferrari et al., 2005 a,b). Elle a permis également de distinguer la shyobunone et son épimère dans l'huile essentielle de *Daucus carota* (Gonny et al., 2004).

La RMN ^{13}C a été utilisée comme outil d'analyse dans l'identification et la quantification de molécules thermosensibles telles que le furanodiène dans l'huile essentielle et les extraits au solvant de *Smyrniium olusatrum* (Baldovini et al., 2001), ainsi que l'ascaridole dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* (Cavalli et al., 2004). En effet, le furanodiène se transpose thermiquement en furanoélémente dès 140 °C, en partie dans le détecteur et en partie dans la colonne de chromatographie au cours de l'analyse par CPG. De même, l'ascaridole se réarrange en isoascaridole sous l'effet de la température.

La RMN du carbone-13 s'est aussi avérée particulièrement performante pour l'identification et la quantification de composés « lourds » ou peu volatils comme les triterpènes du liège (Castola et al., 1999 ; Castola et al., 2002 ; Castola et al., 2005), et d'un extrait de *Santolina corsica* (Ferrari et al., 2005a), les acides diterpéniques contenus dans les résines de pins (Rezzi et al., 2002 ; Rezzi et al., 2005), les sucres des miels de Corse (Mazzoni et al., 1997), ainsi que les composés phénoliques et les sucres présents dans les liquides de pyrolyse de la biomasse (Bighelli et al., 1994 ; Castola et al., 2000a).

Pour les huiles essentielles, la RMN ^{13}C mise au point et développée au laboratoire, associée ou non au couplage CPG-SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles de plantes de Corse, de Sardaigne et du pourtour méditerranéen. Nous pouvons citer quelques exemples.

En association avec la CPG-SM et la CPG-Ir, la RMN ^{13}C a permis l'analyse des huiles essentielles de *Myrtus cmmunis* subsp. *communis* de Corse (Bradesi et al., 1997), de 3

espèces d'*Ocimum* de Sao Tomé (*O. Canum*, *O. gratissimum*, *O. minimum*) (Martins et al. 1999), de trois espèces de *Piper* d'Amérique du Sud (*P. arboreum*, *P. fimbriulatum*, *P. obliquum*) (Muselli et al., 1999).

Combinée avec la CPG-Ir, la RMN ¹³C a été mise en œuvre pour la caractérisation des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* et subsp. *glandulosa* (Ristorcelli et al., 1996), *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* (Ristorcelli et al., 1998), de *Xylopi aethiopica* de la Guinée (Tomi et al., 1996), de *Illicum griffithii* de Viêt-Nam (Tam et al., 1998 ; Tam et al., 2005) et de *Lavandula dentata* (Bousmaha et al., 2006) et du *Rosmarinus officinalis* de l'Algérie (Atik-Bekkara et al., 2007).

De même la RMN ¹³C a été utilisée en complément à la chromatographie sur colonne de silice et à la CPG-Ir pour l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* (Mariotti et al., 1997), de *Daucus carota* (Mazzoni et al., 1999).

Par ailleurs, la RMN ¹³C a été combinée avec la chromatographie sur colonne de silice, la CPG-Ir et la CPG-SM pour la détermination de la composition chimique des huiles essentielles de plusieurs espèces de Corse, à savoir : *Ferula arrigonii* Bocchieri (Filippini et al., 2000), *Rosmarinus officinalis* de Corse et de Sardaigne (Pintore et al., 2002) et *Juniperus communis* subsp. *Alpina* (Gonny et al., 2006), ainsi que de Madagascar : *Cedrelopsis grevei* H. Baillon (Cavalli et al., 2003), de Viêt-nam : *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. (Muselli et al., 1999) et *Fokiena hodginsii* (Lesueur et al., 2006), de la Côte d'Ivoire : *Isolona cooperi* (Boti et al., 2005), et *Cymbopogon giganteus* (Boti et al., 2006a), et de l'Algérie : *Thymus ciliatus* subsp. *eu-ciliatus* (Bousmaha et al., 2007).

Enfin, la RMN ¹³C s'est aussi avérée particulièrement performante pour l'étude de la variabilité chimique de nombreuses plantes. Ainsi, combinée à la CPG-Ir et à la CPG-SM, elle a été utilisée pour la caractérisation des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* (Castola et al., 2000b), *Calamintha nepeta* (Baldovini et al., 2000), *Pinus nigra* subsp. *laricio* (Rezzi et al., 2001a), *Juniperus phoenicia* subsp. *turbinata* (Rezzi et al., 2001b ; Cavaleiro et al., 2001), *Baeckea frutescens* du Viêt-Nam (N'Guyen thi tam et al., 2004), *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Boti et al., 2006b), d'*Abies alba* Mill. (Duquesnoy, 2006) et de *Lavandula dentata* var. *dentata* de l'Algérie (Bousmaha et al., 2005). Par ailleurs, plus de 200 variétés d'agrumes appartenant au genre *Citrus* (mandarines, clémentines, cédrats, bigaradiers) et cultivées en Corse ont fait l'objet d'une étude globale (Lota et al., 2000 ; Lota et al., 2001a,b ; Lota et al., 2002) , visant à proposer une aide à leur classification taxonomique, sur la base de la composition chimique de leurs huiles essentielles de zestes et de feuilles.

Chapitre III : Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

III.1. Activité antibactérienne, Mécanismes d'action et résistance aux antibiotiques

Avant la découverte des antibiotiques, les pathologies infectieuses bactériennes entraînaient, dans la majorité des cas, la mort : la peste au Moyen Âge, la tuberculose, les blessures infectées sur les champs de bataille en sont des exemples.

Avec la découverte des sulfamides et, plus tard, de la pénicilline, on est passé à l'ère antibiotique au cours de laquelle la guérison des pathologies bactériennes est considérée comme habituelle (Alami et al., 2005).

En 1942, Selman Waksman donna le nom d'antibiotique à toutes les substances antibactériennes. Un antibiotique est un dérivé produit par le métabolisme de microorganismes, possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenues par hémisynthèse. Les antibactériens obtenus par synthèse totale comme les 4-quinolones, les sulfamides, le triméthoprime...etc, sont des agents antibactériens de synthèse et non des antibiotiques *stricto sensu* (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999 ; Nauciel et Vildé, 2005).

Les agents antibactériens sont classés selon leurs cibles bactériennes. Il s'agit de cinq mécanismes (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999) :

1. Le blocage de la synthèse de la paroi bactérienne
2. L'inhibition de la synthèse des protéines
3. L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques
4. L'altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique
5. Une inhibition de la synthèse de divers métabolites.

Les antibiotiques ont été très efficaces pour le traitement de nombreuses maladies qui étaient un fléau pour le genre humain. Ils ont été qualifiés de « médicaments miracles » car ils provoquent une spectaculaire guérison pour des maladies autrefois considérées comme incurables (Perry et al., 2004).

Après plus de 50 ans d'utilisation massive des antibiotiques, nous arrivons maintenant à une période plus délicate. Le monde bactérien est capable de s'adapter à une nouvelle situation écologique, y compris à la présence des antibiotiques. En développant des stratégies de résistance vis-à-vis des molécules d'antibiotiques, les bactéries reprennent l'avantage. En effet, l'emploi intensif des antibiotiques, tant en médecine humaine que vétérinaire, mais aussi pour des usages phytosanitaires, est directement relié à l'augmentation des résistances et à la perte d'intérêt d'un grand nombre de molécules (Alami et al., 2005).

III.1.1. Mécanismes de résistance

III.1.1.1. Mécanismes génétiques

Au plan génétique, la résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**).

La résistance acquise affecte seulement quelques souches d'espèces naturellement sensibles, à la suite d'évènements génétiques variés : mutations chromosomiques ou acquisition de gènes. Il peut s'agir d'une mutation qui peut entraîner, par exemple une modification de la cible de l'antibiotique ou bien diminuer sa pénétration. Pour les gènes acquis, le plus souvent, il s'agit de l'acquisition d'ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes. L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison. Elle se fait par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistance (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999 ; Chevalier et al., 2003**).

III.1.1.2. Mécanismes biochimiques

Les trois mécanismes biochimiques principaux de la résistance aux antibiotiques sont le défaut d'accumulation, la détoxification enzymatique de l'antibiotique et l'absence de cible ou d'affinité de (s) cible (s). Ces mécanismes biochimiques sont effecteurs aussi bien des résistances naturelles que des résistances acquises. La résistance acquise par mutation chromosomique est souvent associée à une diminution de l'accumulation de l'antibiotique ou à une altération des cibles, alors que la résistance par acquisition de gènes est généralement liée à la production d'enzymes inactivantes (**Chevalier et al., 2003**).

Par ailleurs, de nombreuses questions se posent à l'heure actuelle sur la toxicité des substances synthétiques. Or ces produits non seulement enravent l'infection mais affaiblissent en même temps l'organisme qui par la suite aura des difficultés à recréer son propre système de défense. De plus, la prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents antimicrobiens a entraîné la sélection de souches multirésistantes

Enfin, certaines souches « hospitalières » sont résistantes pratiquement à tous les antibiotiques et cela particulièrement dans les services où l'on traite des maladies immunodéprimés et chez qui l'on pratique des gestes invasifs exploratoires et thérapeutiques (réanimation, oncologie sida,...). D'autres parts, chez ces malades, de nouvelles bactéries commensales ou opportunistes provenant de l'environnement, souvent multirésistantes, sont responsables de syndromes infectieux graves (**Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999**).

La résistance aux antibiotiques est devenue un grave problème de santé public touchant la quasi-totalité des agents antibactériens dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques perdent de leur efficacité et les maladies que l'on croyait éradiquées réapparaissent. Des bactéries autrefois sensibles développent donc des résistances à des médicaments jusque-là efficaces. Ces bactéries sont courantes à l'hôpital et parmi elles, les entérobactéries et les souches de *Staphylococcus aureus*. Cette diminution de l'efficacité des moyens de lutte oblige de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides. Nous citerons comme exemple, les huiles essentielles, extraites de plantes aromatiques, qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies, et pour améliorer santé et bien être. En effet, de récentes études ont pu revaloriser les essences et prouver que leur action antibiotique est exempte de toutes réactions secondaires sur les fonctions de l'organisme. En prenant connaissance de ces possibilités inestimables et des résultats positifs obtenus en laboratoire, on devrait être convaincu par ce type de traitement et le préférer à d'autres.

III.2. Les huiles essentielles

III.2.1. Définition

Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une feuille, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée.

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

III.2.2. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs :

III.2.2.1. En désinfection de l'air

Les systèmes de traitement d'air des bâtiments abritent de nombreux microorganismes susceptibles d'avoir des effets néfastes sur la santé des personnes exposées, en particulier dans le milieu hospitalier. Cependant, les huiles essentielles sont composées d'un grand nombre de molécules volatiles. En diffusion dans l'atmosphère, ou diluées dans les produits

de nettoyage, elles désinfectent, désodorisent et parfument agréablement et naturellement l'air. Elles créent un espace de senteurs agréables et chassent les mauvaises odeurs. En éliminant 90% du niveau bactérien, elles assainissent l'air et constituent une excellente protection contre la pollution. La diffusion atmosphérique est la manière la plus simple d'utiliser les huiles essentielles pures. Leur parfum favorise une ambiance agréable et sont bienfaites pour la santé. Cette pratique régulière prévient également des affections microbiennes en renforçant les défenses immunitaires.

On peut les utiliser également pour l'assainissement de l'atmosphère des locaux tels que la conservation du patrimoine bibliographique des musées et des archives (**De Billerbeck, 2000 ; 2002**), ou pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (**Pibiri et al., 2001**).

III.2.2.2. En agroalimentaire

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antioxydantes et antimicrobiennes sur plusieurs bactéries responsables de la pollution des aliments et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires (**Kim et al., 1995 ; Dorman, 1999**).

Récemment, **Oussalah et al. (2007)** rapportent que les huiles essentielles d'origan, de sarriette et de la cannelle sont les plus efficaces contre la croissance de quatre bactéries pathogènes (*E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeria monocytogenes*) les plus couramment responsables de la détérioration des aliments. Ils avancent également que leur ajout en très faibles quantités directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) ou l'application par vaporisation en surface (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à contrôler la flore microbienne, à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation et n'altère pas les qualités organoleptiques de l'aliment. En effet, L'application de bio-films contenant des huiles essentielles sur des tranches de viande contaminée, a permis de réduire très significativement la croissance de bactéries pathogènes au delà d'une semaine d'entreposage.

Les huiles essentielles ont également des propriétés fongicides. Elles sont utilisées en tant que pesticides car elles ne sont pas toxiques pour les plantes et sont facilement biodégradables (**Mahadevan, 1982**) et sont très efficaces contre les moisissures responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leur stockage (**Dwivedi et Singh, 1998 ; Mejholm et Dalgaard, 2002**).

III.2.2.3. En traitement des infections

Les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques ; ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies et les infections (**Buchbauer et Jirovetz, 1994**). Les perspectives d'application sont nombreuses comme, par exemple, le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale (**Shapiro et al., 1994**) et du système respiratoire (**Inouye et al., 2001**). Ces auteurs ont montré que les huiles essentielles de thym, d'écorce de cannelle, de lemongrass, de périlla et de menthe poivrée se sont révélées très efficace sur les principaux germes pathogènes responsable des infections respiratoires, notamment *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoneae*, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*.

III.2.3. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* (**Dorman et Deans, 2000 ; Oussalah et al., 2007**) et *in vivo* (**Ohno et al., 2003 ; Chami et al., 2004**).

III.2.3.1. Mode d'action contre les bactéries

Plusieurs travaux sont menés pour comprendre le mécanisme d'action des huiles essentielles (**Chang et al., 2001**). Certains auteurs suggèrent que ces produits naturels pénètrent à l'intérieur de la cellule microbienne et sont susceptibles d'interférer avec son métabolisme cellulaire (**Marino et al., 2001**). D'autres avancent que les huiles essentielles perturbent le bon fonctionnement de la membrane plasmique et réagissent avec les sites actives des enzymes ou servent de transporteur de proton en réduisant la synthèse de l'ATP (**Chang et al., 2001 ; Ultee et al., 2002**). Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (**Oussalah et al., 2006 ; Burt, 2004**) :

- attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et al., 2002**). Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol), les alcools (α -terpinéol, terpinéol-4 et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (**Cosentino et al., 1999 ; Dorman et Deans, 2000**).

Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (**Dorman et Deans, 2000**).

Les aldéhydes peuvent induire des réactions de transferts d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (**Dorman et Deans, 2000**).

Les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. En effet, la plupart des études avancent que le principal site d'action des huiles essentielles est la membrane plasmique (**Shunying et al., 2005**), car le caractère hydrophobe des huiles essentielles leur permet de se lier avec les lipides de la membrane plasmique (**Burt, 2004**) qui perd sa structure et devient plus perméable aux ions potassium et proton. Ceci entraîne une diminution du gradient pH, du potentiel membranaire et une inhibition de la synthèse d'ATP, qui s'ensuit par la mort de la bactérie (**Ultee et al., 1999 ; Ultee et al., 2000 ; Burt, 2004**). En outre, **Walsh et al. (2003)** rapportent que le thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles, il provoque des fuites d'ions potassium K^+ .

III.2.3.2. Mode d'action contre les champignons

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux (**Karaman et al., 2001 ; Rasooli et Razzaghi Abyaneh, 2004 ; Teixeira Duarte et al., 2005**). L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**). En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Knobloch et al., 1989**). Ils ont constaté également que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique.

Partie
Expérimentale

I. Introduction

L'exploration du règne végétal a déjà permis la découverte de molécules importantes dans le domaine médical. Actuellement notre espoir est de trouver des molécules à très grande efficacité anti-bactérienne car la résistance aux antibiotiques est devenue un grave problème de santé publique touchant la quasi-totalité des agents antibactériens dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques perdent de leur efficacité et des maladies que l'on croyait éradiquées réapparaissent.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés de valoriser six espèces végétales à savoir : *Thymus fontanesii* (Boiss. et Reut.), *Origanum glandulosum* (Desf.), *Ammoides verticillata* (Desf.), *Mentha pulegium* (L.), *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. et *Ziziphora hispanica* (L.) poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen.

Dans cette partie, nous avons envisagé la partie expérimentale ou nous présenteront les techniques utilisées dans ce travail et qui se déroule en deux axes :

Dans le premier axe, nous avons effectué une analyse chimique dont les étapes sont les suivantes :

- Extraction des huiles essentielles des différentes espèces végétales.
- Caractérisation des huiles essentielles de ces plantes (qui a été réalisée dans le laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'Université de Corse, UMR CNRS 6134) par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques (chromatographie en phase gazeuse (CPG-Ir), chromatographie sur colonne de silice (CC) effectué uniquement pour l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CPG-SM) réalisée pour les huiles essentielles de *Ziziphora hispanica* et de *Thymus fontanesii*, une spectroscopie de résonance magnétique du carbone 13 (RMN ¹³C)).

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressées au pouvoir antibactérien des huiles essentielles de ces espèces végétales vis-à-vis de 18 souches appartenant au Gram (+) et au Gram (-). Pour cela, nous avons procédé à la vérification de la purification des différents germes et à l'identification des souches d'origine hospitalière. Ensuite, nous avons évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles en effectuant quatre méthodes :

- Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), qui permet d'évaluer rapidement l'activité antibactérienne des huiles essentielles des différentes plantes (**Jacob et al., 1979**).

- Dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale d'inhibition (CMI) par la méthode de contact direct, basée sur l'utilisation sous forme d'émulsion de ces produits non miscibles à l'eau (**Bendjilali et al., 1986**) ;
- Méthode de Maruzuella, permettant de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) et de tester le pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'huile essentielle dans un émulsifiant. Elle fait agir directement l'huile essentielle sur les microorganismes en suspension dans le bouillon (**Beylier-Maurel, 1976**) ;
- Méthode de microatmosphère, qui permet d'évaluer l'activité des substances volatiles et de déterminer la quantité minimale inhibitrice (QMI) (**Benjilali et al., 1984**).

Les résultats obtenus en testant le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* ont été soumis à un traitement statistique des données.

II. Matériel végétal

II.1. Situation géographique des stations d'étude

Les principaux facteurs géographiques qui influent de façon significative sur la végétation en Algérie, comme partout ailleurs, sont le climat (précipitations, températures, vents, radiation solaire), le sol et l'altitude. En outre, c'est surtout l'équilibre délicat de ces facteurs qui joue un rôle primordial à la fois dans le développement individuel des plantes et dans leur distribution (**Béniston, 1984**).

La récolte des différentes espèces a été effectuée dans la région de Tlemcen (l'Ouest de l'Algérie), dans différentes stations, à savoir : Pierre du Chat, Sidi-Snoussi, Remchi, Sebâa-Chioukh, Sebdou, Beni-Mester, Terni et Maghnia (Tableau 13, figure 3).

Les situations géographiques ainsi que les étages bioclimatiques des différentes stations (confirmés par Mr Bouabdellah, membre du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels, au département de Biologie et Environnement) sont représentées dans le tableau (13).

Tableau (13) : Provenance des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations

Plantes	Stations	Localisation	Etages bioclimatiques	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)
<i>Ammoïdes verticillata</i> <i>Mentha pulegium</i>	Pierre du Chat	Bassin de Tlemcen (plaine de Remchi)	Semi-aride, chaud	100	35° 01'	1° 11'
<i>Thymus fontanesii</i>	Sidi- Snoussi	Bassin de Tlemcen	Semi-aride, chaud	500	35°	1° 07'
	Remchi	Bassin de Tlemcen	Aride, chaud	220	35°	1° 20'
	Sebâa- Chioukh	Bassin de Tlemcen Monts de Sebâa Chioukh	Semi-aride, chaud	600	35° 05'	1° 10'
<i>Thymus fontanesii</i> <i>Origanum glandulosum</i> <i>Ziziphora hispanica</i>	Sebdou	Secteur Tell méridional Zone I plat	Semi-aride, doux	900	34° 37'	1° 20'
<i>Origanum glandulosum</i>	Beni Mester	Piedmont Nord des Monts de Tlemcen	Semi-aride, tempéré	670	34° 55'	1° 25'
	Terni	Monts de Tlemcen (cuvette)	Semi-aride, à hiver tempéré	1100	34° 50'	1° 22'
<i>Satureja calamintha subsp. nepeta</i>	Maghnia	Bassin de Tlemcen (Plaine de Maghnia)	Semi-aride, chaud	450	34° 52'	1° 47'

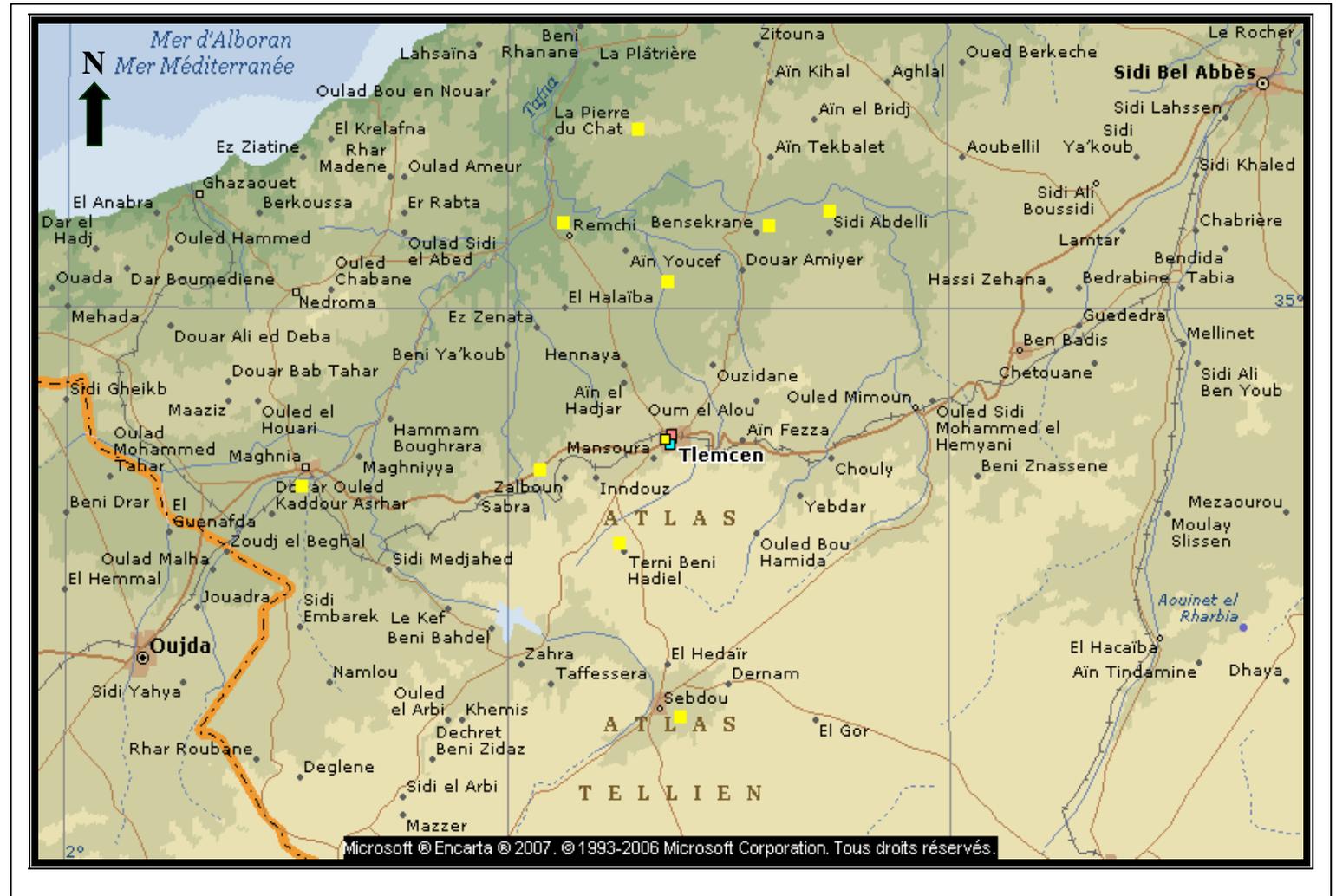
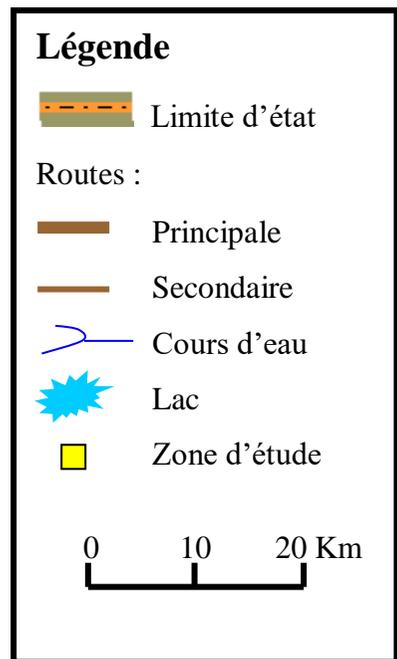
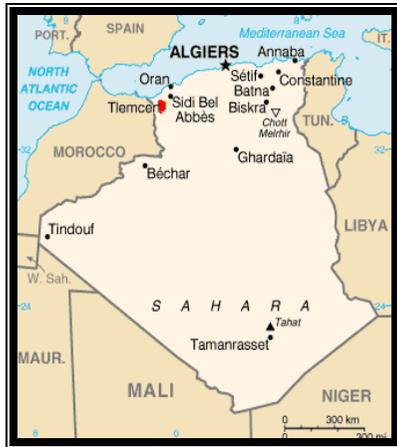


Figure (3) : Situation géographique des stations d'étude

II.2. La récolte du matériel végétal

La cueillette a été faite en période de pleine floraison (mois de Juin) sur 2 années successives pour *Thymus fontanesii* et *Ziziphora hispanica* (2004 / 2005) et sur 3 années successives pour *Ammoïdes verticillata*, *Mentha pulegium*, *Origanum glandulosum* et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (2003/2004/2005).

Après la récolte du matériel végétal, on procède à sa dessiccation comme suit : on l'étale sur du papier et on le laisse sécher à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à température ambiante. Le séchage est de 8 jours en moyenne pour les différentes plantes, puis conservées dans des sacs en papier.

II.3. Identification botanique

Les différentes espèces ont été identifiées par Monsieur le Professeur **Bouazza M.**

Les différentes plantes ont été classées dans le laboratoire de Monsieur le Professeur **Bouazza M.** (laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels) et dans notre laboratoire (Produits Naturels) et ont été enregistrées sous les références suivantes :

- L. 2359 pour *Thymus fontanesii* (Boiss. et Reut.)
- L. 2421 pour *Origanum glandulosum* (Desf.)
- A. 1961 pour *Ammoïdes verticillata* (Desf.)
- L. 2286 pour *Mentha pulegium* (L.)
- L. 2386 pour *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.
- L. 2313 pour *Ziziphora hispanica* (L.)

II.4. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

La distillation reste la méthode la plus utilisée pour l'obtention des composés d'arômes du fait qu'elle produit des substances volatiles facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse et exigeant une technologie relativement simple, donc un coût plus bas ainsi qu'une reproductibilité facilement contrôlable (**Benjlali, 2004**).

Nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles des différentes plantes. La distillation a été effectuée par un appareil de type Clevenger. Le temps d'extraction est de trois heures.

Seule les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) des différentes plantes sont utilisées sauf pour *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* pour laquelle, nous avons distillé que les feuilles

et les fleurs. Afin d'éliminer toute trace d'eau, nous avons séchées les huiles essentielles sur du sulfate de sodium (Na_2SO_4).

Pour éviter toute dégradation de l'huile essentielle due à l'action de l'air et de la lumière, nos échantillons étaient conservés au réfrigérateur ($0 - 4\text{ }^\circ\text{C}$) dans des tubes fumés et bien fermés.

Après chaque extraction, nous avons déterminé le rendement en huile essentielle qui est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse végétale sèche à traiter (**Carré, 1953**).

III. Analyse des huiles essentielles

Les analyses des huiles essentielles des six espèces de plantes par CPG-Ir et par RMN ^{13}C ont été effectuées au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse-CNRS.

III.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est la technique la plus adaptée pour l'analyse des huiles essentielles compte tenu de la volatilité de leurs constituants (**Bruneton, 1999**).

III.1.1. Conditions opératoires

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem (8500), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires de dimensions $50\text{ m} \times 0,22\text{ mm}$ (épaisseur du film: $0,25\text{ }\mu\text{m}$) :

- Une colonne polaire BP20, polyéthylène glycole
- Une colonne apolaire BP1, diméthylsiloxane
- Le gaz vecteur est l'hélium ($0,8\text{ ml/min}$), avec une pression en tête de colonne de 20 psi
- La température de l'injecteur est de $250\text{ }^\circ\text{C}$, celle du détecteur est de $250\text{ }^\circ\text{C}$
- La température linéaire est programmée depuis $60\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à $220\text{ }^\circ\text{C}$, à raison de $2\text{ }^\circ\text{C/min}$, suivie d'un palier de 20 min à $220\text{ }^\circ\text{C}$
- Injection automatique : $0,1\text{ }\mu\text{l}$ en mode Split ($1/60$).

III.1.2. Identification des constituants

Les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane ($\text{C}_8\text{-C}_{28}$) avec interpolation linéaire sur les deux

colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire (Joulain et König, 1998).

III.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Seules les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Ziziphora hispanica* ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), réalisée au laboratoire de « Chimie des Produits Naturels » de l'Université de Corse.

III.2.1. Conditions opératoires

Les huiles essentielles sont analysés à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue, BP-1 (polydiméthylsiloxane, de dimension 60 m x 0.22 mm, épaisseur du film 0.25 µm) ou Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol), couplé à un détecteur de masse Perkin TURBO MASS. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 150 °C par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

- Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi.
- La température linéaire est programmée depuis 60 °C jusqu'à 230 °C, à raison de 2 °C/min, suivie d'un palier de 45 min à 230 °C
- Spectre de masse à ionisation électrique obtenu au-dessus d'un intervalle de 35-350 Da.
- Injection automatique : 0,2 µl en mode Split (1/80).

III.2.2. Identification des constituants

La méthode d'identification est basée sur la comparaison du spectre de masse, obtenu pour chacun des composés de l'huile essentielle lors de la fragmentation de nos solutés, avec une banque de spectres de produits de référence (Adams, 1989 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Joulain et König, 1998 ; National Institute of Standards and Technology, 1999).

Actuellement le laboratoire de « Chimie des Produits Naturels », de l'Université de Corse, possède cinq banques de spectres différentes, deux banques propres au laboratoire et trois banques commerciales.

III.3. Analyse par spectroscopie de la résonance magnétique du carbone 13 (RMN ¹³ C)

La RMN du ¹³C selon la méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse (Tomi et al., 1995), est basée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire.

III.3.1. Conditions opératoires

Les spectres RMN ont été enregistrés dans le chloroforme deutéré, sur spectromètre de marque « Bruker AVANCE 400 », opérant à 100,623 MHz pour le carbone 13, sous les conditions opératoires suivantes : Sonde de 5 mm, durée d'impulsion (PW) : 4 µs (angle 45 °), temps d'acquisition : 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 25 000 Hz (250 ppm), résolution digitale : 0,183 Hz/pt, mode de découplage pulsé (Composite Phase Decoupling), le nombre d'accumulation est compris entre 2000 et 3000 pour chaque enregistrement. Les déplacements chimiques sont des données en ppm (δ) (Tétraméthyl Silane) par rapport au TMS pris comme référence interne.

L'analyse d'un mélange est menée sur un échantillon de 40 mg dilué dans 0,5 ml de CDCl₃.

Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB=1,0 Hz).

III.3.2. Identification des constituants

L'identification est réalisée par la prise en compte du nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, du nombre de superpositions des signaux et des variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence (Δδ). En plus de ces paramètres qui sont directement accessibles par un logiciel élaborés au laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'Université de Corse (Tomi et al., 1995), l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Cette Technique permet l'identification de différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0,5% sans purification précédente.

III.4. Fractionnement de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Dans l'optique de mener une analyse plus approfondie et donc d'identifier un plus grand nombre de composés pour l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, il était nécessaire

de combiner un fractionnement sur colonne ouverte de silice avec des analyses par CPG-Ir, CPG-SM et RMN du carbone-13 car cette huile contient un pourcentage élevé en pulégone (77,6 – 79,5%) qui nous a empêché d'identifier les autres composants qui se trouvent en faibles quantités.

Nous avons procédé à une chromatographie « Flash » de 1 g d'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, sur une colonne de silice (ICN 200-500 µm, 10 g), avec un solvant pur de pentane, un mélange de pentane/oxyde de diéthyle (95/5) et un solvant pur (oxyde de diéthyle), respectivement (Tableau 14).

Après humidification de 15 g de gel de silice (200 - 500 µm) -soit sur une longueur de 10 cm- par du pentane, on a placé 1 g d'huile essentielle. Des éluions successives de 100 ml de solvant ont été effectuées pour conduire à des fractions de polarité croissante.

Tableau (14) : Fractionnement de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Numéro de fraction	Pentane / Oxyde de diéthyle (%)	Poids des fractions (mg)
1	100/0	50
2	95/5	828
3	0/100	107

Les fractions ainsi obtenues ont été analysées par CPG-Ir et par RMN ¹³ C.

IV. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes espèces végétales

Depuis des millénaires, les essences sont exploitées pour leurs propriétés antiseptiques car elles s'opposent au développement des germes et les tuent. Leur pouvoir antiseptique est général bien qu'elles aient des compositions chimiques très différentes et il se vérifie aussi bien en présence de leur vapeur que par contact direct, même si elles sont diluées.

Il y a 500 000 plantes sur terre, 10 000 d'entre elles environ possèdent des propriétés médicinales et sont utilisées de par le monde. Leur champ d'action est vaste et leur puissance varie. Ainsi, la plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter divers cas. Aujourd'hui, les traitements par les plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérées comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries se sont peu à peu adaptées aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Essawi et Srour, 2000 ; Larousse, 2001**).

La nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche d'un principe actif dans les produits naturels d'origine végétal, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, issues de plantes aromatiques qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies et pour améliorer santé et bien être.

Pour cela, nous avons voulu étudier le pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes vis-à-vis de différentes bactéries de référence et celle d'origine hospitalière. Dans cette partie, nous allons traiter les points suivants :

- Provenance des germes ;
- Vérification de la purification et identification des souches d'origine hospitalière ;
- Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes espèces végétales.

IV.1. Provenance des germes étudiés :

Les souches pathogènes utilisées sont présentées dans le tableau (15). Elles sont parmi ceux qui causent les maladies les plus courantes, se sont des contaminants fréquents, provoquant ainsi des infections importantes.

Tableau (15) : Provenance des germes étudiés

Souches utilisées	Origine
BACTERIES	
Bactéries à Gram négatif	
– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₂) 22102004	Laboratoire de microbiologie (département de Biologie, université de Tlemcen).
– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₃) ATCC 27853	Laboratoire vétérinaire de Tlemcen (L.V.R.T.)
– <i>Escherichia Coli</i> (E ₄) ATCC 25922	
– <i>Klebsiella pneumoneae</i> (KL ₁) 5215773	
– <i>Klebsiella pneumoneae</i> (KL ₂) ATCC 700603	
– <i>Escherichia Coli</i> (E ₂) 5044552	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Tlemcen (C.H.U.)
– <i>Escherichia Coli</i> (E ₃) 5144572	
– <i>Escherichia Coli</i> (E ₆) 5044552	
– <i>Entrobacter cloaceae</i> (En) 1305573	
– <i>Salmonella typhi</i> (SL) 4404540	
– <i>Proteus mirabilis</i> (Pr) 0536040	
– <i>Citrobacter freundii</i> (Ci) 1554512	Laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Saïda (C.H.)
– <i>Escherichia Coli</i> (E ₁) 5044172	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Sidi Bel-Abés (C.H.U.)
Bactéries à Gram positif	
– <i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₁) ATCC 19111	Laboratoire de microbiologie (département de Biologie, université de Tlemcen)
– <i>Listeria monocytogenes</i> (L ₁₅) ATCC 19 115	
– <i>Staphylococcus aureus</i> (St ₁) ATCC 601	Laboratoire de phytopharmacie, Paris 7 (France)
– <i>Staphylococcus aureus</i> (St ₂) 6736153	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Sidi Bel-Abés (C.H.U.)
– <i>Staphylococcus aureus</i> (St ₃) ATCC 43866	Laboratoire vétérinaire de Tlemcen (L.V.R.T.)

IV.2. Vérification de la purification des bactéries et identification des souches d'origine hospitalière

Avant la détermination du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes espèces végétales, nous avons procédé à la vérification de la pureté des bactéries et à l'identification des souches d'origine hospitalière en étudiant leurs caractères morphologiques et biochimiques.

IV.2.1. Identification des bactéries

IV.2.1.1. Caractères étudiés

- Morphologie et coloration :
 1. Aspect des colonies
 2. Mobilité : examen à l'état frais
 3. Coloration de Gram
- Caractères biochimiques :
 1. Plaque API 20 E pour les entérobactéries et pour *Pseudomonas aeruginosa*
 2. Plaque API STAPH pour le *Staphylococcus aureus*

Les galeries API 20 E et API STAPH (Tableau 16) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou l'utilisation de sucres. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée avec une culture pure. Les réactions produites pendant la période d'incubation (24 h à 48 h à 37 ± 1 °C) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Tableau (16) : Liste des tests étudiés au niveau des plaques API

Tests étudiés	Souches	Souches	Souches
ONPG : Production de la β -galactosidase	-	ARA : Dégradation de l'arabinose	-
ADH : Production de l'arginine déshydrogénase	+	OX : Production de l'oxydase	-
LDC : Production de la lysine décarboxylase	-	NO₂ : Production de NO ₂	-
ODC : Production de l'ornithine décarboxylase	-	N₂ : Production de N ₂	-
CIT : Dégradation du citrate	-	FRU : Dégradation du fructose	+
H₂S : Production de H ₂ S	-	MNE : Dégradation du mannose	+
URE : Production de l'uréase	+	MAL : Dégradation du maltose	+
TDA : Production de la tryptophane désaminase	-	LAC : Dégradation du lactose	+
IND : Production d'indole	-	TRE : Dégradation du tréhalose	+
VP : réaction de Voges Proskauer	+	XLT : Dégradation du xylitol	+
GEL : Production de la gélatinase	-	NIT : Réduction des nitrates	+
GLU : Dégradation du glucose	+	PAL : Production de la phosphatase alcaline	+
MAN : Dégradation du mannitol	+	RAF : Dégradation du raffinose	+
INO : Dégradation de l'inositol	-	XYL : Dégradation du xylose	+
SOR : Dégradation du sorbitol	-	MDG : Dégradation du méthyl- α -D-glucopyranoside	+
RHM : Dégradation du rhamnose	-	NAG : Dégradation du N-acétyl-glucosamine	+
SAC : Dégradation du Saccharose	+		
MEL : Dégradation du mélibiose	+		
AMY : Dégradation de l'amygdaline	-		

+ : Testé chez *Staphylococcus aureus*

- : Testé chez les entérobactéries et chez *Pseudomonas aeruginosa*

IV.3. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes espèces végétales

Lors de cette étude, nous avons testé les huiles essentielles des différentes espèces végétales vis-à-vis de souches de référence et celles d'origine hospitalière qui aujourd'hui sont impliquées dans les infections nosocomiales et dont certaines ont acquises une résistance aux antibiotiques.

Dans un premier temps, nous avons testé l'action de ces huiles essentielles par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale d'inhibition (CMI) en milieu solide, la concentration minimale bactéricide en milieu liquide, puis nous avons évalué l'activité des substances volatiles sur les mêmes germes utilisés précédemment.

IV.3.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Nous avons utilisé la méthode de l'aromatogramme par diffusion sur des disques imprégnés d'huile essentielle (Jacob *et al.*, 1979). Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés d'huile essentielle pure (3 µl) (Janssen *et al.*, 1986 ; Janssen *et al.*, 1987 ; Sivropoulou *et al.*, 1995 ; Sokmen *et al.*, 2004) sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri (3 disques de papier filtre par boîte), préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension bactérienne de 10⁸ germes/ml pendant 5 à 10 min et l'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration (Shunying *et al.*, 2005).

En parallèle, nous avons utilisé des témoins afin de vérifier la croissance des différentes souches.

Après incubation à 37 ± 1 °C pendant 24 h, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm, disque inclus.

IV.3.2. Méthode de contact direct en milieu gélosé

Décrite par Beylier-Maurel en 1976 et modifiée par Bendjilali *et al.* en 1986, elle est basée sur l'utilisation sous forme d'émulsion de ces produits non miscibles à l'eau. L'émulsifiant utilisé est le Tween 80 dilué à 10% dans de l'eau distillée, puis stérilisée à 120 °C pendant 15 minutes. A 9 ml de cette solution, on ajoute, aseptiquement, 1 ml d'huile essentielle. On obtient ainsi la solution mère « SM », à partir de laquelle, on procédera à des dilutions successives pour obtenir les différentes concentrations voulues.

Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu de culture gélosé et encore en état de fusion, on ajoute aseptiquement 1,5 ml de la solution « SM » ou des diverses dilutions de cette solution (Tableau 17).

Dans le tube témoin, on ajoute 1,5 ml de la solution de Tween 80 dans de l'eau distillée.

On agite les tubes, on coule dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir.

Les milieux coulés en boîte de Pétri sont ensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension bactérienne de 10^8 germes/ml pendant 5 à 10 min et l'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration (Shunying et al., 2005).

Après une durée d'incubation qui se fait à 37 ± 1 °C pendant 24 h, on procède à la lecture des résultats par présence ou absence de croissance bactérienne.

Tableau (17) : Gamme de concentration (en µg/ml) des huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu gélosé

Huiles essentielles	S.M	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
<i>Thymus</i>	9540	954	95,4	9,54
<i>Origanum</i>	9130	913	91,3	9,13
<i>Ammoïdes</i>	9070	907	90,7	9,07

IV.3.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI (concentration minimale inhibitrice) correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999).

Pour déterminer les CMI (Tableau 18), nous avons suivi les mêmes étapes que pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne selon la méthode de contact direct, en variant les concentrations de l'huile essentielle dans le milieu gélosé.

Tableau (18) : Gamme de concentration (en µg/ml) d'huile essentielle utilisées pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice en milieu gélosé

Huiles essentielles	SM	1/2	1/3		1/10	1/11	1/12		1/100
<i>Thymus</i>	9540	4770	3180		954	870	800		100
<i>Origanum</i>	9130	4565	3040	...	913	830	760	95
<i>Ammoïdes</i>	9070	4535	3020		907	820	750		90

Remarque : Pour les *Pseudomonas*, on a augmenté la quantité d'H.E. dans la solution mère. On a mis 1,75 ml d'H.E. au lieu de 1 ml d'H.E.

IV.3.3. Méthode de contact direct en milieu liquide (Technique de Maruzzella)

Cette méthode, rapporté par **Beylier-Maurel** en **1976** permet d'évaluer le pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'huile essentielle dans de l'éthanol à 95% (**Sivropoulou et al., 1995 ; Chaibi et al., 1997**). Elle fait agir directement l'huile essentielle sur les microorganismes en suspension dans le bouillon Mueller-Hinton.

A 8,5 ml de la solution d'éthanol, on ajoute, aseptiquement, 1,5 ml d'huile essentielle. On obtient ainsi la solution mère « SM », à partir de laquelle, on procédera à des dilutions successives pour obtenir les différentes concentrations voulues.

Dans des tubes à essais contenant chacun 4 ml de bouillon Mueller-Hinton, on ajoute aseptiquement 0,5 ml de la solution « SM » ou des diverses dilutions de cette solution (Tableau 19).

Dans le tube témoin, on ajoute 1,5 ml d'éthanol au lieu de l'huile essentielle.

Les milieux sontensemencés avec 1 ml de suspension bactérienne de 10^8 germes/ml, soit une concentration finale de cellules d'environ 2.10^7 germes/ml (**Canillac et Mourey, 2001**).

On agite les tubes et on laisse incuber dans un bain-marie en agitation à 37 °C pendant 24 h. Au terme de cette durée, on effectue des subcultures dans des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller-Hinton.

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h puis, on procède à la lecture par présence ou absence de la croissance bactérienne.

Tableau (19) : Gamme de concentration (en µg/ml) des huiles essentielles utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu liquide

Huiles essentielles	S.M	10^{-1}	10^{-2}
<i>Thymus</i>	13010	1301,0	130,10
<i>Origanum</i>	12450	1245,0	124,50
<i>Ammoïdes</i>	12370	1237,0	123,70

IV.3.2.1 Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB (concentration minimale bactéricide) (Tableau 20) s'est avérée être un bon prédicateur de l'efficacité thérapeutique d'un antibiotique et est donc largement utilisée dans la recherche de nouvelles substances actives (**Joffin et Leyral, 1996**).

Pour déterminer les CMBs, nous avons suivi les mêmes étapes que pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne selon la méthode de Maruzzella, en variant les concentrations de l'huile essentielle dans le milieu.

Tableau (20) : Gamme de concentration (en µg/ml) d'huile essentielle utilisée pour la détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu liquide

Huiles essentielles	SM	1/2		1/11	1/12		1/100
<i>Thymus</i>	13009	6500		1180	1080		130
<i>Origanum</i>	12450	6230	...	1130	1040	125
<i>Ammoïdes</i>	12370	6180		1120	1030		120

Remarque : Pour les *Pseudomonas*, on a augmenté la quantité d'H.E. dans la solution mère. On a mis 1,75 ml d'H.E. au lieu de 1,5 ml d'H.E.

Généralement, les huiles essentielles sont très peu solubles dans l'eau. Ceci cause beaucoup de problèmes pour étudier leurs propriétés biologiques et pharmacologiques. Cependant, plusieurs auteurs recommandent d'utiliser différents solvants pour une bonne dispersion des huiles essentielles tels que l'acétone, alcool, éthylène glycol, éthanol, méthanol, DMSO et DMF (Conner et Beuchat, 1984 ; Lahlou et al., 2000a) ou bien d'utiliser un détergent émulsifiant ou un tensioactif tel que le Tween 20 ou le Tween 80 à différents pourcentages (Benjilali et al., 1984 ; 1986 ; Lahlou et al., 2000b ; 2001a, b ; Lahlou, 2003). De plus, Chalchat et al. (1991) comparent les résultats obtenus de la CMI en utilisant d'une part, le Tween 80 comme émulsifiant et d'autre part de l'agar comme stabilisant. Ces auteurs concluent que les résultats sont comparables entre les deux méthodes. En outre, Remmal et al. en (1993a, b) et en 2001, démontrent que l'éthanol et le Tween 20 et 80 influent sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ils ont constaté un effet antagoniste entre le milieu solide et le milieu liquide. Ces auteurs avancent que les CMI obtenues pour les différentes espèces de bactéries en présence d'agar sont significativement plus faibles que celles obtenues en présence de Tween ou en présence d'éthanol. Ils démontrent que le fait d'utiliser des solvants ou des détergents qui sont souvent conseillée pour l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, diminue significativement le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles testées. Ceci a déjà été rapporté auparavant par Simeon de Buochberg en 1976 et par Morris et al. en 1978.

En effet, Remmal et al. (1993b) et Delespaul et al. (2000), ont démontré que l'usage de détergents, tel que le Tween 80, abaisse considérablement l'activité des huiles essentielles.

Pour cela, nous avons testé le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* en milieu liquide en utilisant de l'éthanol selon la méthode de Maruzzella, du

Tween 80 à 10% pour avoir une solution d'huile essentielle stable et pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux de la méthode de contact direct et de l'agar à 0,3% au lieu à 0,2% selon **Remmal et al. (1993b)** car à ce pourcentage, on n'a pas pu obtenir une solution stable et même à 0,3%, il fallait mélanger avant chaque utilisation à cause de la formation de micelles.

Par contre, pour l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum*, nous avons opté pour le Tween 80 pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux de la méthode de contact direct en milieu gélosé.

IV.3.4. Méthode de microatmosphère

Cette technique mise au point par **Kellner et Kober**, en **1954**, a été rapportée par **Allegrini et Simeon de Buochberg** en **1972** et modifiée par **Benjlali et al.** en **1984**.

Elle permet d'évaluer l'activité des substances volatiles sur les mêmes germes utilisés précédemment.

Les milieux coulés en boîte de Pétri sontensemencées avec 1 ml de suspension bactérienne de 10^8 germes/ml et l'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration (**Shunying et al., 2005**). Ensuite, des disques de papier filtres stériles sont déposés aseptiquement sur les couvercles des boîtes de Pétri. Ces disques ont un diamètre d'environ 9 cm et sont imprégnés de différentes quantités d'huile essentielle pure allant de 25 à 200 μ l avec un pas de 25 μ l.

Les boîtes sont incubées à une température de 37 ± 1 °C à l'obscurité, la lecture des résultats se fait après 24 h puis après 48 h par présence ou absence de la croissance bactérienne.

Ensuite, nous avons déterminé les quantités minimales inhibitrices (QMIs) en utilisant la même méthode mais avec des intervalles variant selon la sensibilité des souches, avec un pas de 5 μ l. La QMI correspond à la plus faible quantité d'huile essentielle inhibant le développement d'une souche bactérienne.

En parallèle, nous avons utilisé des témoins afin de vérifier la croissance des différentes souches.

Remarque : Pour chaque méthode et pour une même souche, nous avons réalisé 5 essais afin de pouvoir établir une moyenne dans les mesures d'inhibitions et d'obtenir une meilleure fiabilité des résultats.

Par ailleurs, nous avons utilisé le milieu Mueller-Hinton pour les différentes techniques (EUCAST, 2003).

IV.4. Préparation des inoculums

Les souches bactériennes conservées dans de la gélose nutritive inclinée à 4 °C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37 ± 1 °C pendant 24 h, puisensemencées en strie sur boîte contenant de la gélose nutritive pour les *Pseudomonas*, les *Listerias*, et la Salmonelle, de la gélose Mac Conkey pour les *E. coli*, le *Citrobacter*, le *Proteus*, l'*Enterobacter* et les Klebsielles et de la gélose Chapman pour les Staphylocoques, afin de vérifier leur pureté (à 37 ± 1 °C pendant 24 h). Ensuite, les souches microbiennes sontensemencées sur bouillon Mueller Hinton à 37 ± 1 °C pendant 18 h.

Pour les différentes techniques, les milieux sontensemencées avec 1 ml de suspension bactérienne préparée à partir de cultures en milieu liquide de 18 h, diluée dans de l'eau physiologiques de manière à renfermer environ 10^8 germes/ml, soit à une densité optique entre 0,08 et 0,1 à 625 nm (Joffin et Leyral, 2001 ; Pessini et al., 2003 ; Careaga et al., 2003).

V. Etude statistique

La comparaison des résultats concernant le pouvoir antibactérien des trois huiles essentielles est réalisée à l'aide du logiciel Minitab 15. Pour cela, nous avons effectué une analyse de variance ANOVA, à un facteur et à deux facteurs. Les différences entre les moyennes sont considérées significatives quand $P < 0,05$.

Partie

Résultats & Discussion

I. Caractères organoleptiques

Les huiles essentielles des plantes étudiées sont très aromatiques. Elles sont liquides et de couleur jaune clair à jaune foncé. Les caractères organoleptiques de ces six espèces végétales sont reportés dans le tableau (21).

Tableau (21) : Caractéristiques organoleptiques des différentes espèces étudiées

Plantes	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
<i>Thymus fontanesii</i>	Liquide	Jaune foncé	Forte Balsamique Fraîche	Piquante Epicée
<i>Ammoïdes verticillata</i> <i>Origanum glandulosum</i>	Liquide	Jaune	Forte Balsamique Fraîche	Piquante Epicée
<i>Ziziphora hispanica</i> <i>Mentha pulegium</i> <i>Satureja calamintha</i>	Liquide	Jaune pâle	Fraîche Agréable Pénétrante	Sauve

II. Rendements en huiles essentielles des différentes plantes

Les rendements moyens en huile essentielle, qui sont calculés en fonction de la masse du matériel végétal sec, pour les différentes plantes sont représentés sur la figure (4) (tableau 22, annexe I).

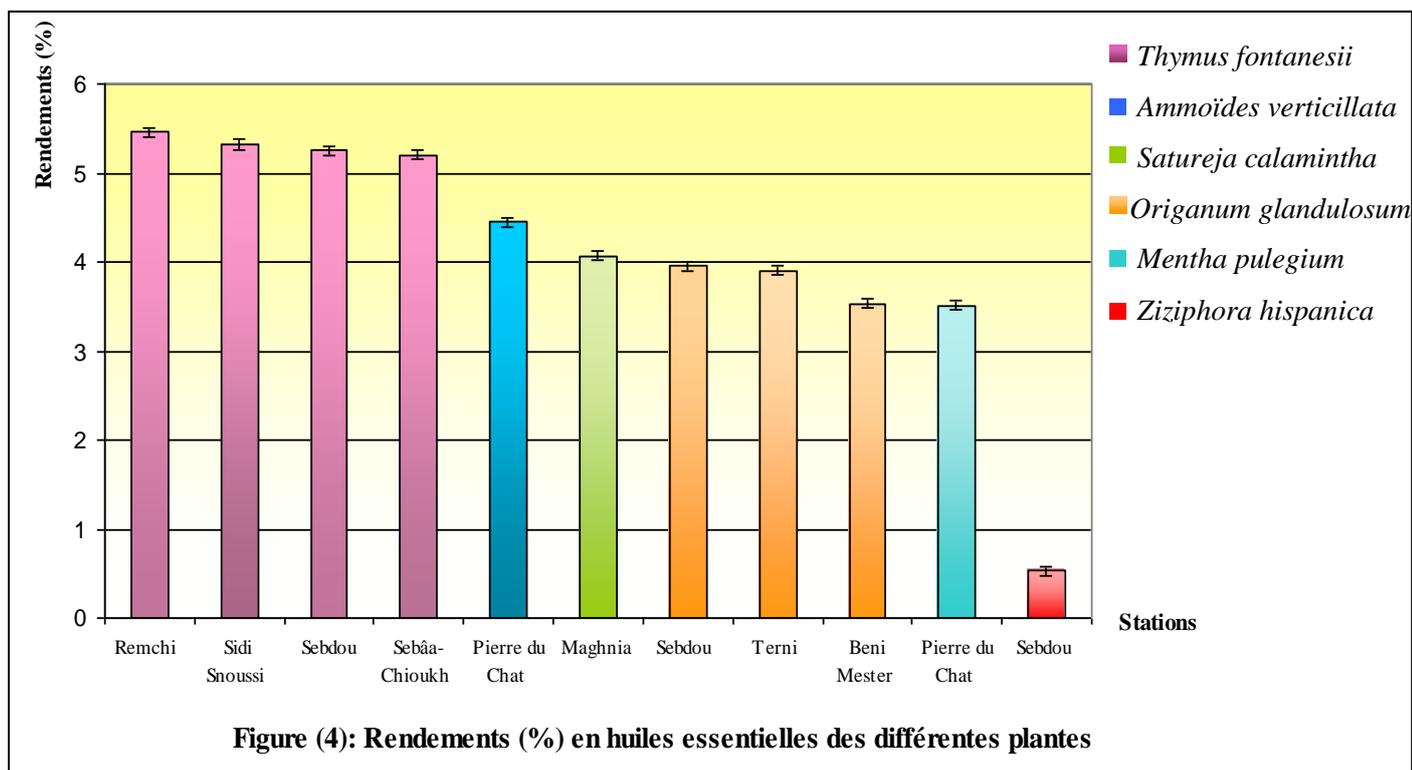


Figure (4): Rendements (%) en huiles essentielles des différentes plantes

Nous avons noté que toutes ces espèces végétales révèlent une richesse en huile essentielle obtenue par hydrodistillation sauf *Zizpphora hispanica* qui a un rendement très faible de l'ordre de 0,53% (Figure 4).

Nous remarquons que les teneurs en huile essentielle de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum* diffèrent légèrement entre les différentes stations. Ainsi, le climat et l'altitude ne semblent pas avoir une influence sur le rendement (Tableau 23).

La teneur en huile essentielle de *Thymus fontanesii* de provenance de Sétif (Est de l'Algérie), poussant à une altitude de 1000 m, est nettement inférieure aux nôtres : 1,9% (w/w) (Ghannadi et al., 2005).

Les rendements en huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* récoltée dans différentes stations de la région de Sétif, sont variables allant de 2,3 à 5% (Ruberto et al., 2002 ; Belhattab et al., 2005). En outre, Bendahou et al. (2007) avancent que la teneur en huile essentielle de cette même espèce poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen (Algérie), à une altitude de 1190 m est de l'ordre de 4,5%. Cette valeur est proche de nos résultats.

Tableau (23) : Etages bioclimatiques, altitude et rendements en huile essentielles

Plantes	Stations	Etages bioclimatiques	Altitude (m)	Rendements (%)
<i>Thymus fontanesii</i>	Remchi	Aride, chaud	220	5,46
	Sidi- Snoussi	Semi-aride, chaud	500	5,32
	Sebdou	Semi-aride, doux	720	5,25
	Sebâa-Chioukh	Semi-aride, chaud	600	5,20
<i>Origanum glandulosum</i>	Sebdou	Semi-aride, doux	720	3,95
	Terni	Semi-aride, à hiver tempéré	1100	3,9
	Beni Mester	Semi-aride, tempéré	670	3,53

Par ailleurs, la détermination quantitative des huiles essentielles dans cette même plante, récolté dans différentes stations de la région Est de l'Algérie, effectué par **Sari et al. (2006)**, leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles allant de 0,8 à 3%. Ces teneurs sont plus faibles par rapport aux nôtres.

En outre les teneurs en huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* sont proches de celles obtenues par **Ashraf et Batty (1975)** (3,5 à 5,2%) et par **Kambouche et El-Abed (2003)** (4,97%). Par contre, elles sont largement supérieures aux rendements rapportés par **Chialva et al. (1993)** (3,5% (v/w)), par **Khajeh et al. (2004)** (2,8% (v/w)) et par **(Bendahou, 2007)** (2.7%).

Les rendements (calculés par rapport à la matière végétale fraîche) en huiles essentielles de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, récolté dans différentes stations en Corse, sont faibles de l'ordre de 0,17 à 1,2% (**Ristorcelli et al., 1996 ; Baldovini et al., 2000**). Par ailleurs, **Fraternale et al. en 1998**, révèlent que cette espèce végétale est très pauvre en huiles essentielles, avec un rendement de l'ordre de 0,22 cc/100 g (v/w).

Montes et al. en 1986 rapportent que *Mentha pulegium* de provenance de Chili a un rendement en huile essentielle de 2,3%. Par ailleurs, **Sivropoulou et al. en 1995** ont obtenu une teneur en huile essentielle de *Mentha pulegium* récoltée dans trois stations en Grèce, de l'ordre de 1,6 à 2% (v/w). Par contre **Teixeira Duarte et al. (2005)**, avancent que le rendement en huile essentielle de cette même espèce végétale d'origine Brésilienne est très faible, de l'ordre de 0,42% (w/w). Ces valeurs sont nettement inférieures aux nôtres.

Enfin, **Desjobert et al. (1997)**, avancent que l'étude complète d'une huile essentielle doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques. Ainsi, les résultats obtenus nous permettent de supposer que les différences des teneurs en huiles essentielles des différentes plantes sont étroitement liées aux conditions culturales, tant climatiques ; dispersion géographique, altitude, qu'édaphiques, nature du sol.

III. Analyse des huiles essentielles des différentes plantes

Les analyses des huiles essentielles des différentes espèces végétales ont été réalisées dans le laboratoire « Chimie et Biomasse » (UMR CNRS 6134, Sciences Pour l'Environnement), à l'université de Corse.

III.1. Analyse de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

L'analyse de deux échantillons de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, récoltée dans la station de Sebdou sur 2 années successives, a été menée par combinaison de quatre méthodes d'analyse, deux techniques chromatographiques (CPG-Ir et chromatographie sur colonne ouverte de silice) et deux techniques spectroscopiques (CPG-SM et RMN ¹³C).

La caractérisation de ces huiles essentielles a été réalisée par RMN ¹³C sans séparation préalable des constituants. Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. Elle nous a permis d'identifier sept composés (Tableau 24) dans ces huiles essentielles, qui représentent un pourcentage variant entre 85,5% et 86,3% de la composition totale. Les constituants identifiés par RMN ¹³C, sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés.

Tableau (24) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Composés identifiés	IRa	IRp	RMN	Sup	Z 1 (2004) (%)	Z 1 (2005) (%)
α-Pinène	930	1025	9/10	2	0,7	0,2
β-Pinène	970	1112	7/10	0	0,7	0,4
Limonène*	1019	1202	10/10	3	2,1	1,7
<i>p</i>-Menth-3-en-8-ol*	1131	1605	9/9	0	3,6	2,4
Menthofurane	1146	1483	8/10	1	1,0	0,6
Pulégone	1219	1654	8/10	2	77,6	79,5
Pipériténone	1314	1916	7/9	2	0,6	0,6
Total (%)					86,3	85,5

Légende : L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. RMN : nombre de signaux observés sur le spectre de RMN ¹³C du mélange par rapport au nombre de signaux attendus (2004). Sup : nombre de superpositions de signaux (2004).

Nous constatons que les deux échantillons étudiés présentent une composition chimique homogène. Cependant, leurs teneurs diffèrent légèrement. La pulégone est le composé majoritaire de cette huile essentielle avec un pourcentage de l'ordre de 77,6 à 79,5%. Six monoterpènes sont présents en faibles teneurs à savoir : limonène (1,7 – 2,2%), β -pinène (0,4 – 0,7%), α -pinène (0,2 – 0,7%) qui sont des monoterpènes oléfiniques, et *para*-menth-3-en-8-ol (2,4 – 3,6%) menthofurane (0,6 – 1,0%) et pipériténone (0,6%) qui sont des monoterpènes oxygénés.

Nous avons présenté sur la figure (5), le spectre RMN ^{13}C de cette huile essentielle ainsi que la structure de son composé majoritaire.

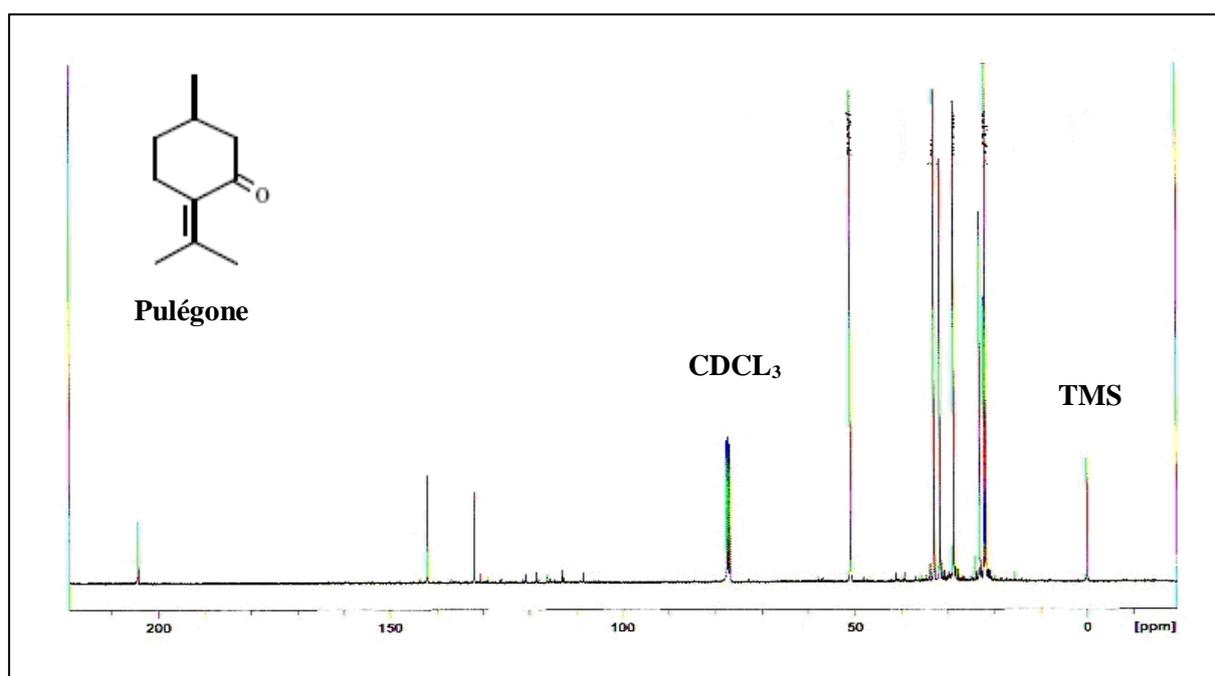


Figure (5) : Spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle brute de *Ziziphora hispanica* (Z 1 2005)

Dans l'optique de mener une analyse plus approfondie et donc d'identifier un plus grand nombre de composés dans l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, il était nécessaire de combiner un fractionnement sur colonne ouverte de silice avec des analyses par CPG-Ir, CPG-SM et RMN du carbone-13 car cette huile contient un pourcentage élevé en pulégone (77,6 – 79,5%) qui nous a empêché d'identifier les autres composants qui se trouvent en faibles quantités.

- **Fractionnement de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* et analyse des différentes fractions obtenues :**

Un gramme de l'huile essentielle de l'échantillon Z 1 (2005) a été soumis à un fractionnement sur gel de silice (une chromatographie « Flash »). Nous avons élué trois fractions (Tableau 25). La première fraction contient des composés oléfiniques qui sont élués au pentane, alors que les deux autres fractions contiennent des composés oxygénés qui sont obtenues en utilisant un mélange de pentane/oxyde de diéthyle (95/5) et un solvant pur (oxyde de diéthyle), respectivement. Les fractions ainsi obtenues sont analysées par CPG-Ir et par RMN ¹³ C.

Tableau (25) : Fractionnement de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Numéro de fraction	Pentane / Oxyde de diéthyle (%)	Poids des fractions (en mg)
1	100 / 0	50
2	95 / 5	828
3	0 / 100	107

Le spectre de RMN ¹³ C de la première fraction est représenté sur la figure (6), ainsi que la structure de son composé majoritaire. Dans le tableau (26), nous décrivons la composition chimique de cette fraction. Nous avons identifié 10 composés qui représentent 91,5% de la composition de cette fraction.

Tableau (26) : Composés identifiés dans la première fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* éluée avec le pentane

Echantillons			HE	F 1
Masse (mg)			1000	50
Composés identifiés	IRa	IRp	Pourcentage	Pourcentage
<i>α</i> -Pinène	930	1025	0,2	5,2
Sabinène	964	1122	0,1	1,6
<i>β</i> -Pinène	970	1112	0,4	8,1
Myrcène	979	1161	0,1	2,3
<i>p</i> -Cymène	1010	1271	0,2	8,0
Limonène*	1019	1202	1,7	38,7
<i>γ</i> -Terpinène	1047	1245	0,1	4,7
<i>p</i> -Mentha-3,8-diène	1058	1257	0,1	2,3
Menthofurane	1146	1483	0,6	19,7
(<i>E</i>)- <i>β</i> -Caryophyllène	1417	1595	0,1	0,9
Total (%)				91,5

Légende : L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. F 1 : fraction de chromatographie dans laquelle les composés sont identifiés. HE : huile essentielle. Les pourcentages en gras : teneurs des composés identifiés par RMN ¹³ C.

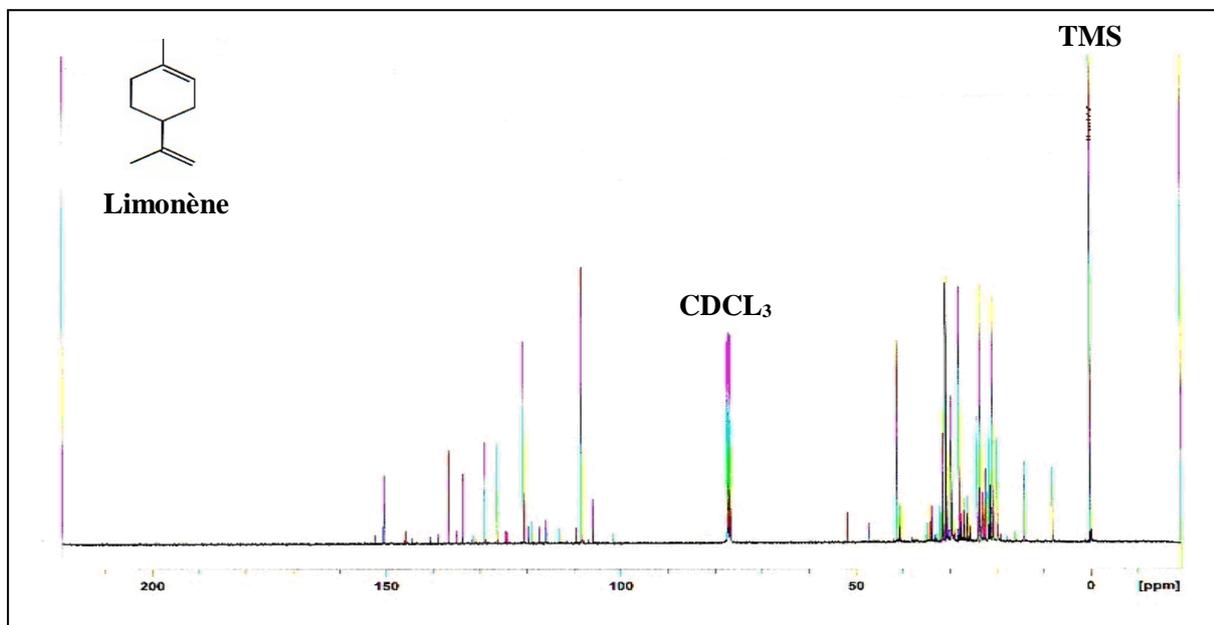


Figure (6) : Spectre RMN ¹³C de la première fraction l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Cette fraction est très riche en monoterpènes (90,6%) avec prédominance de limonène (38,7%). Le β -pinène, le *p*-cymène, l' α -pinène et le γ -terpinène sont présents en quantités appréciables (8,1 ; 8,0 ; 5,2 et 4,7%) respectivement). Trois autres monoterpènes sont également identifiés en faibles teneurs lors de l'analyse de cette fraction : le myrcène (2,3%), le *para*-mentha-3,8-diène (2,3%) et le sabinène (1,6%). Un seul sesquiterpène, (*E*)- β -caryophyllène (0,9%) est également identifié. Paradoxalement, un monoterpène oxygéné est identifié dans cette fraction : le menthofurane (19,7%). Au total, nous avons donc identifié six nouveaux composés lors de l'analyse de cette fraction par rapport à l'analyse de l'huile essentielle avant le fractionnement.

Nous avons reproduit sur la figure (7), la structure des molécules identifiés dans cette première fraction.

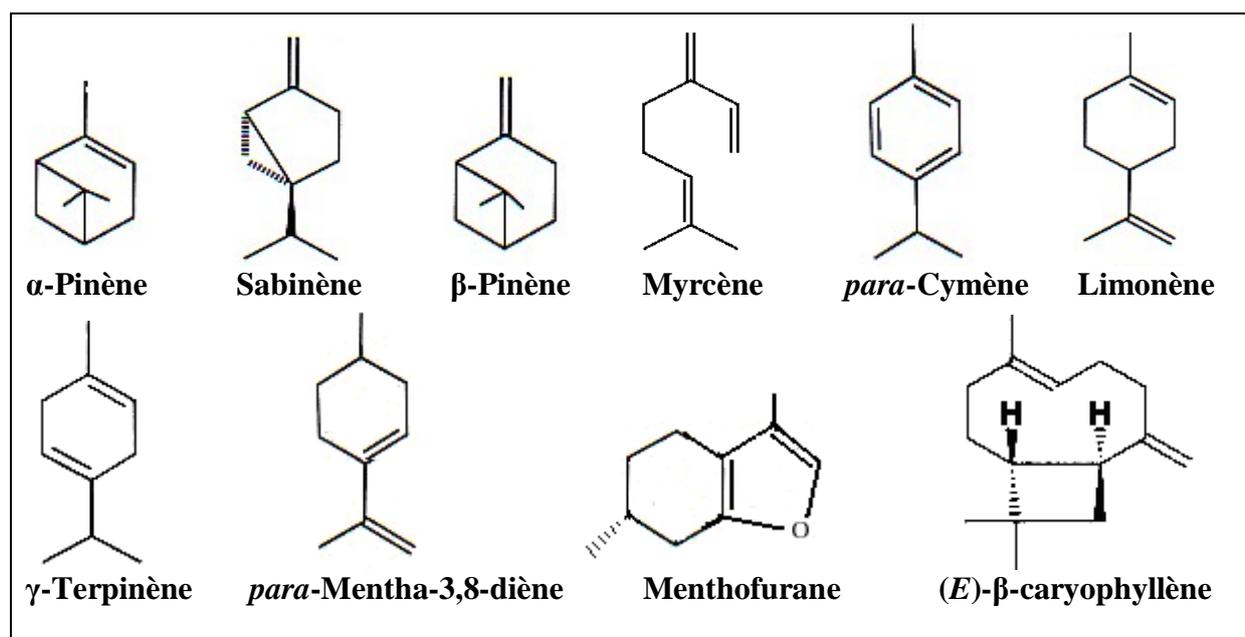


Figure (7) : Structure des composés identifiés par RMN ^{13}C dans la première fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Le spectre de RMN ^{13}C de la deuxième fraction éluée avec le mélange pentane/oxyde de diéthyle (95/5), est représenté sur la figure (8). Le tableau (27), décrit les composés identifiés dans celle-ci. Nous avons identifié six composés qui représentent 93,2% de la composition de cette fraction.

Tableau (27) : Composés identifiés dans la deuxième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* éluée avec le mélange pentane/oxyde de diéthyle (95/5)

Echantillons			HE	F 2
Masse (mg)			1000	828
Composés identifiés	IRa	IRp	Pourcentage	Pourcentage
<i>trans</i> -Isopulégone	1148	1583	0,9	1,1
<i>cis</i> -Isopulégone	1149	1572	0,6	0,8
Pulégone	1219	1654	79,5	89,2
Oxyde de <i>cis</i> -pipéritone	1233	1722	0,2	1,4
Thymol	1263	2186	0,9	2,0
Carvacrol	1272	2217	1,6	1,8
Total (%)				96,3

Légende : L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. F 2 : fraction de chromatographie dans laquelle les composés sont identifiés. HE : huile essentielle. Les pourcentages en gras : teneurs des composés identifiés par RMN ^{13}C .

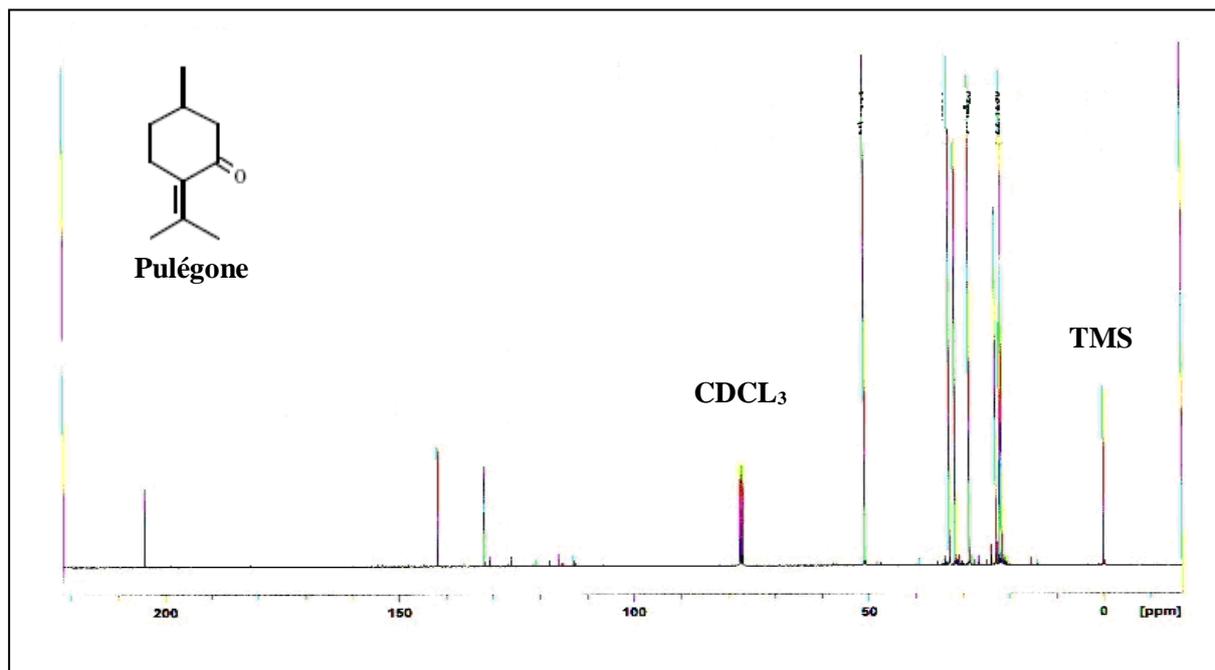


Figure (8) : Spectre RMN ^{13}C de la deuxième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Lors de l'analyse de cette fraction, nous avons caractérisé 6 monoterpènes oxygénés qui représentent 96,3% de la composition globale. La pulégone (89,2%) est le composé dominant. Cinq monoterpènes sont identifiés en faibles teneurs dans l'huile essentielle par l'analyse de cette fraction : l'oxyde de *cis*-pipéritone (1,4%), le *trans*-isopulégone (1,1%) et le *cis*-isopulégone (0,8%). Deux autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés soit, le thymol (2,0%) et le carvacrol (1,8%). Au total, nous avons donc identifié cinq nouveaux composés lors de l'analyse de cette fraction par rapport à l'analyse de l'huile essentielle avant le fractionnement. Les structures des molécules identifiées par l'analyse de cette fraction sont représentées sur la figure (9).

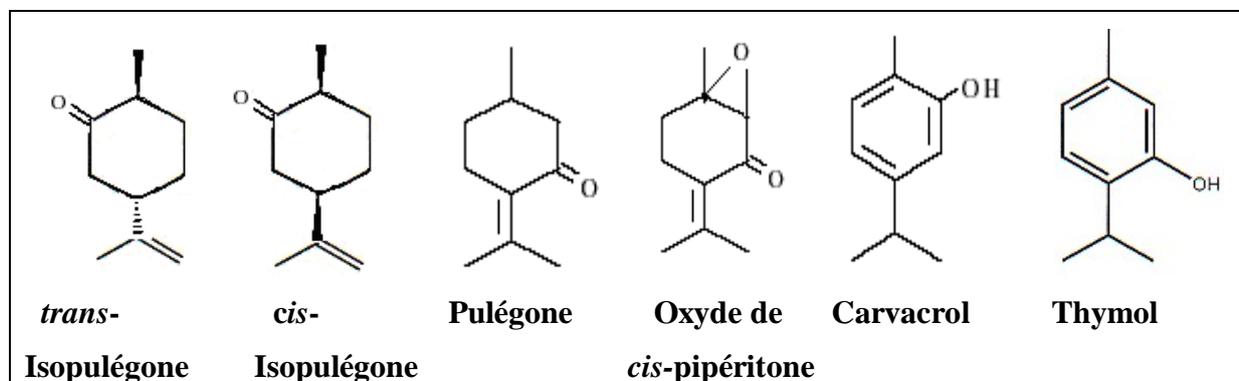


Figure (9) : Structure des composés identifiés par RMN ^{13}C dans la deuxième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Le spectre de RMN ¹³ C de la troisième fraction éluée avec de l'oxyde de diéthyle, est reproduit sur la figure (10). Dans le tableau (28), nous décrivons la composition chimique de la fraction F 3. Nous avons identifié huit composés qui représentent 60,8% de la composition de cette fraction.

Tableau (28) : Composés identifiés dans la troisième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* éluée avec de l'oxyde de diéthyle

Echantillons			HE	F 3
Masse (mg)			1000	107
Composés identifiés	IRa	IRp	Pourcentage (%)	Pourcentage (%)
Oct-1-en-3-ol	958	1447	0,1	0,9
<i>Trans</i> -pinocarvéol	1122	1654	0,1	1,0
<i>Trans</i> -verbénol	1126	1669	0,1	0,9
<i>Para</i> -menth-3-en-8-ol	1131	1605	2,4	38,5
α -terpinéol	1172	1696	0,2	2,5
<i>Trans</i> -carvéol	1196	1834	0,2	2,9
Pipériténone	1314	1916	0,6	13,3
Menthylactone	1450	2220	0,3	3,3
Total (%)				60,8

Légende : L'ordre d'élué et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. F 3 : fraction de chromatographie dans laquelle les composés sont identifiés. HE : huile essentielle. Les pourcentages en gras : teneurs des composés identifiés par RMN ¹³ C.

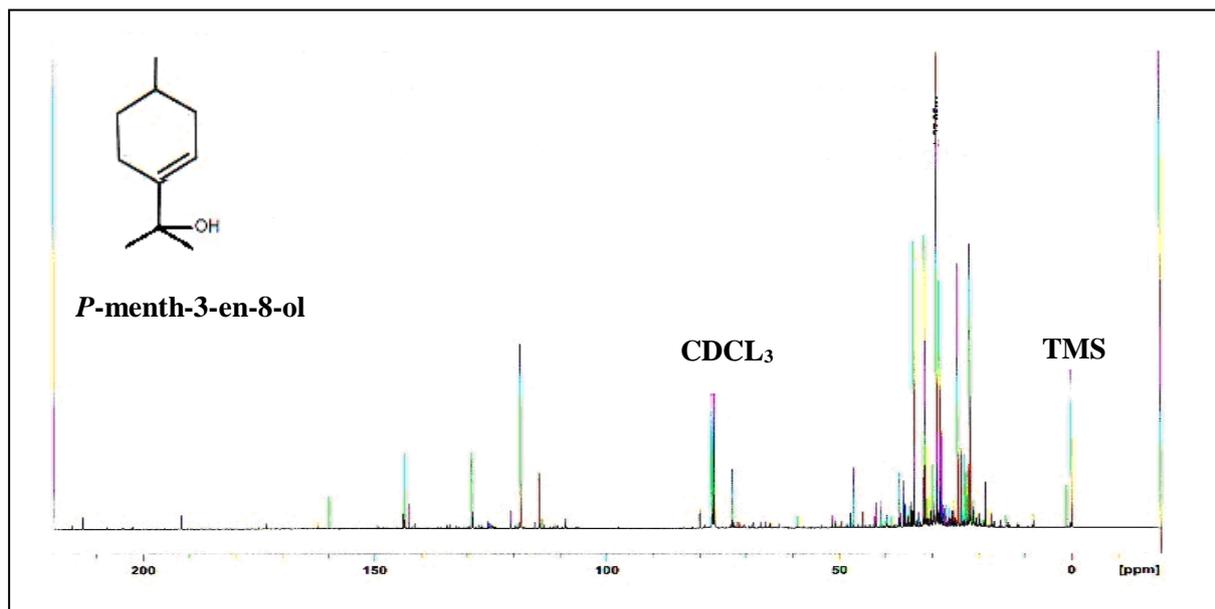


Figure (10) : Spectre RMN ¹³ C de la troisième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Lors de l'analyse de la troisième fraction, nous avons caractérisé sept monoterpènes oxygénés avec une prédominance du *para*-menth-3-en-8-ol (38,5%). D'autres monoterpènes sont également identifiés en quantités appréciables, à savoir : la pipériténone (13,3%), la menthalactone (3,3%), le *trans*-carvéol (2,9%) et l' α -terpinéol (2,5%). Deux autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés en faibles teneurs, soit : le *trans*-pinocarvéol (1,0%), le *trans*-verbéol (0,9%). Un seul composé linéaire l'oct-1-en-3-ol (0,9%) est identifié dans l'huile essentielle de cette fraction. Au total, nous avons donc identifié six nouveaux composés lors de l'analyse de cette fraction par rapport à l'analyse de l'huile essentielle. Les structures des composés identifiés par l'analyse de cette fraction sont données dans la figure (11).

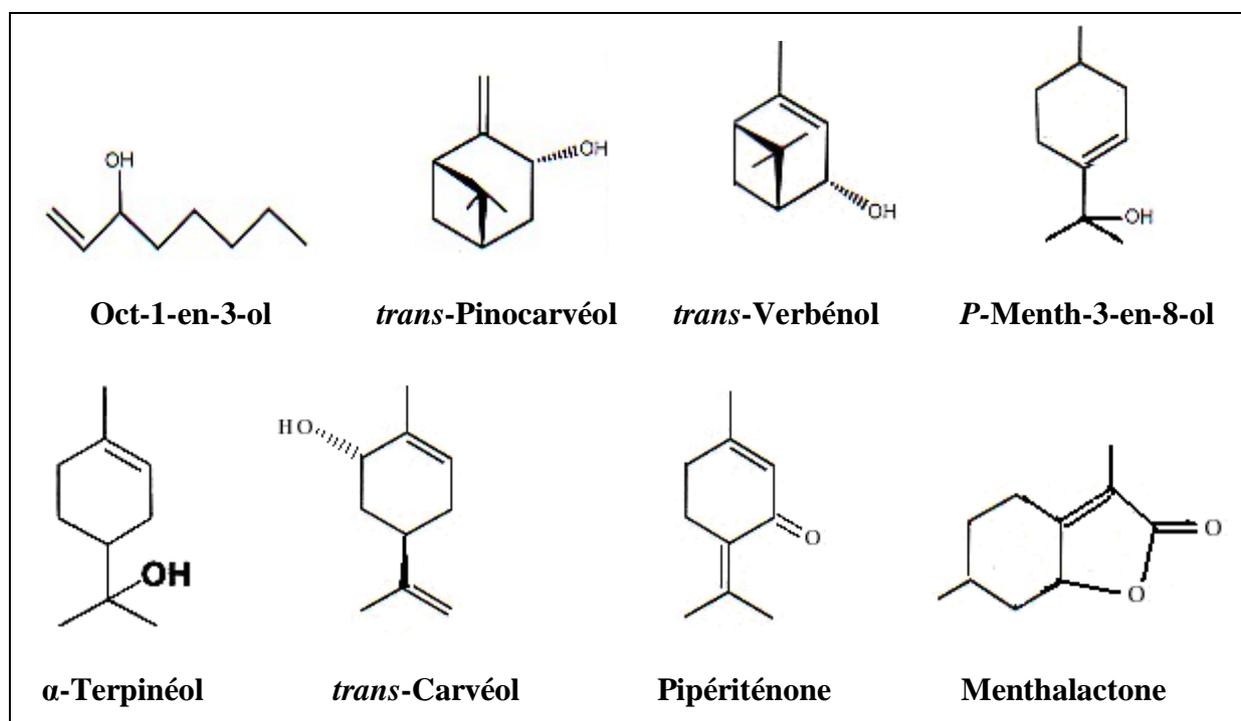


Figure (11) : Structure des composés identifiés par RMN ^{13}C dans la troisième fraction de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

L'application de la CPG-SM pour la caractérisation de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* sans séparation préalable des constituants, nous a permis d'identifier douze autres composés minoritaires de teneurs inférieures à 0,5% qui ne peuvent pas être identifiés par RMN ^{13}C .

Une fois caractérisés, ces constituants sont aisément repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire. Dans la figure (12), nous donnons les structures de ces molécules identifiées par CPG-SM en analysant cette huile essentielle.

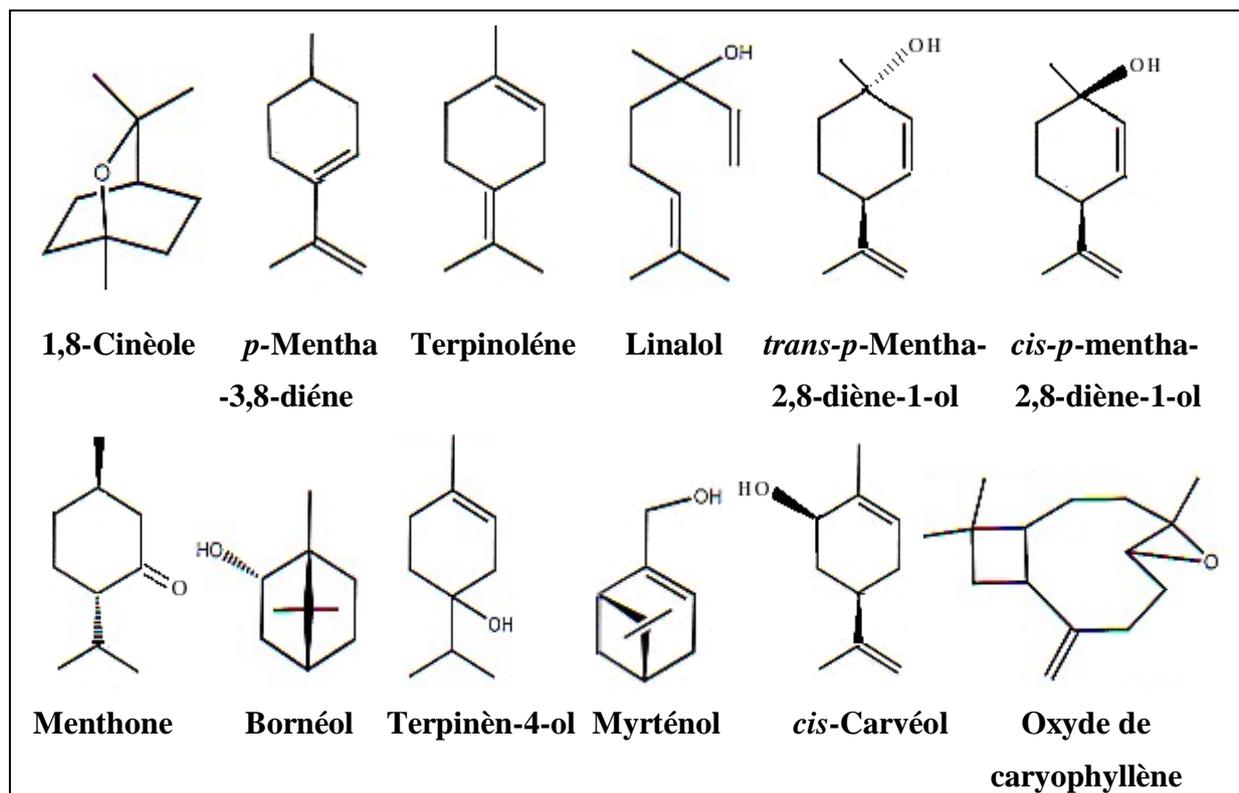


Figure (12) : Structure des composés identifiés par CPG-SM dans l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Enfin, l'étude détaillée d'un échantillon de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* a été réalisée en appliquant quatre méthodes d'analyse, deux techniques chromatographiques (CPG-Ir et chromatographie sur colonne ouverte de silice) et deux techniques spectroscopiques (SM et RMN ^{13}C). Les composés des trois fractions de chromatographie sur colonne de silice, sont repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention et par les déplacements chimiques de leurs carbones observés dans les différents spectres de RMN ^{13}C .

Ces analyses nous ont permis d'identifier trente six composés qui représentent 92,2 à 93,7% de la composition globale de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* (Tableau 29). Nous avons pu identifier dix sept autres composés, suite à l'analyse des fractions par rapport à l'analyse directe de l'huile essentielle par RMN ^{13}C par laquelle, nous avons identifié que sept composés. Par ailleurs, l'analyse de cette huile essentielle par CPG-SM, nous a permis d'identifier douze autres composés présents en très faibles teneurs.

L'identification des composants dans l'échantillon Z 1 (2004) a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention sur deux colonnes polaires et apolaires à ceux de l'échantillon Z1 (2005) (Tableau 29)

Ainsi, l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* est dominée par les monoterpènes oxygénés possédant un squelette du type *p*-menthane en position C-3, à savoir la pulégone (77,6 – 79,5%) qui est le composé majoritaire, la *para*-menth-3-en-8-ol (2,4 – 3,6%), la pipériténone (0,6%), la *cis*-isopulégone (0,6%) et la *trans*-isopulégone (0,7 – 0,9%). Il est important de noter que ces deux derniers monoterpènes sont cités pour la première fois dans le genre *Ziziphora*. D'autres composés sont présents en quantités appréciables soit le limonène (1,7 – 2,1%), le carvacrol (1,6 – 2,8%) et le thymol (0,6 – 0,9%). Le taux des sesquiterpènes identifiés est très faible de l'ordre de 0,2 à 0,3%. Le (*E*)- β -caryophyllène (t – 0,1%) et son oxyde (0,2%) sont les deux seuls sesquiterpènes identifiés dans cette huile essentielle. Un seul composé aliphatique, l'oct-1-en-3-ol (0,1%) est également identifié dans les huiles essentielles de *Ziziphora hispanica*.

Tableau (29) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*

Composés identifiés	IRa	IRp	ZI (2004) (%)	ZI (2005) (%)	Mode d'identification
α-Pinène	930	1025	0,7	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Sabinène	964	1122	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
β-Pinène	970	1112	0,7	0,4	IR, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	979	1161	0,2	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
Oct-1-en-3-ol	958	1447	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>para</i>-Cymène	1010	1271	0,3	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Limonène*	1019	1202	2,1	1,7	IR, SM, RMN ¹³ C
1,8-Cinèole*	1019	1209	0,1	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
γ-Terpinène	1047	1245	0,2	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>para</i> mentha-3,8-diène	1058	1257	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
Terpinoléne	1077	1283	t	t	IR, SM
Linalol	1081	1543	0,1	t	IR, SM
<i>trans-p</i>-Mentha-2,8-diène-1-ol	1101	1626	t	t	IR, SM
<i>cis-p</i>-Mentha-2,8-diène-1-ol	1114	1657	0,1	t	IR, SM
<i>trans</i>-Pinocarvéol	1122	1654	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i>-Verbénol	1126	1669	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
Menthone	1130	1463	0,1	0,3	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>para</i>-Menth-3-en-8-ol	1131	1605	3,6	2,4	IR, SM, RMN ¹³ C
Menthofurane	1146	1483	0,8	0,6	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i>-Isopulégone	1148	1583	0,7	0,9	IR, SM, RMN ¹³ C

<i>cis</i> -Isopulégone	1149	1572	0,6	0,6	IR, SM, RMN ¹³ C
Bornéol	1148	1700	t	t	IR, SM
Terpinéol-4	1160	1598	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1696	0,2	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Myrtéol	1178	1789	t	t	IR, SM
<i>trans</i> -Carvéol	1196	1834	0,3	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Carvéol	1213	1866	t	t	IR, SM
Pulégone	1219	1654	77,6	79,5	IR, SM, RMN ¹³ C
Pipéritone	1226	1772	0,1	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
Oxyde de <i>cis</i> -pipéritone	1233	1722	0,2	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Thymol	1262	2186	0,6	0,9	IR, SM, RMN ¹³ C
Carvacrol	1272	2217	2,8	1,6	IR, SM, RMN ¹³ C
Pipériténone	1314	1916	0,6	0,6	IR, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1595	t	0,1	IR, SM, RMN ¹³ C
Menthalactone	1450	2220	0,2	0,3	IR, SM, RMN ¹³ C
Oxyde de caryophyllène	1569	1986	0,2	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Total (%)			93,7	92,2	

Légende : L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

La caractérisation de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica* a fait l'objet d'un seul travail effectué par **Velasco Negueruela et Mata Rico** en **1986**. L'étude menée par ces auteurs sur l'huile essentielle de cette plante récoltée en Espagne, révèle l'existence de deux composés majoritaires : la pulégone (64,5 et 76,7%) et la pipériténone (11,7 – 16,7%). La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par **Velasco Negueruela et Mata Rico** en **1986**, nous amènent à constater que notre huile essentielle représente un pourcentage très faible en pipériténone de l'ordre de 0,6%. Ces auteurs avancent également l'existence d'autres composés qui ne sont pas identifiés dans notre échantillon, à savoir : isopulégol, *trans*-isopipériténol, δ -cadinène et *cis*-nérolidol.

Selon la littérature, les études effectuées sur l'huile essentielle de différentes espèces de *Ziziphora*, révèlent une richesse en pulégone, soit : *Z. tenuior* (86,3 – 87,1%) (**Sezik et al., 1991**), *Z. taurica* subsp. *cleonioides* (81,9%) (**Meral et al., 2002**) et *Z. persica* (79,3%) (**Ozturk et Ercisli, 2006**).

D'autre part, **Salehi et al. (2005)**, rapportent que l'huile essentielle de *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*, poussant à l'état spontané en Iran, contient de la pulégone (45,8%) comme composé majoritaire. D'autres composés sont également présents en quantités appréciables : la pipériténone (17,4%), le *p*-menth-3-en-8-ol (12,5%), le thymol (8,0%), le 1,8-cinéole (2,7%), le néo-menthol (2,1%), la menthone (1,8%), l'isomenthol (1,6%), le pipéritone (1,4%) et le germacrène D (1,1%).

Enfin, **Ozel et Göğüş (2005)** ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle de *Z. taurica* subsp. *taurica*, récolté en Turquie. La pulégone est également le composé majoritaire avec une teneur de (37,20%). D'autres composés sont également identifiés : le *cis*-carvéol (8,2%), le *trans*-carvéol (6,9%), la verbénone (4,1%), le bornéol (3,7%), le *cis*-verbénol (3,5%), l'oxyde de limonène (3,2%), l' α -pinène (2,5%), le menthofurane (2,5%) et le carvacrol (2,3%).

III.2. Analyse de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* poussant spontanément en Algérie (région de Tlemcen), nous avons procédé en premier lieu, à une analyse de 5 échantillons d'huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et une méthode spectroscopique (RMN ^{13}C). Ces échantillons sont récoltés dans quatre stations différentes, à savoir : Sidi-Snoussi, Remchi, Sebdou et Sebâa-Chioukh. Pour cette dernière station, nous avons effectué 2 récoltes sur deux années successives. Nous avons, par la suite, compléter cette étude en appliquant une autre technique spectroscopique (CPG-SM) sur un seul échantillon de provenance de Sebâa-Chioukh récolté durant l'année 2005.

Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier onze composés qui représentent un pourcentage variant entre 93,8 et 95,4% de la composition globale de ces huiles essentielles, selon les différentes stations. Les constituants identifiés par RMN ^{13}C , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés (Tableau 30). Nous précisons également que pour chaque composé, tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

Le spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* de la station de Remchi est reproduit sur la figure (13) ainsi que la structure de carvacrol (66,7 – 69,5%), composé majoritaire de ces huiles essentielles.

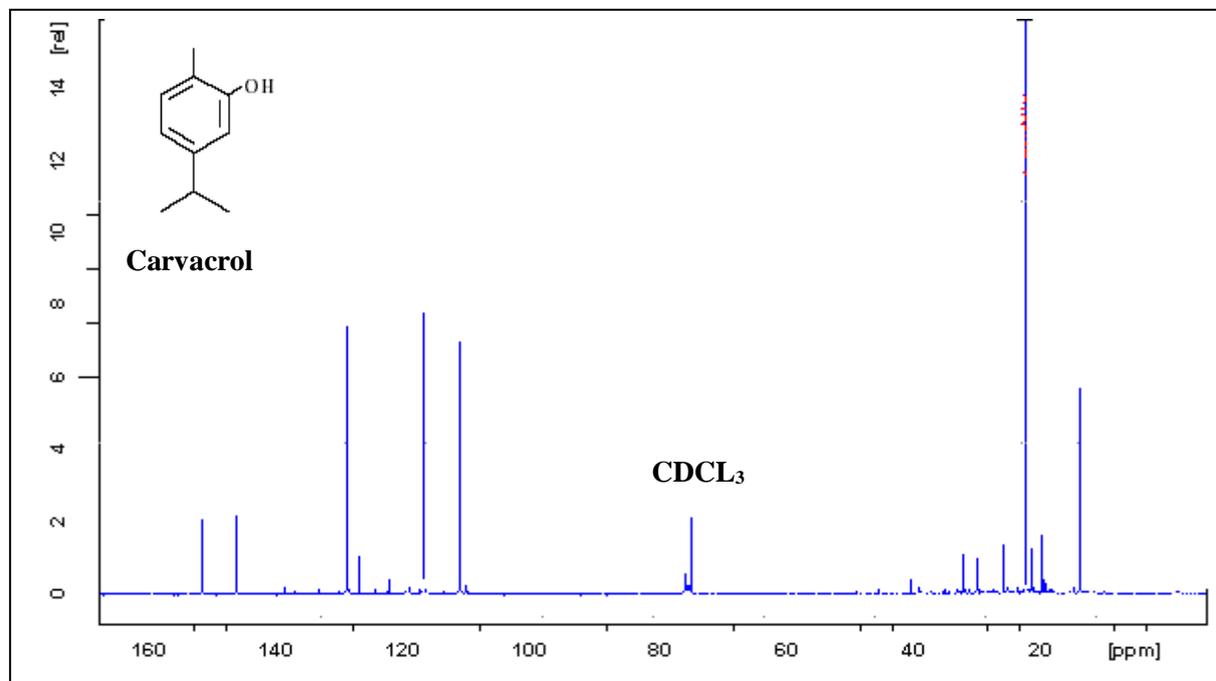


Figure (13) : Spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* (échantillon de Remchi)

Les cinq échantillons analysés sont quantitativement et qualitativement très proches. Ces huiles essentielles sont riches en monoterpènes qui représentent entre 92,7 et 94,6% de la composition chimique globale de ces huiles essentielles. Elles contiennent 7 composés oléfiniques avec prédominance du *p*-cymène (6,1 – 9,1%), suivi du γ -terpinène (5,8 – 9,6%) et contiennent 4 autres oléfines : α -pinène (2,5 – 3,0%), myrcène (1,2 – 1,5%), α -thujène (0,6 – 1,3%) et α -terpinène (1,0 – 1,4%), en quantités appréciables. Le limonène, composé oléfinique, est présent en faible teneur, soit entre 0,5 et 0,6%. Ces huiles essentielles contiennent également 3 monoterpènes oxygénés. Le carvacrol est le composé monoterpénique oxygéné majoritaire (66,7 – 69,5%). Par contre, le thymol est le monoterpène oxygéné en plus faibles teneurs dans ces huiles (0,5 – 0,7%). Le linalol est présent dans ces huiles essentielles en teneurs appréciables, soit entre 2,8 et 4,0%. Un seul sesquiterpène est mis en évidence, le (E)- β -caryophyllène (0,6 – 0,9%). Dans la figure (14), nous donnons les structures des molécules identifiées par RMN ^{13}C , en analysant ces huiles essentielles.

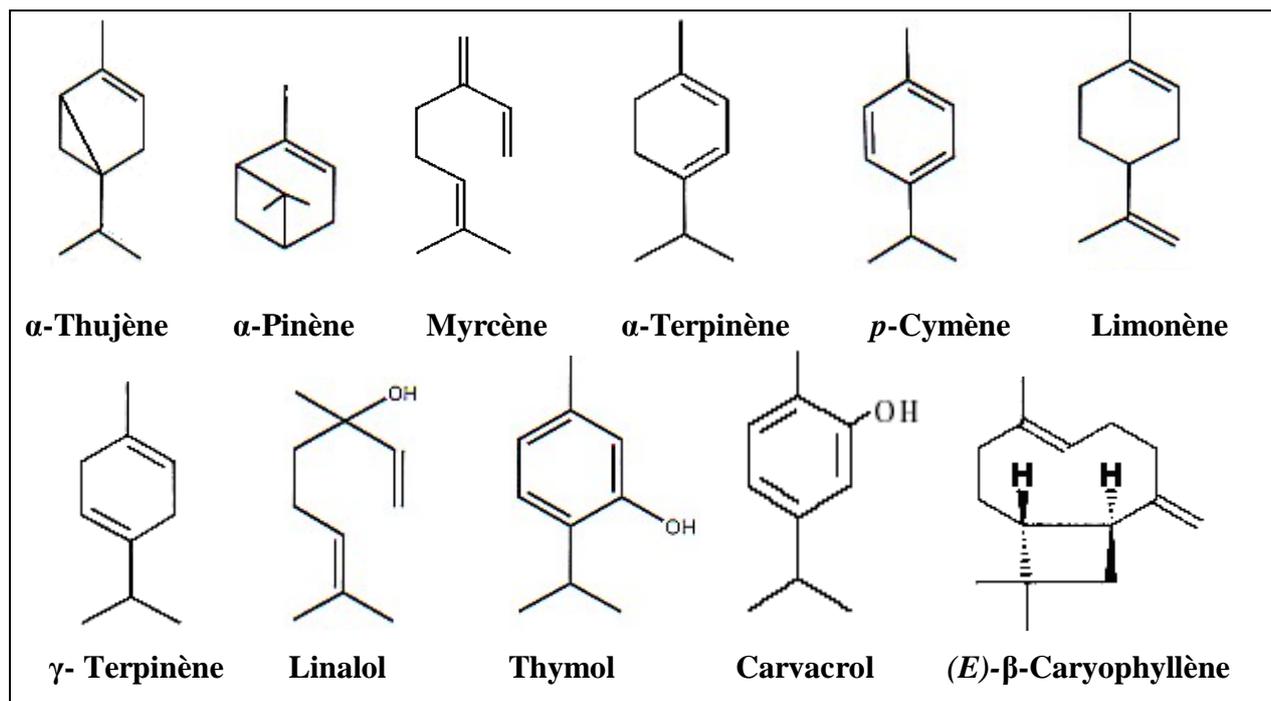
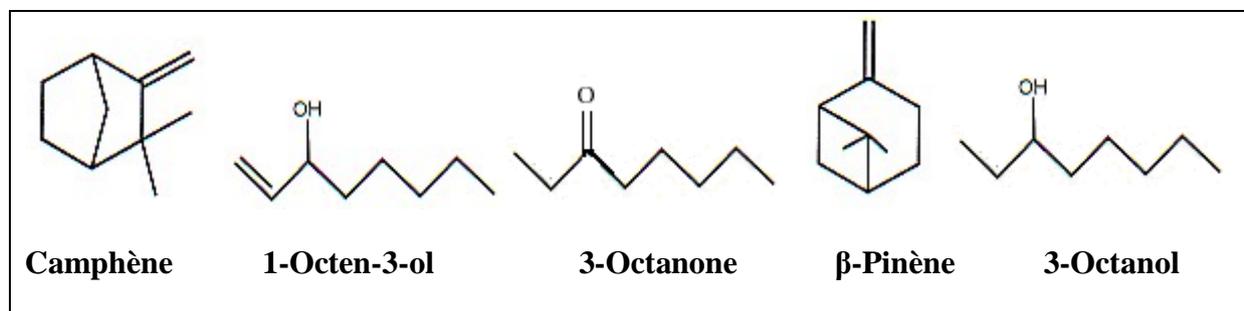


Figure (14) : Structure des composés identifiés par RMN ^{13}C dans l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

L'application de la CPG-SM pour l'analyse de l'échantillon SC 5 (échantillon récolté dans la station de Sebâa-Chioukh durant l'année 2005), nous a permis d'identifier 17 autres composés minoritaires de teneurs inférieures à 0,5% qui n'ont pas pu être identifiés par RMN ^{13}C . Une fois identifiés, ces constituants sont aisément repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire, ce qui permet leur quantification.

Sur la figure (15), nous représentons les structures des composés identifiés par CPG-SM, en analysant cette huile essentielle.



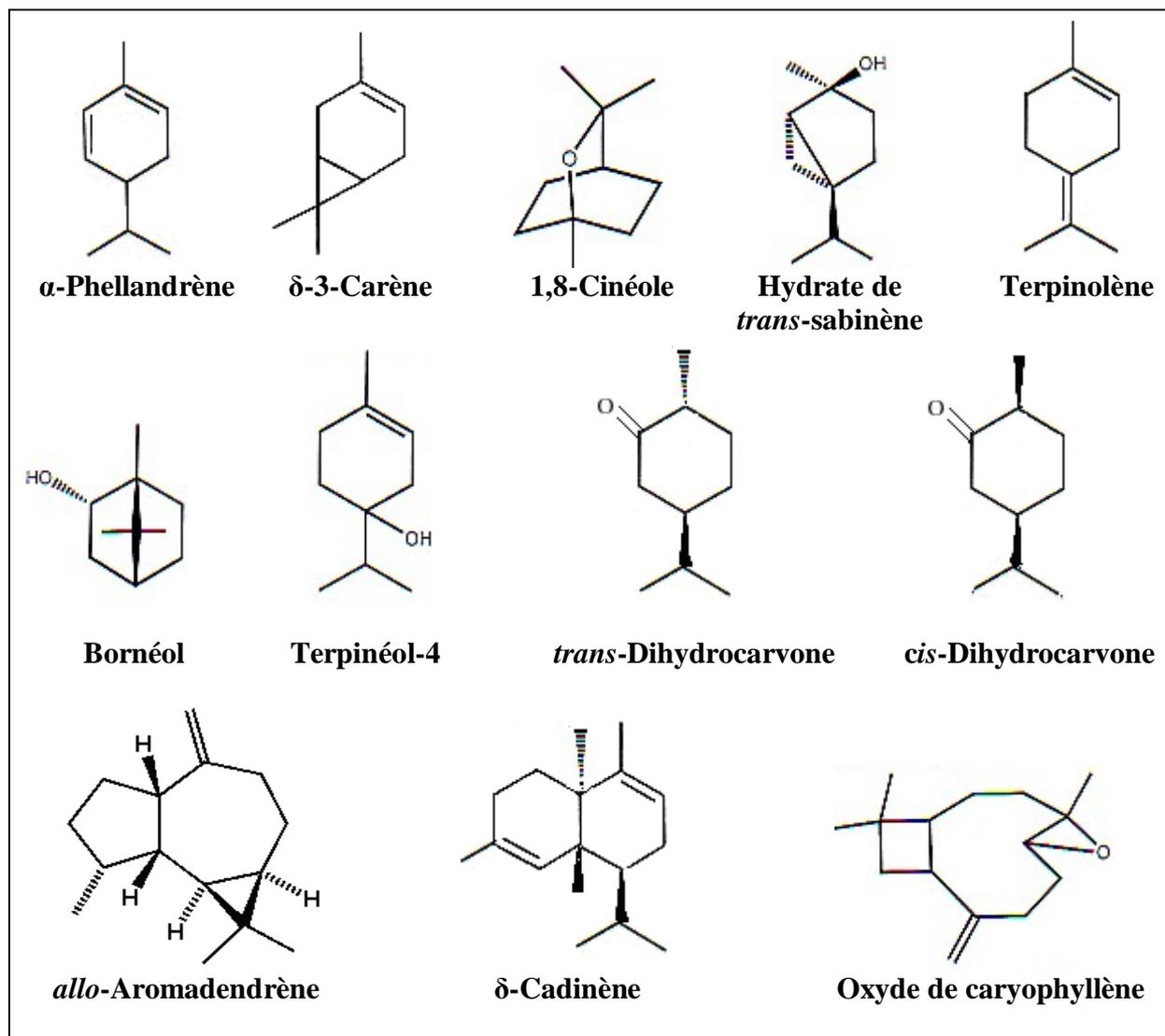


Figure (15) : Structure des composés identifiés par CPG-SM dans l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Onze de ces constituants sont des monoterpènes dont six de nature oléfinique (camphène, β -pinène, α -phellandrène, δ -3-carène, *trans*-hydrate de sabinène, terpinolène) et le reste sont de nature oxygénée (1,8-cinéole, bornéol, terpinéol-4, *trans*-dihydrocarvone, *cis*-dihydrocarvone). Les deux sesquiterpènes identifiés sont de nature hydrocarbonée, soit l'*allo*-aromadendrène et le δ -cadinène. L'oxyde de caryophyllène est le seul sesquiterpène oxygéné identifié par CPG-SM dans cette huile essentielle. Enfin, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* contient également trois composés monoterpéniques aliphatiques, soit : le 3-octanol, le 1-octen-3-ol et le 3-octanone.

En conclusion, Nous avons identifié, au total, vingt huit composés dans les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* représentant 97,2 à 98,4% de la composition chimique globale (tableau 30).

Tableau (30) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Composés identifiés	IRa	IRp	SC 4	SC 5	R	S	SS	Mode d'identification
α -Thujène	920	1026	0,6	1,3	1,3	1,3	1,3	IR, SM, RMN ¹³ C
α -Pinène	929	1025	2,6	2,9	2,7	2,5	3,0	IR, SM, RMN ¹³ C
Camphène	941	1068	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	IR, SM
1-Octen-3-ol	959	1446	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	IR, SM
3-Octanone	960	1253	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	IR, SM
β -Pinène	968	1111	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	IR, SM
3-Octanol	975	1389	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	IR, SM
Myrcène	978	1161	1,2	1,3	1,5	1,2	1,4	IR, SM, RMN ¹³ C
α -Phellandrène	994	1164	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	IR, SM
δ -3-Carène	1003	1147	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	IR, SM
α -Terpinène	1007	1181	1,1	1,0	1,4	1,1	1,1	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>para</i> -Cymène	1011	1272	6,1	8,5	6,6	9,1	7,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Limonène*	1020	1202	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	IR, SM, RMN ¹³ C
1,8-Cinéole*	1020	1210	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	IR, SM
γ -Terpinène	1047	1246	7,9	5,8	9,6	6,0	6,9	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	1050	1461	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	IR, SM, RMN ¹³ C
Terpinolène	1076	1281	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	IR, SM
Linalol	1081	1543	4,0	2,8	3,4	3,1	3,0	IR, SM, RMN ¹³ C
Bornéol	1147	1700	0,4	0,7	0,3	0,4	0,4	IR, SM
Terpinéol-4	1159	1598	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	IR, SM
<i>trans</i> -Dihydrocarvone	1172	1605	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	IR, SM
<i>cis</i> -Dihydrocarvone	1178	1625	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	IR, SM
Thymol	1263	2187	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	IR, SM, RMN ¹³ C
Carvacrol	1275	2218	69,2	68,3	66,7	68,4	69,5	IR, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1593	0,6	0,8	0,9	0,7	0,8	IR, SM, RMN ¹³ C
<i>allo</i> -Aromadendrène	1449	1611	t	t	t	t	t	IR, SM
δ -Cadinène	1512	1755	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	IR, SM
Oxyde de caryophyllène	1569	1986	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	IR, SM
Total (%)			97,5	97,3	98,1	97,2	98,4	

Légende : SC 4/SC 5 : Sebâa-Chioukh 2004/2005, R : Remchi, S : Sebdou, SS : Sidi-Snoussi. L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. t : trace.

Les cinq échantillons étudiés présentent une composition chimique homogène dominée par le carvacrol (66,7 – 69,5%). Par contre, la teneur en thymol varie entre 0,5 et 0,7%. Ces huiles essentielles sont très riches en monoterpènes, soit vingt quatre composés qui représentent 96,1 à 97,3%. Par contre, les sesquiterpènes sont présents en faibles teneurs

(quatre constituants, avec un pourcentage variant entre 0,9 et 1,1%). Les monoterpènes présents en quantités appréciables sont : le γ -terpinène (5,8 – 9,6%), le *p*-cymène (6,1 – 9,1%), le linalol (2,8 – 4,0%), l' α -pinène (2,5 – 3,0%), le myrcène (1,2 – 1,5%), l' α -terpinène (1,0 – 1,4%) et l' α -thujène (0,6 – 1,3%). Les autres monoterpènes identifiés sont présents en teneurs plus faibles : le bornéol (0,3 – 0,7%), le limonène (0,5 – 0,6%), le camphène (0,1 – 0,3%), le terpinéol-4 (0,3%), le β -pinène (0,2 – 0,3%), l' α -phellandrène (0,2%), le 1,8-cinéole (0,2%), *trans*-hydrate de sabinène (0,1 – 0,2%), le terpinolène (0,1 – 0,2%), et la δ -3-carène (0,1%). Les sesquiterpènes oléfiniques identifiés (le δ -cadinène et l'*allo*-aromadendrène) sont présents en très faibles teneurs (0,1% et trace, respectivement). Le (*E*)- β -caryophyllène est le sesquiterpène oxygéné majoritaire (0,6 – 0,9%), accompagné de son oxyde (0,1 – 0,2%). Trois monoterpènes linéaires sont également identifiés en très faibles teneurs, soit : le 1-octen-3-ol (0,1 – 0,2%), le 3-octanone (0,1 – 0,2%) et le 3-octanol (0,1%). En outre, ces résultats nous amènent à conclure que nos huiles essentielles appartiennent à deux groupes chimiques : carvacrol/ γ -terpinène/*p*-cymène ; carvacrol/*p*-cymène / γ -terpinène.

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a fait l'objet d'un seul travail réalisé par **Ghannadi et al.**, en 2004. Ces auteurs ont décrit l'analyse chimique par CPG-SM de l'huile essentielle de cette plante récoltée à Sétif (Algérie), qui a révélé l'existence d'un seul composé majoritaire, le thymol (67,8%) suivi du γ -terpinène (15,9%) et du *p*-cymène (13,0%) (Tableau 31). Cette espèce végétale est de type chimique différent des nôtres.

Tableau (31) : Teneurs des composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *Thymus fontanesii*

Composés identifiés	Travaux de Ghannadi et al., (2004)	Nos travaux
α -Thujène	0,1	0,6 – 1,3
Myrcène	0,2	1,2 – 1,5
<i>para</i> -Cymène	13,0	6,1 – 9,1
Limonène	0,1	0,5 – 0,6
γ -Terpinène	15,9	5,8 – 9,6
Linalol	0,3	2,8 – 4,0
α -Terpinéol	0,1	-
Thymol	67,8	0,5 – 0,7
Carvacrol	1,7	66,7 – 69,5

- : Composé non identifié ; Les teneurs sont données en pourcentages.

La comparaison de nos résultats, obtenus par l'analyse des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* récoltée dans différentes stations de la région de Tlemcen avec ceux de l'étude effectuée précédemment, nous amènent à conclure que nos huiles essentielles appartiennent à deux groupes chimiques : carvacrol/ γ -terpinène/*p*-cymène et carvacrol/*p*-cymène/ γ -terpinène.

Nous avons constaté également que seize composés constitutifs de nos huiles essentielles n'ont pas été identifiés précédemment. Ces composés sont : le camphène, le 3-octanone, le β -pinène, le 3-octanol, l' α -phellandrène, la δ -3-carène, le 1,8-cinéole, le bornéol, le *trans*-hydrate de sabinène, le terpinolène, le *trans*-dihydrocarvone, le *cis*-dihydrocarvone, l'*allo*-aromadendrène le δ -cadinène, le (*E*)- β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène.

III.3. Analyse de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Les espèces du genre *Origanum* sont décrites dans différents travaux pour leur grand polymorphisme chimique. Ainsi, selon la composition chimique de leurs huiles essentielles, les différentes espèces de ce genre sont réparties en trois groupes chimiques : linalol/terpinène-4-ol/hydrate de sabinène ; carvacrol et/ou thymol et le groupe des sesquiterpènes (**Kokkini, 1996**). Par ailleurs, l'analyse chimique des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*, récolté dans différentes régions d'Algérie, révèle l'existence de trois types chimiques : thymol/carvacrol/*p*-cymène ; carvacrol/*p*-cymène/thymol ; carvacrol/ γ -terpinène/*p*-cymène (**Ruberto et al., 2002 ; Belhattab et al., 2005 ; Bendahou et al., 2007**).

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* poussant spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie), nous avons procédé à une analyse de 4 échantillons d'huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et une méthode spectroscopique (RMN ^{13}C). Ces échantillons sont récoltés dans trois stations différentes, à savoir : Sebdou, Beni-Mester et Terni. Pour cette dernière station, nous avons effectué 3 récoltes sur trois années successives.

Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier douze composés dans cette huile essentielle. Les constituants identifiés par RMN ^{13}C , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés (Tableau 32). Ces composés représentent un pourcentage variant entre 93,5 et 95,4% de la composition globale de ces huiles essentielles, selon les différentes stations étudiées. Nous précisons également que pour chaque composé, tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

Tableau (32) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de *Origanum glandulosum* des différentes stations

Composés identifiés	IRa	IRp	TO 1	OG 1	O 1	OBM	OSB
α-Thujène	920	1026	1,4	1,1	1,5	1,6	1,6
α-Pinène	929	1025	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7
β-Pinène	968	1111	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Myrcène	978	1161	2,0	1,7	2,0	2,1	2,1
α-Terpinène	1007	1181	2,3	1,7	1,8	2,2	2,4
para-Cymène	1011	1272	12,4	18,3	17,7	20,3	15,7
Limonène*	1020	1202	0,6	0,3	0,4	0,4	0,3
γ-Terpinène	1047	1246	21,0	16,4	20,0	21,4	23,8
Terpinéol-4	1159	1598	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
α-Terpinéol	1171	1695	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2
Thymol	1263	2187	51,3	49,5	45,4	41,0	44,4
Carvacrol	1275	2218	2,9	2,9	3,6	2,9	2,9
Total (%)			95,4	93,5	93,9	93,6	94,7

Légende : TO 1/OG 1 /O 1: Terni 2003/2004/2005, OBM: Beni-Mester, OSB: Sebdu.

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

Le spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* de la station Sebdu est reproduit sur la figure (16) ainsi que la structure du thymol, composé majoritaire de ces HE.

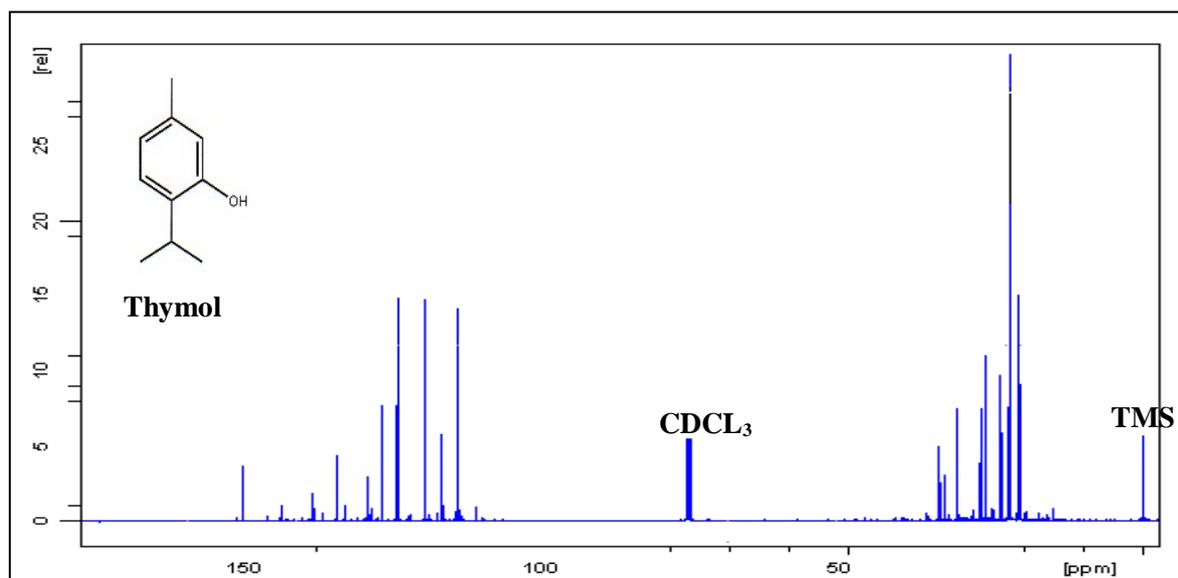


Figure (16) : Spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle d' *Origanum glandulosum* (échantillon de Sebdu)

Dans la figure (17), nous donnons, respectivement, les structures des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés identifiés par RMN ^{13}C en analysant ces huiles essentielles.

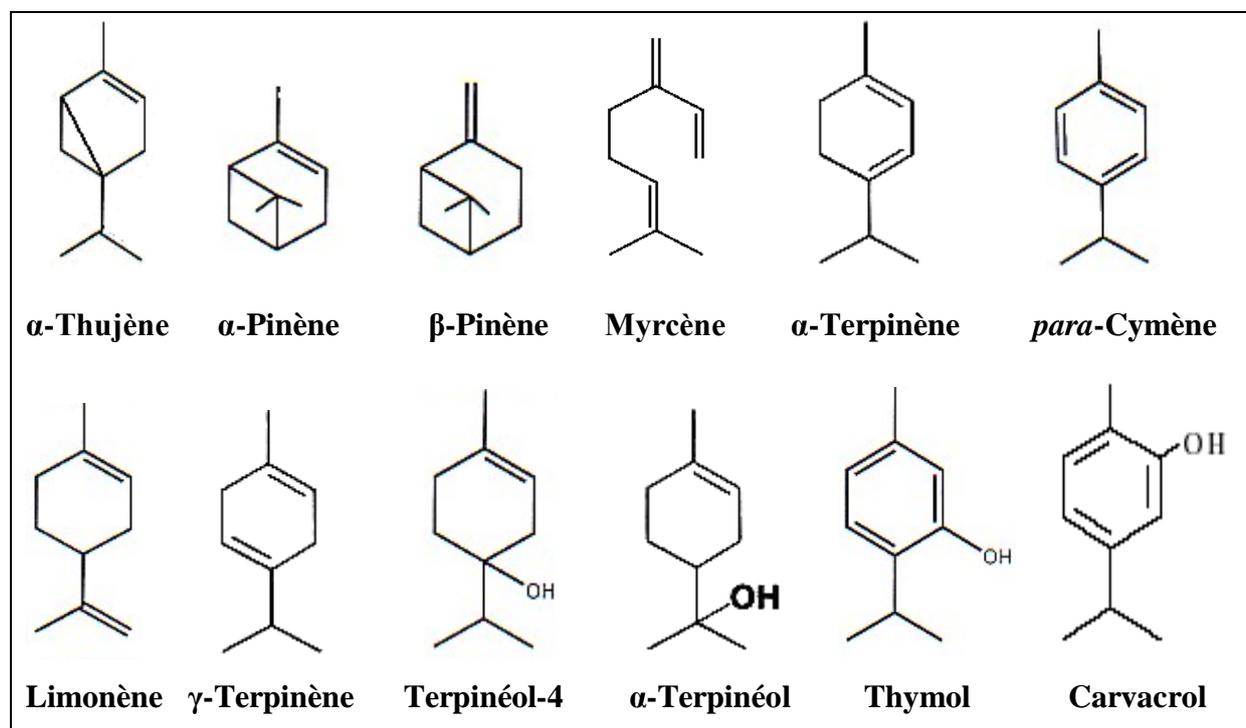


Figure (17) : Structure des monoterpènes identifiés par RMN ^{13}C dans les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*

Les cinq échantillons analysés sont quantitativement et qualitativement très proches. La même observation est faite pour la station de Terni concernant les 3 années successives. Ces huiles essentielles ne contiennent que des monoterpènes dont huit oléfines (40,4 – 48,9%) et quatre monoterpènes oxygénés (44,7 et 54,9%).

Le thymol est le composé majoritaire (41,0 et 51,3%) et les mêmes composés sont identifiés dans tous les échantillons. Par contre le carvacrol est présent en faible teneur (2,9 – 3,6%). Les autres monoterpènes oxygénés identifiés sont également présents en très faibles teneurs : l' α -terpinéol (0,2 – 0,4%) et le terpinéol-4 (0,4 – 0,5%).

Ces huiles essentielles renferment également des monoterpènes hydrocarbonés en quantités appréciables à savoir : le γ -terpinène (16,4 – 23,8%) et le *p*-cymène (12,4 – 20,3%).

Nous constatons également l'existence en moindres quantités d'autres monoterpènes oléfiniques, qui sont : l' α -terpinène (1,7 – 2,4%), le myrcène (1,7 – 2,1%), l' α -thujène (1,1 – 1,6%), l' α -pinène (0,6 – 0,7%), le limonène (0,3– 0,6%) et le β -pinène (0,2%). Par ailleurs, ces résultats nous amènent à supposer que nos huiles essentielles appartiennent, en général à un seul groupe chimique à thymol/ γ -terpinène/*p*-cymène.

L'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans différentes régions en Algérie, a fait l'objet de quelques travaux, permettant d'avancer l'existence de différents types chimiques de cette espèce selon les composés majoritaires identifiés lors de l'étude de la variabilité de cette huile essentielle :

- ❖ Les premiers travaux réalisés sont ceux de **Ruberto et al. (2002)** qui ont étudié la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, récolté dans 4 stations différentes dans la région de Sétif (Algérie). Ils signalent la présence de 2 groupes chimiques, soit : thymol/carvacrol/*p*-cymène et carvacrol/*p*-cymène/thymol.
- ❖ Durant la même année, **Houmani et al.**, ont étudié la composition de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans la région d'Alger. Ils avancent que les composés majoritaires sont : le thymol (55,6%), le *p*-cymène (12,5%), le γ -terpinène (11,2%) et le carvacrol (2,7%).
- ❖ L'étude phytochimique d'*Origanum glandulosum* de la région de Sétif (Algérie) a été effectuée par **Belhattab et al.** en 2005. Ils ont mis en évidence 29 composés qui représentent 89,4%. Ils ont trouvé que l'huile essentielle de cette plante extraite par hydrodistillation, présente une forte teneur en carvacrol (47%), suivi du γ -terpinène (13,4%), du *p*-cymène (11,2%) et du thymol (6,6%).
- ❖ En 2006, **Sari et al.**, ont effectué une étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans différentes régions de l'Est de l'Algérie. Ils ont identifié 30 composés qui représentent un pourcentage variant entre 97,7% et 99,6%. Ils avancent l'existence de 6 groupes chimiques: thymol/carvacrol/*p*-cymène ; carvacrol/thymol ; thymol/carvacrol ; carvacrol/thymol/ γ -terpinène ; thymol/*p*-cymène/carvacrol/ γ -terpinène ; thymol/carvacrol/ γ -terpinène.
- ❖ En 2007, les travaux réalisés par **Bendahou et al.**, sur l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* provenant de la région de Tlemcen, ont montré l'existence d'un seul type chimique à savoir : chimiotype à thymol avec un pourcentage de 55,6%. Elle

renferme également des quantités appréciables en d'autres composés à savoir : le *p*-cymène (12,5%), le γ -terpinène (11,2%).

Nous constatons que pour la plupart des travaux qui ont eu pour objet, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, ont révélé des teneurs élevées en thymol, en γ -terpinène et en *p*-cymène. Ces huiles essentielles font parti du même groupe chimique que le nôtre.

III.4. Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

L'*Ammoïdes* est une plante endémique qui appartient à la famille des Apiacées. Cette plante est considérée principalement comme une plante médicinale grâce à son pouvoir antibactérien et antifongique de ses huiles essentielles (**Dubey et Mishra, 1990 ; Srivastava et al., 1999 ; Abdelouahid et Bekhechi, 2002**).

Ces activités biologiques des huiles essentielles sont étroitement liées à sa composition chimique, et chaque huile essentielle est un mélange très complexe constitué de plusieurs dizaines de constituants en proportions très variés.

Nous avons choisi cette espèce car elle est très utilisée par la population locale pour ses propriétés antalgiques, anti-infectieuses et antispasmodiques. Ceci est du probablement à sa richesse en thymol. Ainsi, nous avons voulu comparer le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* à celui d'*Origanum glandulosum* et de *Thymus fontanesii* qui sont très riches en phénols.

Pour cela, il était nécessaire d'avoir une connaissance de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* poussant spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie). Nous avons procédé à une analyse de trois échantillons d'huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et une technique spectroscopique (RMN ^{13}C). Ces échantillons sont récoltés dans une seule station, soit Pierre du Chat et ceci sur trois années successives.

Des spectres de ces huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier douze composés dans cette huile essentielle. Les constituants identifiés par RMN ^{13}C , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés (Tableau 33). Ces composés représentent un pourcentage variant entre 93,6 et 96,8% de la composition

globale de ces huiles essentielles. Nous précisons également que pour chaque composé, tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

Tableau (33) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

Composés identifiés	IRa	IRp	PN 5	NO	NO 5
α-Thujène	921	1025	0,2	0,2	0,3
α-Pinène	928	1022	0,7	1,1	0,9
Sabinène	963	1122	0,3	0,5	0,4
Myrcène	978	1160	0,8	0,8	0,6
α-Terpinène	1007	1182	0,3	0,5	0,4
<i>para</i>-Cymène	1010	1272	10,4	9,9	10,8
Limonène*	1020	1204	18,2	21,1	19,2
1,8-Cinéole*	1020	1211	0,7	0,4	0,4
γ-Terpinène	1047	1246	11,7	12,4	10,2
Terpinéol-4	1159	1597	0,4	0,9	0,7
Thymol	1267	2188	51,6	48,7	49,4
Carvacrol	1273	2216	0,3	0,3	0,3
Total (%)			95,6	96,8	93,6

Légende : PN 5/NO/ NO 5 : Pierre du chat 2003/2004/2005. L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

Nous avons reproduit sur la figure (18), le spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*, ainsi que la structure du thymol, composé majoritaire de ces huiles essentielles.

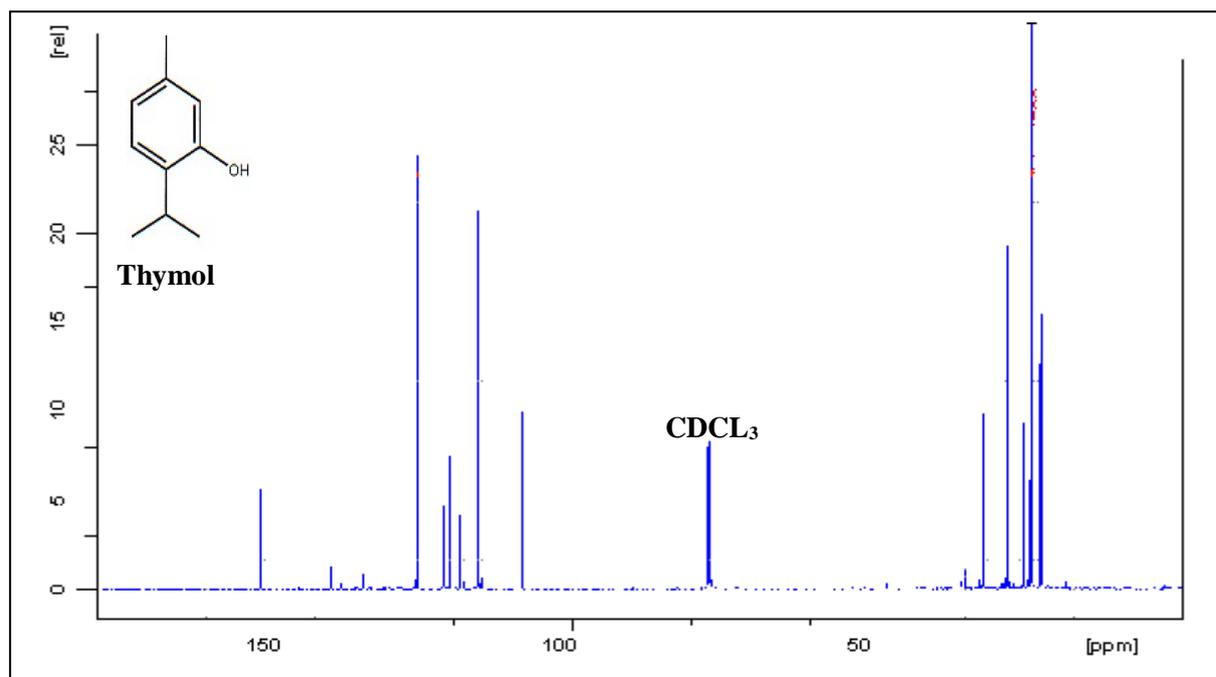


Figure (18) : Spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (échantillon récolté durant l'année 2004)

Dans la figure (19), nous donnons, respectivement, les structures des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés identifiés par RMN ^{13}C en analysant ces huiles essentielles.

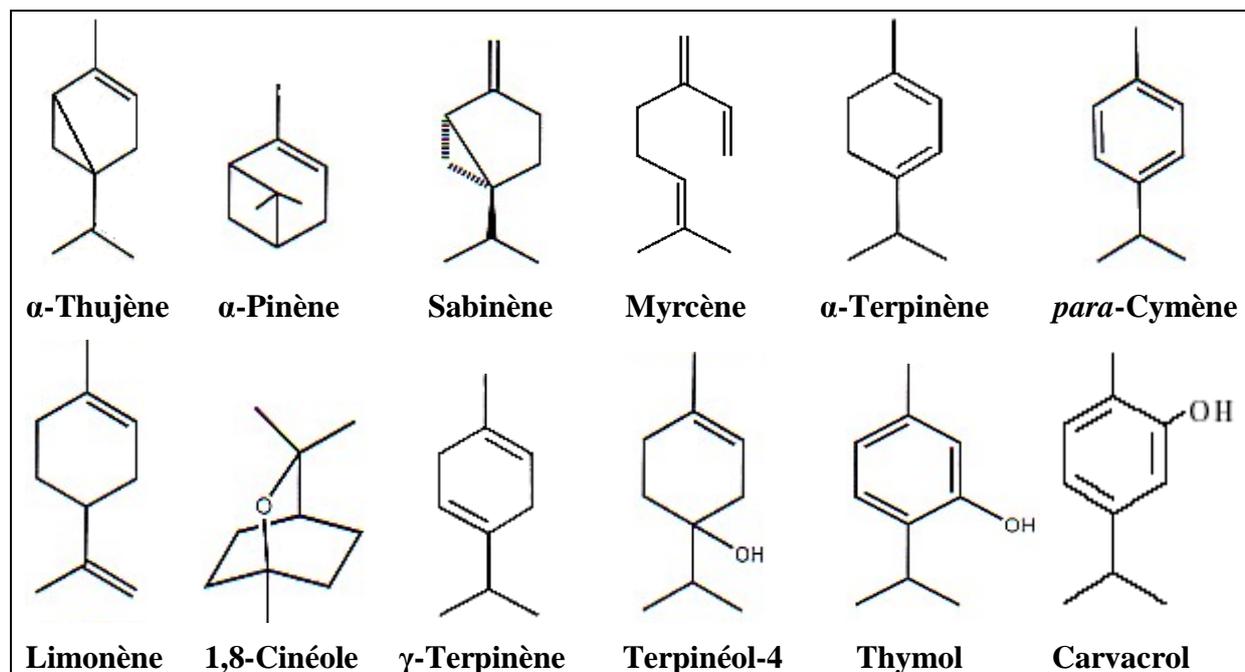


Figure (19) : Structure des monoterpènes identifiés par RMN ^{13}C dans l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

Les trois échantillons analysés sont quantitativement et qualitativement très proches.

Nous pouvons constater que la totalité des constituants identifiés dans ces huiles essentielles, sont des monoterpènes et les mêmes composés sont identifiés dans les trois échantillons.

Le taux des monoterpènes oxygénés identifiés représente environ 50% de la composition globale. Le thymol est le monoterpène oxygéné majoritaire de l'ordre de 48,7 à 51,6%. Par contre le carvacrol est présent en très faible teneur (0,3%). Deux autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés : le terpinéol-4 (0,4 – 0,9%) et le 1,8-cinéole (0,4 – 0,7%). Lors de l'analyse de ces huiles essentielles, nous avons caractérisé huit monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 42,6 à 46,5% de la composition chimique globale, avec prédominance du limonène (18,2 – 21,1%), suivi du γ -terpinène (10,2 – 12,4%) et du *p*-cymène (9,9 – 10,8%). Cinq autres oléfines sont également identifiés, soit : l' α -pinène (0,7 – 1,1%), le myrcène (0,6 – 0,8%), le sabinène (0,3 – 0,5%), l' α -terpinène (0,3 – 0,5%) et l' α -thujène (0,2 – 0,3%).

Ces résultats nous amènent à supposer que nos huiles essentielles appartiennent à un seul groupe chimique à thymol/limonène/*p*-cymène/ γ -terpinène. Ceci a déjà été confirmé lors de l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata*, récoltée dans différentes stations (Pierre du chat, Tégma, Ben-Sakrane, Maghnia, Sabra, Meffrouche et Beni-saf) de la région de Tlemcen (**Bekhechi, 2002**).

Les huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* ont fait l'objet de plusieurs travaux décrivant leurs compositions chimiques très variés :

- ❖ Les premiers travaux effectués par **Nigram et al.** en **1963**, rapportent que l'huile essentielle extraite des graines de cette espèce provenant d'Inde est riche en thymol et en γ -terpinène
- ❖ L'analyse de l'huile essentielle des graines de cette espèce végétale de provenance de Pakistan (**Ashraf et Batty, 1975**) et celle de provenance de Turquie (**Chialva et al.** en **1993**), leur a permis d'obtenir des teneurs élevées en thymol, en *p*-cymène et en γ -terpinène.
- ❖ Une étude de la composition chimique de l'huile essentielle des graines et de la partie aérienne de cette plante, effectuée par **Balbaa et al.** en **1973**, révèle l'existence de deux groupes chimiques différents, soit : thymol/*p*-cymène/ γ -terpinène (graines) ; γ -terpinène/*p*-cymène/thymol (partie aérienne).
- ❖ L'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*, de provenance d'Ethiopie, révèle sa richesse en carvacrol (69%) (**Demissew, 1993**).

- ❖ D'autre part, l'analyse chimique de huile essentielle de graines de cette même espèce, provenant d'Australie, a permis à **Gersbach et Reddy** en **2002**, de mettre en évidence une forte teneur en thymol (45,6%), en γ -terpinène (23,8%) et en *p*-cymène (21,25%).
- ❖ **Khajeh et al.** en **2004** rapportent également que l'huile essentielle des graines de cette plante, récoltée en Inde, est riche en thymol (49,0%), en γ -terpinène (30,8%) et en *p*-cymène (15,7%).
- ❖ Par contre, la caractérisation de l'huile essentielle des graines d'*Ammoïdes verticillata*, récolté en Inde, montre que les huiles essentielles de cette plante présentent de fortes teneurs de carvone (46,2%) et de limonène (38,1). Ce type chimique a été signalé uniquement par **Choudhury et al.** en **1998**.

L'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* d'Algérie a fait l'objet de deux études. **Kambouche et El-Abed** (2003) ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*, récolté dans la région d'Oran. L'analyse de cette huile par CPG-Ir, CPG-SM et par RMN ^{13}C et RMN ^1H leur a permis la mise en évidence de 20 composés représentant 99,9% de la composition globale. L'isothymol est le composé majoritaire avec une teneur de 51,20%. D'autres composés sont également identifiés en quantités appréciables : le *p*-cymène (14,08%), le thymol (12,96%), le limonène (11,89%) et le γ -terpinène (6,79%). Par contre, la teneur en carvacrol est très faible, de l'ordre de 0,25%. Ces auteurs ont trouvé de l'isothymol comme composé majoritaire.

Plus récemment, **Bendahou** (2007) a décrit l'analyse par CPG et par CPG-SM de l'huile essentielle de cette même plante récoltée à Terni (région de Tlemcen). Les composés majoritaires sont : thymol (50,1%), suivi de *p*-cymène (15,6%), de limonène (15,0%), de carvacrol (8,8%) et de γ -terpinène (6,6%).

Ces études réalisées sur la détermination de la composition de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*, ont démontré que le type chimique (thymol/limonène/*p*-cymène/ γ -terpinène) obtenu pour nos huiles essentielles n'a pas été cité précédemment. De plus, les huiles essentielles de cette espèce sont caractérisées par une variabilité de la composition chimique, du probablement au stade du développement de cette espèce. Certains travaux montrent que le γ -terpinène prédomine au début du cycle végétatif de la plante, ensuite, durant la floraison, une grande quantité de *p*-cymène et une certaine teneur en thymol apparaissent. Par contre, à la maturité de la plante, les phénols dont principalement le thymol se trouvent en abondance (**Choudhury et al.**, 1998).

La variabilité de la composition chimique de cette huile essentielle est également influencé par l'origine et la durée de stockage des graines de cette plante (Ashraf et Bhatti, 1975). En effet, il a été démontré que les teneurs en thymol et en carvacrol diminuent alors que les proportions en γ -terpinène et en *p*-cymène augmentent après un stockage prolongé des graines de cette espèce (Georgiev et Khadziiski, 1969).

III.5. Analyse des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*

Appartenant à la famille des Lamiacées, les espèces *Mentha pulegium* et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* sont des plantes aromatiques très riches en substances volatiles. Elles figurent parmi les plantes les plus communément utilisées en médecine traditionnelle. Les huiles essentielles de ces espèces sont caractérisées par une abondance en pulégone. Ainsi, nous avons choisi ces espèces pour pouvoir comparer le pouvoir antibactérien de leurs huiles essentielles à celui de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, qui révèle également une richesse en pulégone.

Pour cela, il était nécessaire d'avoir une connaissance de la composition chimique des huiles essentielles de ces espèces, poussant spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie). Nous avons procédé à une analyse de trois échantillons pour chaque huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et une technique spectroscopique (RMN ^{13}C). Ces échantillons sont récoltés dans une seule station, soit Pierre du Chat pour *Mentha pulegium* et Maghnia pour *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, et ceci sur trois années successives.

Des spectres de ces huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification.

➤ Analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par CPG-Ir et par RMN ^{13}C , nous a permis d'identifier seize composés, représentant au total entre 94,9 et 98,6% de la composition globale de l'huile essentielle. Les constituants identifiés par RMN ^{13}C , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés (Tableau 34). Nous préciserons également que pour chaque composé, tous les signaux des

carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

Tableau (34) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Composés identifiés	IRa	IRp	PM	F 1	PM 5
α-Pinène	929	1025	0,3	0,4	0,3
β-Pinène	969	1112	0,3	0,3	0,2
Octan-3-ol	976	1390	0,9	0,9	1,2
Myrcène	979	1161	0,2	0,1	-
para-Cymène	1010	1272	0,1	0,1	0,1
Limonène*	1020	1202	0,9	1,0	0,7
1,8-Cinéole*	1020	1210	0,1	0,1	0,2
Menthone	1135	1467	7,7	23,1	10,9
Isomenthone	1141	1492	0,3	0,7	0,4
cis-Isopulégone*	1149	1572	0,9	0,7	0,7
trans-Isopulégone*	1149	1583	0,9	0,7	0,6
néo-Menthol*	1149	1593	1,0	0,6	0,2
Pulégone	1219	1653	78,0	62,7	75,8
Pipéritone	1226	1729	0,5	0,9	0,5
Pipériténone	1308	1926	6,4	2,4	3,9
Oxyde de caryophyllène	1569	1986	0,1	0,2	0,1
Total (%)			98,6	94,9	95,9

Légende : PM/PM 5/ F 1 : Pierre du chat 2003/2004/2005.

L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

Le spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est reproduit sur la figure (20), ainsi que la structure de la pulégone, composé majoritaire de cette huile essentielle.

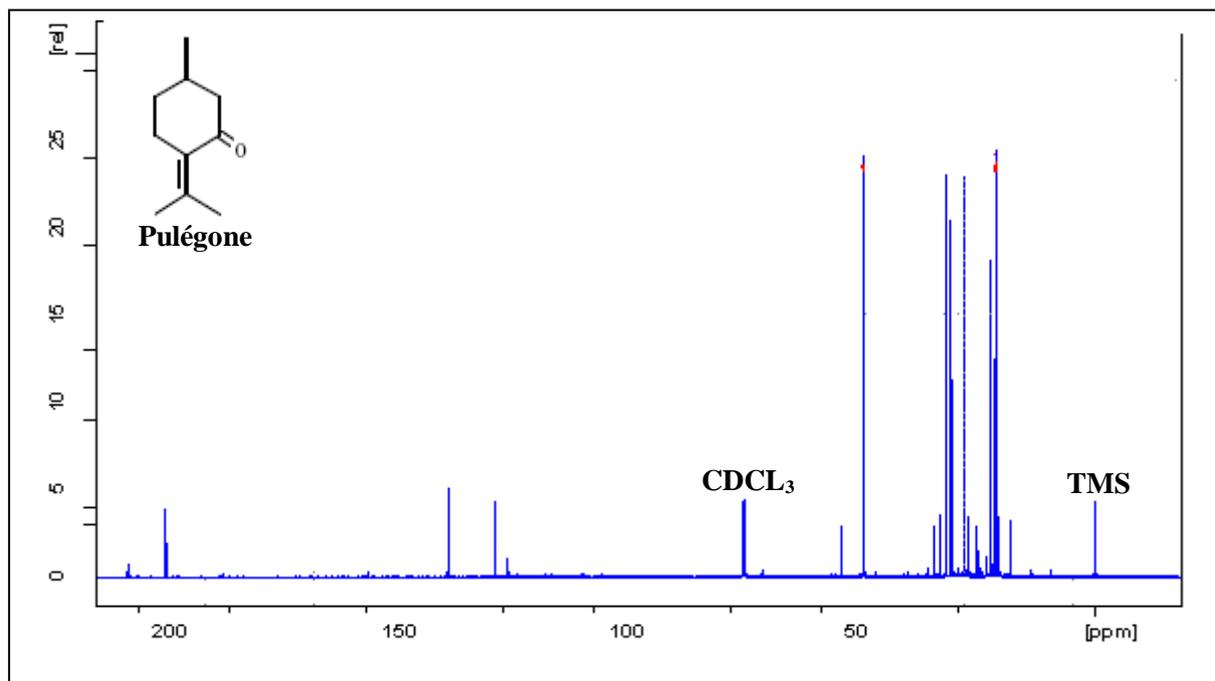
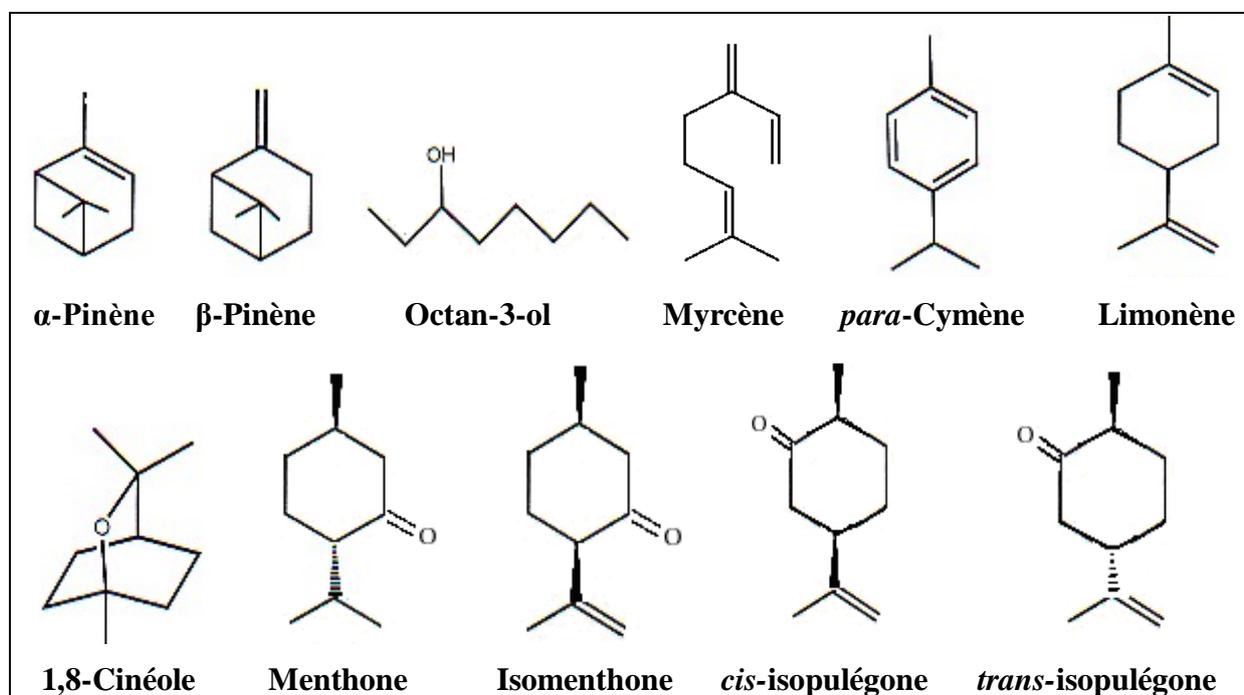


Figure (20) : Spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (échantillon récolté durant l'année 2004)

Dans la figure (21), nous donnons, respectivement, les structures des molécules identifiées par RMN ^{13}C en analysant ces huiles essentielles.



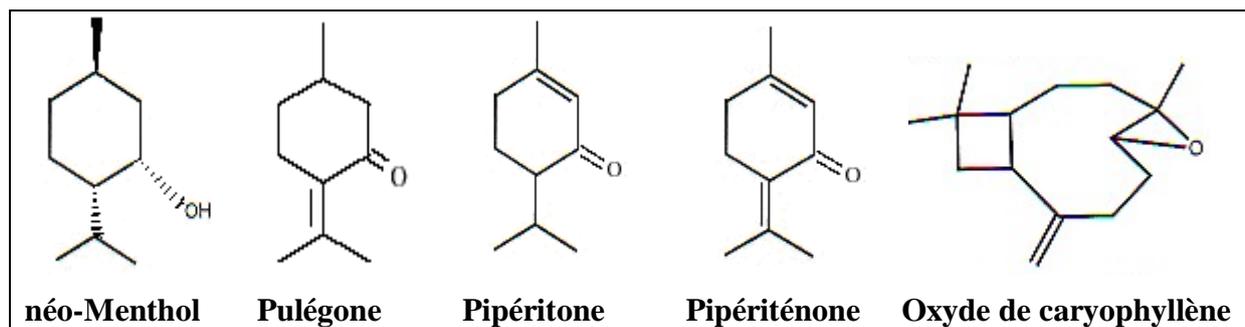


Figure (21) : Structure des molécules identifiés par RMN ^{13}C dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Les trois échantillons analysés sont qualitativement très proches. En consultant le tableau (34), nous pouvons constater que la quasi-totalité des constituants identifiés sont des monoterpènes, avec notamment une forte prépondérance des monoterpènes oxygénés (91,9 – 95,8%). Cette fraction est dominée par des composés oxygénés possédant un squelette de type *p*-menthane en position 3. Nous pouvons noter, parmi eux la forte abondance de la pulégone et du menthone. En effet, ces derniers représentent respectivement (62,7 – 78,0%) et (7,7 – 23,1%), soit entre 85,7 et 86,7% au total.

Le reste des monoterpènes oxygénés ne représentent que 6,0 à 10%, et leurs teneurs sont faibles : le 1,8-cinéole (0,1 – 0,2%), l'isomenthone (0,3 – 0,7%), le *cis*-isopulégone (0,7 – 0,9%), le *trans*-isopulégone (0,6 – 0,9%), le néo-menthol (0,2 – 1,0%), la pipéritone (0,5 – 0,9%) et la pipériténone (2,4 – 6,4%).

Le taux des monoterpènes hydrocarbonés identifiés ne représente que 1,3 à 1,9% de la composition globale. Ces oléfines sont présents en proportions très faibles : le limonène (0,7 – 1,0%), l' α -pinène (0,3 – 0,4%), le β -pinène (0,2 – 0,3%), le myrcène (0,1 – 0,2%) et le *p*-cymène (0,1%).

Un seul composé linéaire, l'octan-3-ol (0,9 – 1,2%) est également identifié. L'oxyde de caryophyllène (0,1 - 0,2%) est le seul sesquiterpène identifié lors de l'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

Les diverses études effectuées sur la caractérisation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont permis d'avancer l'existence d'une variabilité chimique de cette huile essentielle :

- ❖ La première étude effectuée sur la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est celle de **Zwaving et Smith en 1971**, qui ont identifiés les composés majoritaires suivants : la pipéritone (70%), le limonène (11%), le menthone (8%) et l'isomenthone (7%), à partir de pieds récoltés en Australie.

- ❖ **Proença Da Cunha et al. (1976)**, ont identifié la pulégone (42%), le menthol (16,24%), l'isopulégone (6,80%) et l'isomenthone (5,02%) dans l'huile essentielle de cette espèce récoltée en Angola.
- ❖ L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de provenance d'Espagne (**Lawrence, 1978**) celle de provenance du Maroc (**Chebli et al., 2003**) et celle de provenance de Grèce (**Daferera et al., 2003**), leur a permis d'obtenir des teneurs élevées en pulégone (67,6 – 85,4%).
- ❖ L'huile essentielle de *Mentha pulegium* provenant d'Uruguay, contient de la pulégone (26,8 – 41,1%) et de l'isomenthone (35,6 – 40,6%) (**Bigo De Grosso et Moyna, 1985**).
- ❖ En 1995, les travaux réalisés par **Sivropoulou et al.**, sur l'huile essentielle de *Mentha pulegium* provenant de 3 provinces de Grèce, ont montré l'existence de 3 races chimiques différentes à savoir : pulégone/pipéritone, pulégone/isomenthone et isomenthone/menthone.
- ❖ Une étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, poussant à l'état spontané en Grèce, a permis à **Skrubis** en 1972, de mettre en évidence une forte teneur en pulégone (61,9%).
- ❖ Enfin, **Lamiri et al.** en 2001, avancent que l'huile essentielle de cette espèce végétale récoltée au Maroc, est caractérisée par une forte abondance en pulégone (66,5%).

Selon, l'ensemble des travaux réalisés sur la caractérisation de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, nous pouvons conclure que cette huile est très riche en pulégone, suivi de menthol, ou de piperitone, ou de menthone et/ou d'isomenthone.

➤ **Analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta***

L'analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* par CPG-Ir et par RMN ¹³C, nous a permis d'identifier dix sept composés, représentant au total 82,2 à 96,2% de la composition globale de l'huile essentielle. Un spectre pour chaque huile essentielle est enregistré, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. Les constituants identifiés par RMN ¹³C, sont ensuite aisément repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés (Tableau 35). Nous préciserons également que pour chaque composé, tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

Tableau (35) : Composés identifiés par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*

Composés identifiés	IRa	IRp	MN	SC 3	Ne 1
α-Pinène	929	1025	0,7	0,4	0,8
Camphène	942	1069	0,2	0,3	0,2
Sabinène	964	1122	0,7	0,2	0,6
β-Pinène	969	1112	1,2	0,4	1,1
Limonène*	1019	1202	2,1	0,7	1,7
1,8-Cinéole*	1019	1212	8,2	10,3	6,6
Linalol	1081	1543	0,2	0,1	0,2
Menthone	1133	1465	9,6	9,3	8,5
Isomenthone	1144	1495	17,2	27,1	24,1
néo-Menthol*	1150	1594	7,1	5,5	5,6
cis-Isopulégone*	1150	1572	0,6	0,5	0,5
trans-Isopulégone*	1150	1583	0,5	0,3	0,4
néo-iso-Menthol	1169	1630	10,0	5,9	9,6
α-Terpinéol	1172	1701	0,9	0,7	0,7
Pulégone	1218	1651	35,5	20,4	33,3
trans-Caryophyllène	1418	1593	0,7	0,1	0,8
Germacrène D	1475	1709	0,8	0,1	1,0
Total (%)			96,2	82,2	95,7

Légende: MN/SC 3/Ne 1 : Maghnia 2003/2004/2005.

L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque * (dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)). IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

Le spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* est représenté sur la figure (22), ainsi que la structure de la pulégone, composé majoritaire dans l'huile essentielle de *Satureja calamintha*, récoltée durant l'année 2005.

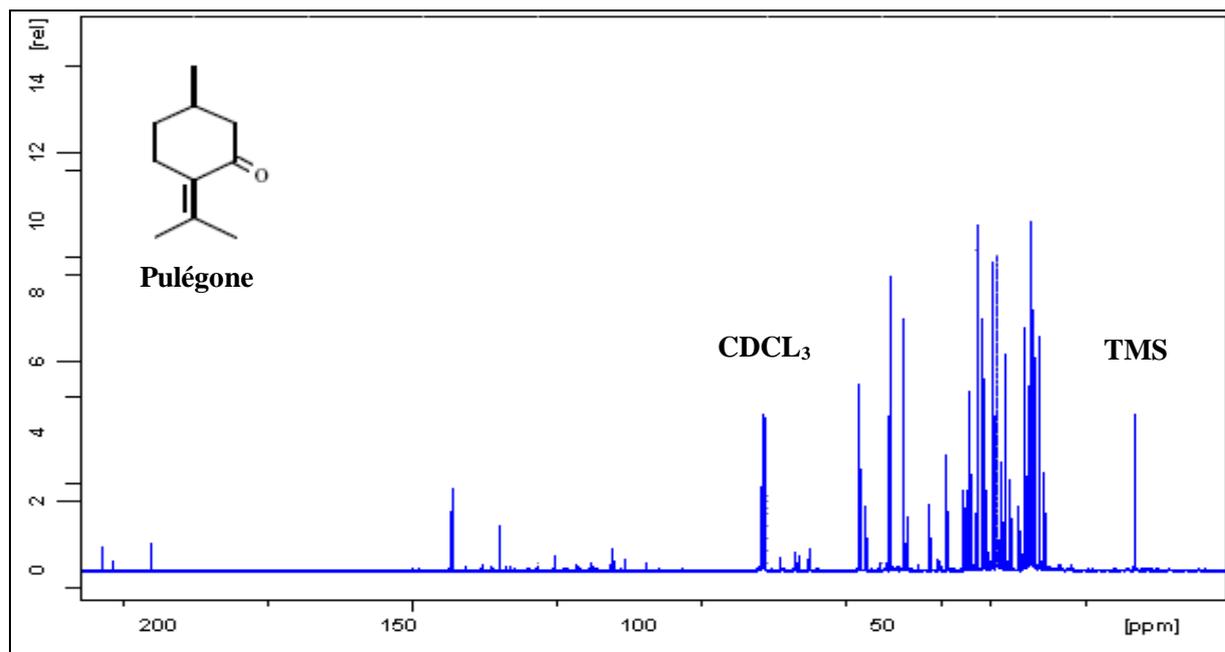
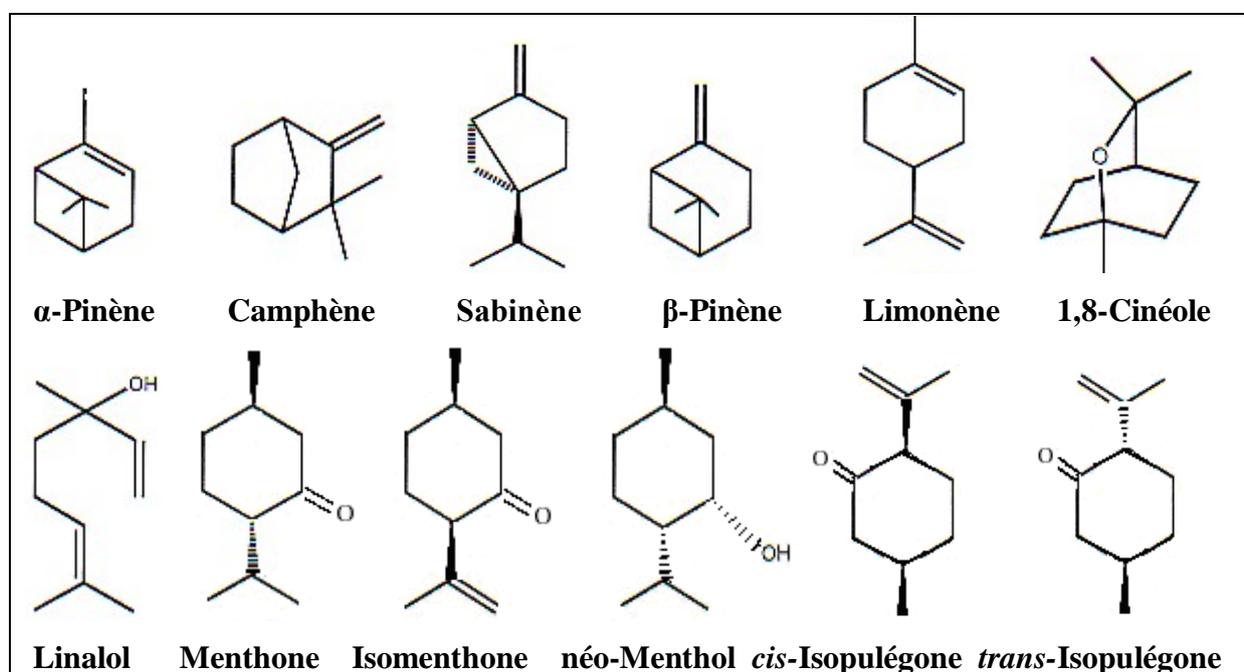


Figure (22) : Spectre RMN ^{13}C de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (échantillon récolté durant l'année 2005)

Dans la figure (23), nous donnons, respectivement, les structures des molécules identifiées par RMN ^{13}C en analysant ces huiles essentielles.



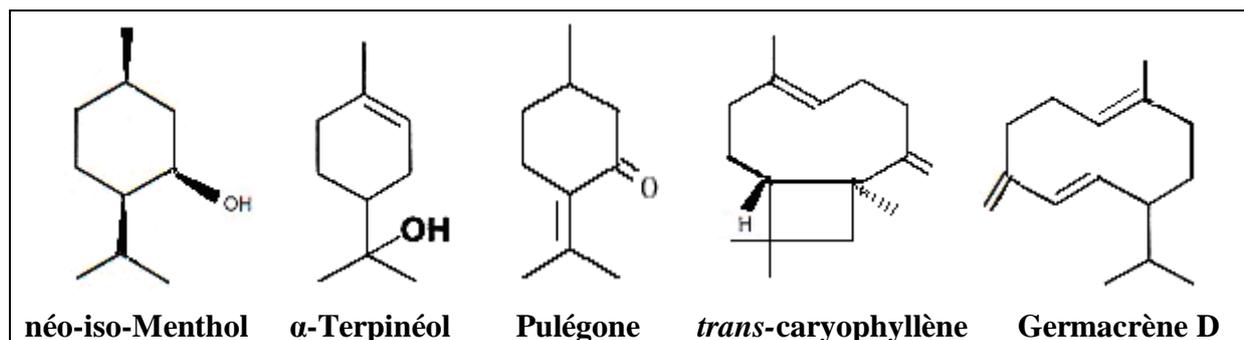


Figure (23) : Structures des molécules identifiées par RMN ^{13}C dans l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*

Les trois échantillons analysés sont qualitativement très proches. En consultant le tableau (35), nous pouvons constater que sur dix sept composés identifiés, quinze sont des monoterpènes, avec notamment une forte prépondérance des monoterpènes oxygénés (80 – 89,8%) dont la plupart sont des composés possédant un squelette du type *p*-menthane en position 3. Nous pouvons noter pour les échantillons MN et Ne 1, une forte abondance de la pulégone (33,3 – 35,5%), suivi de l'isomenthone (17,2 - 24,1%). Quatre autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés en quantités appréciables : le néo-isomenthol (9,6 – 10,0%), le menthone (8,5 – 9,6%), le 1,8-cinéole (6,6 – 8,2%) et le néo-menthol (5,6 – 7,1%).

Les monoterpènes oxygénés de l'échantillon SC 3 sont dominés par l'isomenthone (27,1%), suivi par la pulégone (20,4%). Les composés présents en quantités appréciables, cités précédemment, sont également identifiés dans cet échantillon, soit le 1,8-cinéole (10,3%), le menthone (9,3%), le néo-menthol (5,5%) et le néo-isomenthol (5,9%).

Par ailleurs, lors de l'analyse de ces huiles essentielles, nous avons caractérisée 5 autres monoterpènes de nature oléfiniques qui sont présents en faibles teneurs : l' α -pinène (0,4 – 0,8%), le camphène (0,2 – 0,3%), le sabinène (0,2 – 0,7%), le β -pinène (0,4 – 1,2%) et le limonène (0,7 – 2,1%).

Un seul sesquiterpène hydrocarboné, le germacrène D est également identifié (0,1 – 1,0%). Le *trans*-caryophyllène (0,1 – 0,8%) est le seul sesquiterpène oxygéné identifié lors de l'analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha*.

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* a fait l'objet de plusieurs travaux dont lesquels, les auteurs avancent l'existence de différents types chimiques au sein de cette espèce.

Selon la littérature, les études menées sur cette plante, nous amènent à conclure que toutes les huiles essentielles de cette espèce sont caractérisées par une prédominance de monoterpènes possédant un squelette de type *p*-menthane. Cependant, la comparaison de tous

les résultats obtenus lors de l'analyse de ces huiles essentielles, nous amènent à supposer la présence de trois types chimiques :

- ❖ Chimiotype à pulégone (composé majoritaire), associé à d'autres constituants : soit au menthone et/ou isomenthone (**De Pooter et Schamp, 1986 ; De Pooter et al., 1987 ; Velasco-Negueruela et al., 1987 ; Souleles et al., 1987 ; Ristorcelli et al., 1996 ; Şarer et Pançali, 1998**), soit au menthol et ses isomères (**Adzet et Passet, 1972 ; Velasco-Negueruela et al., 1996**), soit au pipériténone (**Akgül et al., 1991**), soit encore au pipéritone et oxydes de pipériténone (**De Pooter et Schamp, 1986**). Ainsi, la plupart des études effectuées sur la caractérisation de l'huile essentielle de *Satureja calamintha*, nous permettent de conclure que les huiles essentielles de cette espèce font parti de ce groupe chimique. Il en est de même pour nos échantillons. Par ailleurs, **Ristorcelli et al. (1996)**, ont effectué une étude sur la variabilité chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* récoltée en Corse (France). Ces auteurs avancent que certains échantillons sont caractérisés par une forte teneur en menthone, suivi de la pulégone.
- ❖ Le deuxième type est caractérisé par une prédominance de l'oxyde de pipéritone et/ou de l'oxyde de pipériténone (**De Pooter et Schamp, 1986 ; kokkalou et Stefanou, 1990 ; Kirimer et al., 1992 ; Fraternali et al., 1998 ; Mastelic et al., 1998**).
- ❖ Un type chimique (Carvone/1,8-cinéole) particulier a été signalé uniquement par **Pérez-Alonso et al. en 1993**.

Enfin, en **2000**, **Baldovini et al.**, ont étudié l'évolution de la composition chimique de l'huile de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, au cours du cycle végétatif de la plante afin de déterminer la période propice pour la récolte. Ensuite, ils ont analysé 40 échantillons de l'huile essentielle de cette même espèce récoltée dans différentes régions en Corse, durant la période de pleine floraison, afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme chimique au sein de cette plante.

Ces auteurs ont pu identifier 28 composés dans ces échantillons qui ont été soumis à un traitement statistique des données. Ceci, leur permis de définir trois groupes d'huiles essentielles au sein de la population :

- Le premier groupe (16 échantillons) est caractérisé par une prédominance en menthone (teneur moyenne : 43,4%), suivi de la pulégone (18,9%), de l'oxyde de pipéritone (8,3%) et de limonène (5,2%).

- Les échantillons (11) appartenant au groupe II, sont caractérisés par une forte teneur en oxyde de pipéritone (pourcentage moyen : 30,5%), suivi de l'oxyde de pipériténone (12,5%) et de limonène (12,4%).
- Dans les échantillons (13) du groupe III, le pourcentage moyen de la pulégone est de l'ordre de 55,6%, suivi de menthone (20,0%) et de limonène (6,0%).

Nous pouvons constater que chaque type chimique signalé dans la littérature, figure dans un des trois groupes définis par **Baldovini et al. (2000)** lors de l'étude de la variabilité de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*. Le chimiotype (carvone/1,8-cinéole), signalé par **Pérez-Alonso et al. (1993)** et le notre (Isomenthone /pulégone), n'ont pas été rapporté dans aucune analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*.

Cependant, ces travaux nous permettent de conclure que l'origine de cette plante ne semble pas avoir une influence sur la composition de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*.

Enfin, comme *Mentha pulegium*, cette espèce est caractérisée par une variabilité de la composition chimique au cours du cycle de développement de cette plante.

IV. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes

L'OMS estime qu'en moyenne 190 millions de personnes sont hospitalisées chaque année dans le monde et que 9 millions d'entre elles contractent une infection à cette occasion (**Borrel, 2000**). Les infections liées à l'hospitalisation sont appelées infections nosocomiales. Elles sont soit liées à un soin (ou une intervention) ou simplement dues à l'environnement hospitalier. Ces infections se présentent sous diverses formes : infections urinaires, respiratoires, digestives ou post-opératoires. Elles peuvent aussi être dues à la contamination du matériel : cathéters et tubes trachéaux (**Borrel, 2000**). Les microorganismes présents dans l'univers hospitalier sont extrêmement variés et peuvent appartenir aussi bien aux espèces opportunistes qu'aux espèces habituellement pathogènes pour l'homme.

Pour cela, nous avons jugé intéressant d'étudier la sensibilité des huiles essentielles des différentes espèces végétales étudiées vis-à-vis de 18 bactéries pathogènes (Tableau 36), dont 7 sont des souches de référence et 11 sont des bactéries d'origine hospitalières qui sont préalablement identifiées.

Tableau (36) : Liste des bactéries utilisées pour l'étude de pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes

Bactéries de référence	Codes	Bactéries d'origine hospitalière	Biotypes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P₃)	ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P₂)	2212004
<i>Klebsiella pneumoneae</i> (KL₂)	ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoneae</i> (KL₁)	5215773
<i>Escherichia Coli</i> (E₄)	ATCC 25922	<i>Escherichia Coli</i> (E₁)	5044172
<i>Listeria monocytogenes</i> (L₁₁)	ATCC 19111	<i>Escherichia Coli</i> (E₂)	5044552
<i>Listeria monocytogenes</i> (L₁₅)	ATCC 19115	<i>Escherichia Coli</i> (E₃)	5144572
<i>Staphylococcus aureus</i> (St₁)	ATCC 601	<i>Escherichia Coli</i> (E₆)	5044552
<i>Staphylococcus aureus</i> (St₃)	ATCC 43866	<i>Citrobacter freundii</i> (Ci)	1554512
		<i>Entrobacter cloaceae</i> (En)	1305573
		<i>Salmonella typhi</i> (SL)	4404540
		<i>Proteus mirabilis</i> (Pr)	0536040

	<i>Staphylococcus aureus</i> (St ₂)	6736153
--	---	----------------

Les bactéries à Gram négatif sont responsables de plus de 50% des infections nosocomiales. Leur réservoir est le plus souvent le tube digestif (entérobactéries), mais il peut être environnemental (*Pseudomonas aeruginosa*). Les infections urinaires, les infections de plaies opératoires, les pneumonies et les bactériémies nosocomiales représentent plus de 80% des infections rapportées (**Gayraud et Lortholary, 2003**). Les entérobactéries (*Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter...*) se comportent généralement comme des bactéries opportunistes souvent impliquées dans les infections nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Le microorganisme le plus important dans les infections nosocomiales est *Escherichia coli*, un habitant normal des intestins de l'homme. Les infections du tractus urinaire sont les infections le plus souvent rencontrées dans l'environnement hospitalier. Parmi, ces infections, un tiers est provoqué par *E. coli*, un autre tiers par *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae*..etc. La plupart des infections restantes sont provoquées par d'autres bactéries à Gram négatif. L'infection est généralement une conséquence du cathétérisme urinaire des patients immobilisés (**Perry et al., 2004**).

Historiquement, *Pseudomonas aeruginosa* représente 11% des infections nosocomiales (**Régnier, 2005**) sous forme d'infection urinaire, du sang, des plaies et de l'appareil respiratoire (**De Billerbeck, 2005**). Il a été un des agents principaux de suppurations après les interventions chirurgicales. Il peut également être responsable de bactériémie chez les cancéreux ou les leucémiques sous chimiothérapie et de thrombophlébites sur cathéter veineux (**Perry et al., 2004**).

Les infections respiratoires qui apparaissent comme une forme de pneumonie sont souvent rencontrées et peuvent être provoquées par *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, ou *Klebsiella sp.*. Ces infections pulmonaires rencontrées chez les patients de réanimation sous ventilation assistée, peuvent entraîner la mort et sont dues à des appareils respiratoires et à l'incapacité du patient à dégager ses poumons (**Perry et al., 2004**).

Staphylococcus aureus tient une place très importante aussi bien dans les infections communautaires que dans les infections nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2005**). C'est un souci important également pour les patients de chirurgie. Il est estimé que 7% de l'ensemble des malades de chirurgie ont des problèmes d'infections post-opératoires. Il est responsable d'infections suppuratives de la peau et des muqueuses, suite à des plaies traumatiques ou chirurgicales (**Lowy, 1998, De Billerbeck, 2005**). Il peut également occasionner des infections de la sphère ORL, des infections oculaires, des infections urogénitales, ostéo-

articulaires, cardiaques, méningées et une proportion importante de septicémies pouvant être mortelles (Gayraud et Lortholary, 2003).

Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides (Lowy, 1998).

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire pouvant parfois provoquer des infections graves (méningites, septicémies). Ces infections sont généralement d'origine alimentaire (Vazquez-Boland et al., 2001).

Les salmonelles sont des bactéries de l'intestin. Chez de nombreux sujets, elles peuvent être présentes sans entraîner de symptômes. En outre, la fièvre typhoïde est une septicémie à point de départ due entre autre à *Salmonella typhi*. La contamination se fait habituellement par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Ces derniers, sont le plus souvent d'origine animale (coquillage, viande hachée, œufs). La contamination des aliments peut aussi être d'origine humaine et liée à des manipulations par un personnel porteur de salmonelles (Nauciel et Vildé, 2005).

Par ailleurs, plusieurs bactéries pathogènes telles que : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, sont responsables d'intoxications alimentaires, de la détérioration des aliments et entraînent des maladies après ingestion des préparations alimentaires contaminées par ces agents (Deak et Beuchat, 1996).

IV.1. Identification des bactéries d'origine hospitalière

Nous avons vérifié la purification et l'identification des souches bactériennes d'origine hospitalière en étudiant leurs caractères morphologiques et biochimiques. Pour cela, nous avons utilisé en premier lieu des milieux sélectifs :

- Milieu Mac Conkey pour les entérobactéries, qui apparaissent sous forme de colonies variables selon les différentes espèces et de couleur rouge à rose sur ce milieu ;
- Gélose nutritive pour les *Pseudomonas*, leurs colonies sont de grande taille, opaque à centre foncé, et à périphérie claire et déchiquetée. Ces colonies colorent la gélose en vert ;
- Milieu Chapman pour le *Staphylococcus aureus*, qui apparaît sous forme de petites colonies rondes, lisses et colorées en jaune d'or, sur ce milieu.

Ensuite, nous avons étudié leur type respiratoire ainsi que leurs caractères morphologiques (Tableau 37) :

- Aspect et mobilité des colonies, déterminés par un examen microscopique à l'état frais
- Coloration de Gram

Tableau (37) : Caractères morphologiques et type respiratoire des différentes souches

Souches	Forme	Gram	Mobilité	Type respiratoire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P ₂)	Coco-bacille	-	+	Aérobie strict
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KL ₁)	Bacille	-	-	Aéro-anaérobie
<i>Escherichia Coli</i> (E ₁)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Escherichia Coli</i> (E ₂)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Escherichia Coli</i> (E ₃)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Escherichia Coli</i> (E ₆)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Citrobacter freundii</i> (Ci)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Entrobacter cloaceae</i> (En)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Salmonella typhi</i> (SL)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Proteus mirabilis</i> (Pr)	Bacille	-	+	Aéro-anaérobie
<i>Staphylococcus aureus</i> (St ₂)	Cocci	+	-	Aéro-anaérobie

Enfin, nous avons déterminé les caractéristiques biochimiques en utilisant les plaques d'identification API 20 E (pour *Pseudomonas aeruginosa* et pour les entérobactéries, Tableau 38), et API Staph (pour *Staphylococcus aureus*, Tableau 39). L'identification des différentes souches est faite selon le catalogue analytique.

Tableau (38) : Identification des entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* par plaque API 20 E

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	Biotypes	
P ₂	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2212004
KL ₁	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5215773
E ₁	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	5044172
E ₂	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	5044552
E ₃	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	5144572
E ₆	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	5044552
Ci	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	1554512
En	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1305573
SL	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	4404540
Pr	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	0536040

Tableau (39) : Identification du *Staphylococcus aureus* par plaque API STAPH

Souche	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR	Biotypes
St ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	6736153

O : aucun substrat

LSTR : résistance à la lysostaphine

IV.2. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des différentes plantes

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

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité de ces huiles essentielles par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé :

- la concentration minimale d'inhibition (CMI) en utilisant la méthode de contact direct en milieu gélosé
- la concentration minimale bactéricide (CMB) en appliquant la méthode de contact direct en milieu liquide
- La quantité minimale inhibitrice (QMI) en utilisant la méthode de microatmosphère.

Nous avons testé l'activité antibactérienne d'un seul échantillon d'huile essentielle pour chaque plante.

IV.2.1. Détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion par disque (aromatogramme)

L'aromatogramme est une méthode qualitative, simple, appliquée en routine à toute bactérie considérée comme pathogène. Cette méthode permet d'explorer un grand nombre d'huiles essentielles vis-à-vis de chaque souche.

➤ Huiles essentielles à composé majoritaire : la pulégone

Nous rapportons dans le tableau (40) les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Satureja calamintha*, de *Ziziphora hispanica* et de *Mentha pulegium* relatives aux souches bactériennes testées.

Tableau (40) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles à composé majoritaire à pulégone relatives aux différentes souches selon la méthode de Vincent

Souches bactériennes	<i>Satureja calamintha</i> (MN)	<i>Mentha pulegium</i> (PM 5)	<i>Ziziphora hispanica</i> (Z 1)	Témoin
P ₂	7,4	6,0	6,0	6,0
P ₃	7,8	6,0	6,0	6,0
KL ₁	11,2	9,2	8,0	6,0
KL ₂	11,4	9,6	8,0	6,0
L ₁₁	12,0	9,8	8,4	6,0
L ₁₅	12,2	9,8	8,3	6,0
Pr	12,6	10,0	9,0	6,0
E ₆	13,0	10,0	9,0	6,0
E ₂	13,4	10,8	9,4	6,0
E ₃	13,4	11,0	9,4	6,0
Ci	13,8	11,8	9,7	6,0
E ₁	14,0	12,0	10,3	6,0
En	14,2	12,4	10,4	6,0
St ₂	15,4	13,4	12,0	6,0
E ₄	15,8	13,8	12,4	6,0
St ₁	16,4	15,0	12,7	6,0
St ₃	16,8	15,4	13,0	6,0
SL	17,0	15,8	13,3	6,0

Légende : MN : HE de *Satureja calamintha* (2003), PM 5 : HE de *Mentha pulegium* (2004), Z 1: HE de *Ziziphora hispanica* (2004). Le diamètre des disques est compris dans le diamètre du halo d'inhibition

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Baudoux, 2001 ; Sağdaç, 2003) ou à 15 mm (Rossi, 2003).

Ainsi, l'huile essentielle de *Satureja calamintha* agit de façon active sur la majorité des bactéries testées à l'exception des genres *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *Listeria* qui sont particulièrement très résistantes. Ces bactéries sont généralement sensibles aux huiles essentielles riches en phénols (Svoboda et Deans, 1995).

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont toujours présenté une résistance vis-à-vis de des huiles essentielles, à composé majoritaire, la pulégone (**Sivropoulou et al., 1995 ; Mimica-Dukić et al., 2003 ; Salehi et al., 2005**).

Par contre, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et celle de *Ziziphora hispanica* révèlent une faible activité vis-à-vis de la majorité des souches testées.

Par ailleurs, on remarque que les trois espèces de *Staphylococcus aureus* sont très sensibles à l'ensemble des huiles essentielles. En effet, la plupart des études rapportent que les bactéries à Gram (+) sont généralement plus sensibles que celle à Gram (-) (**Mimica-Dukić et al., 2003**).

Il est intéressant également de noter que l'ensemble des huiles essentielles testées sont très efficaces contre *Salmonella typhi*. Il a été démontré que cette espèce microbienne manifeste une très grande résistance aux agents antimicrobiens (**Mimica-Dukić et al., 2003**).

L'huile essentielle de *Satureja calamintha* (pulégone : 35,5%) est nettement plus active que celles de *Mentha pulegium* et de *Ziziphora hispanica* qui révèlent une richesse en pulégone (75,8 et 77,6%, respectivement). En effet, il a été démontré que la pulégone présente une faible, voire une absence activité antimicrobienne lors de l'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles caractérisées par une forte teneur en pulégone, parmi elles, celle de *Mentha pulegium* (**Arras et Usai, 2001 ; Chebli et al., 2003**). En outre, **Flamini et al. (1999)**, ont testée l'activité de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* et de ses constituants majoritaires vis-à-vis de plusieurs bactéries et moisissures. Ils rapportent que seule la pulégone a une activité antimicrobienne en particulier contre toutes les espèces de *Salmonella*. Ceci a déjà été confirmé par **Sivropoulou et al. en 1995**, et rapporté récemment par **Salehi et al. en 2005**. Ces derniers auteurs ont étudié l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Ziziphora clinopodioides* (pulégone 45,8%), ainsi que celle de son composé majoritaire vis-à-vis de sept bactéries par la méthode de diffusion sur disque. Ils avancent que les 2 échantillons possèdent un même niveau d'efficacité sur les microorganismes testés, soit entre 9 et 15 mm (selon les différentes bactéries) pour la pulégone et entre 11 à 18 mm pour huile essentielle, malgré qu'elle contienne une teneur appréciable en thymol (8%). Ils rapportent également que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* sont les souches les plus sensibles, inhibées à des CMI très importantes de l'ordre de 3800, 7500, 7500 µg/ml, respectivement.

En outre, l'importante activité de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* est du probablement à d'autres composés présents en quantités appréciables, soient : l'isomenthone (17,2%), le néo-iso-menthol (10,0%), le néo-menthol (7,1%) et le 1,8-cinéole (8,2%). Le pouvoir antimicrobien du cinéole et du menthol a été démontré par plusieurs travaux (**Juven et al., 1994 ; Kim et al., 1995 ; Mazzanti et al., 1998 ; Iscan et al., 2002 ; Cimanga et al., 2002**). En effet, il a été rapporté que le menthol et ses dérivés inhibent la réplication de l'ADN plasmique (**Schelz et al., 2006**). **Carson et al. (2002)** avancent que le 1,8-cinéole réduit significativement la tolérance de *Staphylococcus aureus* au NaCl et peut compromettre la membrane plasmique, ce qui confirme également l'importante sensibilité des staphylocoques. La forte activité de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* est du également à la présence du germacrène D (0,8%). En effet, il a été démontré récemment que ce composé possède aussi une activité antimicrobienne (**Ngassapa et al., 2003**).

Par contre, l'isomenthone a révélé une très faible activité vis-à-vis de huit bactéries appartenant au Gram (+) et au Gram (-), lors de l'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* à composé majoritaire : l'isomenthone (77,5%) (**Sivropoulou et al., 1995**).

Enfin, bien que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est attribuée principalement à son composé majoritaire, l'effet synergique ou antagoniste de chacun de ses constituants présents en faible teneur est également considéré (**Paster et al., 1995 ; Chang et al., 2001 ; Daferera et al., 2003**).

➤ **Huiles essentielles à composé majoritaire, thymol ou carvacrol**

Les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* spécifiques à chacune des bactéries testées sont donnés sur la figure (24) (Tableau (41), annexe II).

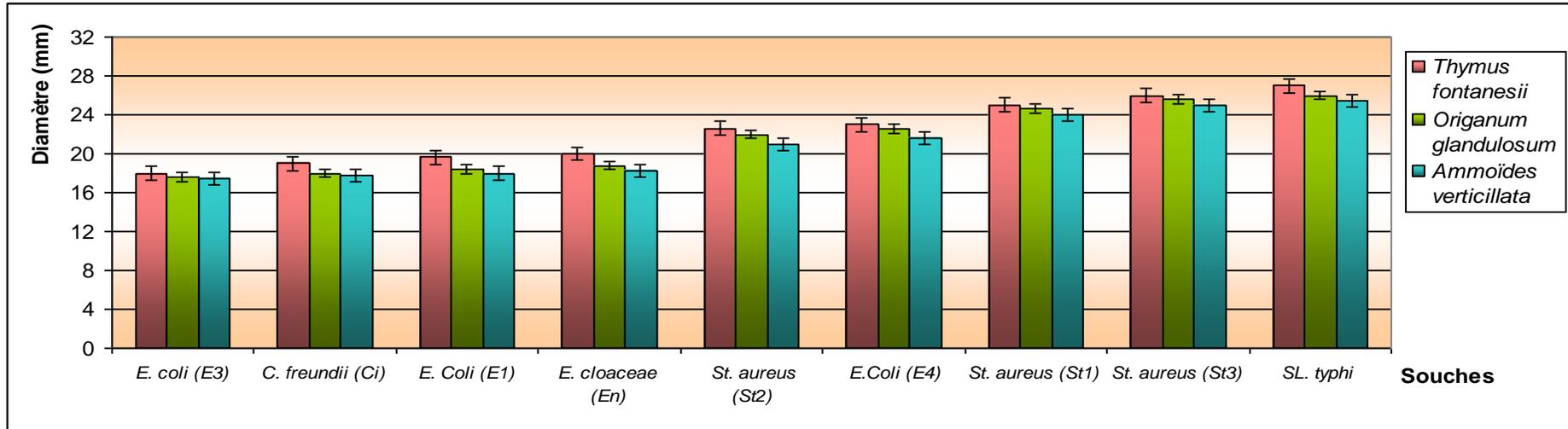
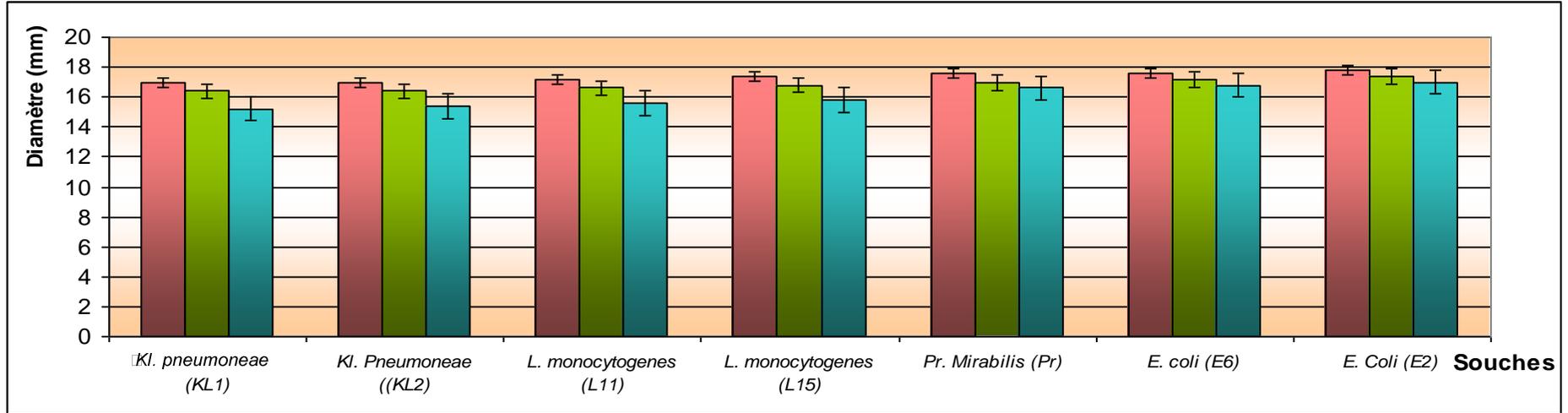


Figure (24) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles riches en phénols (thymol ou carvacrol) relatives aux différentes souches selon la méthode de Vincent

Les différentes souches bactériennes réagissent de la même manière à l'ensemble des huiles essentielles testées.

Nous pouvons noter qu'elles sont très efficaces sur la quasi-totalité des bactéries testées. Cependant, elles sont inactives sur les deux espèces de *Pseudomonas aeruginosa*, qui se révèlent très résistantes.

Ces différentes souches : *Klebsiellas*, *Listerias*, *Proteus*, *E. coli* (E₆, E₃, E₂) et *Citrobacter* ont sensiblement le même diamètre d'inhibition vis-à-vis de toutes ces huiles essentielles.

Nous constatons également que la souche d'*Escherichia coli* (E₄) de référence reste la plus sensible parmi les souches *E. coli*.

De même, Les souches de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella typhi* sont les plus sensibles, ayant des zones d'inhibition les plus importantes.

Piccaglia et al. (1993) ont déterminé le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Satureja montana* riche en carvacrol (26 et 41%), sur plusieurs souches notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoneae*, *E. coli*, *Citobacter frundii* et *Staphylococcus aureus*. Nous avons obtenus les mêmes résultats pour *Ps. aeruginosa* (7,1 mm) et pour *Kl. pneumoneae* (18,9 mm), par contre, ils ont enregistré une faible activité pour *Ci. freundii* (11,2 mm), *E. coli* (10,5 mm) et *St. aureus* (15,4 mm) par rapport à nos résultats, ceci est du au fait que leurs souches sont plus résistantes que les nôtres.



Photo VII

Photo VII : Aromatogramme : *E. coli* (E₆) (huile essentielle d'*Origanum glandulosum*)



Photo VIII

Photo VIII : Aromatogramme : *Staphylococcus aureus* (St₃) (huile essentielle de *Thymus fontanesii*)

IV.2.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu gélosé et détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé le pouvoir antibactérien des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu gélosé. Pour cela, nous avons sélectionné les trois huiles essentielles (*Thymus fontanesii*, *Origanum glangulosum* et *Ammoïdes verticillata*) possédant, comme nous l'avons vu précédemment, une forte capacité antibactérienne, pour lesquelles nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI). L'activité de ces huiles essentielles sur l'ensemble des souches bactériennes testées est considérable sauf sur les *Pseudomonas aeruginosa* qui se révèlent très résistantes même à la solution mère (Tableaux 42, 43, 44).

Tableau (42) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* selon la méthode de contact direct

Souches bactériennes	T	S. M. 9540 µg/ml	10 ⁻¹ 954 µg/ml	10-2 95,4 µg/ml	10-3 9,54 µg/ml
P ₂	+	+	+	+	+
P ₃	+	+	+	+	+
KL ₁	+	-	+	+	+
KL ₂	+	-	+	+	+
L ₁₁	+	-	+	+	+
L ₁₅	+	-	+	+	+
Pr	+	-	+	+	+
E ₆	+	-	+	+	+
E ₂	+	-	-	+	+
E ₃	+	-	-	+	+
Ci	+	-	-	+	+
E ₁	+	-	-	+	+
En	+	-	-	+	+
St ₂	+	-	-	+	+
E ₄	+	-	-	+	+
St ₁	+	-	-	+	+
St ₃	+	-	-	+	+
SL	+	-	-	+	+

Tableau (43) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* selon la méthode de contact direct

Souches bactériennes	T	S. M. 9130 µg/ml	10 ⁻¹ 913 µg/ml	10-2 91,3 µg/ml	10-3 9,13 µg/ml
P ₂	+	+	+	+	+
P ₃	+	+	+	+	+
KL ₁	+	-	+	+	+
KL ₂	+	-	+	+	+
L ₁₁	+	-	+	+	+
L ₁₅	+	-	+	+	+
Pr	+	-	+	+	+
E ₆	+	-	+	+	+
E ₂	+	-	+	+	+
E ₃	+	-	+	+	+
Ci	+	-	+	+	+
E ₁	+	-	+	+	+
En	+	-	+	+	+
St ₂	+	-	-	+	+
E ₄	+	-	-	+	+
St ₁	+	-	-	+	+
St ₃	+	-	-	+	+
SL	+	-	-	+	+

Légende : - : pas de croissance + : croissance S. M. : Solution Mère T : Témoin + : croissance

Tableau (44) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* selon la méthode de contact direct

Souches bactériennes	Témoin	Solution mère 9070 µg/ml	10 ⁻¹ 907 µg/ml	10 ⁻² 90,7 µg/ml	10 ⁻³ 9,07 µg/ml
P ₂	+	+	+	+	+
P ₃	+	+	+	+	+
KL ₁	+	-	+	+	+
KL ₂	+	-	+	+	+
L ₁₁	+	-	+	+	+
L ₁₅	+	-	+	+	+
Pr	+	-	+	+	+
E ₆	+	-	+	+	+
E ₂	+	-	+	+	+
E ₃	+	-	+	+	+
Ci	+	-	+	+	+
E ₁	+	-	+	+	+
En	+	-	+	+	+
St ₂	+	-	-	+	+
E ₄	+	-	-	+	+
St ₁	+	-	-	+	+
St ₃	+	-	-	+	+
SL	+	-	-	+	+

Légende : - : pas de croissance + : croissance

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* s'est avérée la plus efficace, car la quasi-totalité des bactéries testées est inhibée à partir de 954 µg/ml, sauf les Klebsielles, les *Listerias*, *Proteus mirabilis* et *E. coli* (E₆) qui ne révèlent une sensibilité qu'à partir d'une concentration plus importante, soit 9540 µg/ml.

Les souches *Escherichia coli* de référence (E₄), les Staphylocoques et la Salmonelle restent également les plus sensibles vis-à-vis des huiles essentielles de deux autres plantes, soit à partir d'une dilution de 10⁻¹.

Nous rapportons sur la figure (25) (Tableau (45), annexe II) les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles des trois plantes, relatives aux bactéries testées.

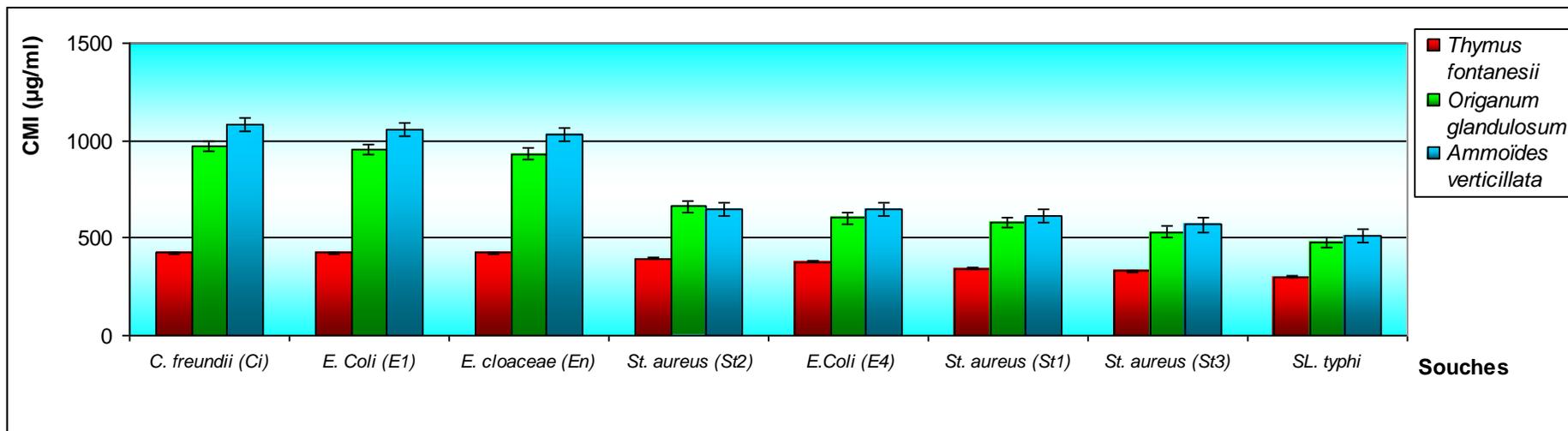
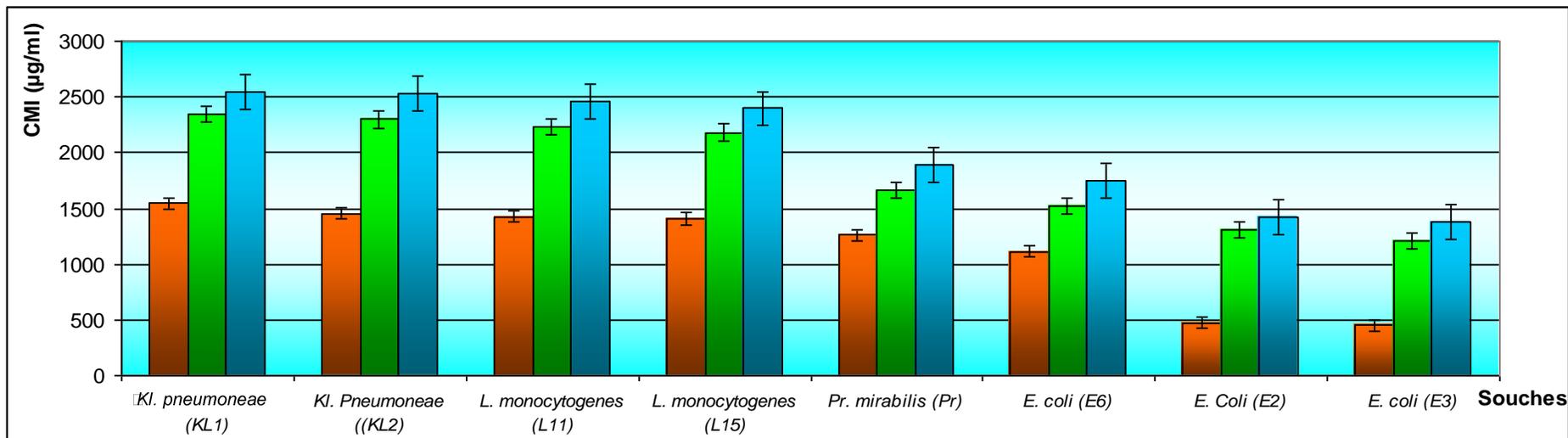


Figure (25) : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées

Par la détermination des CMI, nous pouvons noter que toutes les bactéries testées réagissent exactement de la même manière vis-à-vis des huiles des trois plantes. Ces CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec la méthode de l'aromatogramme.

On remarque également, que l'appartenance des souches bactériennes à Gram (+) ou à Gram (-) n'influe pas sur leur sensibilité. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (**Ouattara et al., 1997; Dorman et Deans, 2000**).

Ainsi, les trois huiles essentielles sont sans réserve très actives sur l'ensemble des souches testées, et ceci malgré l'utilisation du Tween 80 qui abaisse considérablement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (**Remmal, 1993b ; Delespaul, 2000**). Par contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, très connue pour leurs insensibilités aux agents antimicrobiens, sont très résistantes aux huiles essentielles des trois plantes.

Aliyiannis et al. en **2001** ont proposé une classification du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500 µg/ml
- Inhibition modérée : CMI varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml

Par ailleurs, **Teixeira Duarte et al.** en **2005**, avancent que toute huile essentielle qui présente des CMI inférieures à 2000 µg/ml, est considérée avoir un potentiel antimicrobien.

Ainsi, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, est très active sur l'ensemble des bactéries testées, sauf les *Pseudomonas* qui se révèlent les moins sensibles, ayant des CMI très élevées : 16700 µg/ml pour les deux souches.

Nous constatons également que la Salmonelle, les trois Staphylocoques et l'*E. coli* de référence (E₄) sont les plus sensibles à toutes les huiles essentielles.

On peut déduire également que ces résultats nous permettent quand même, de qualifier les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, d'être efficace sur les bactéries suivantes : *Proteus mirabilis*, les cinq *Escherichia coli*, *Citrobacter Freundii*, *Enterobacter cloacae*, les trois *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi*.

La comparaison de nos résultats obtenus avec l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* (contenant 68,3% en phénols), avec ceux de **Bousmaha-Marroki et al. (2007)**, qui ont déterminé les CMI de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (contenant 75% en phénols), sur plusieurs souches bactériennes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*, révèle que notre huile essentielle est plus active : CMI de l'ordre de 420 µg/ml et 380 µg/ml pour *Enterobacter* et *E. coli* (E₄) contre 960 et 980 µg/ml, respectivement, CMI allant de 330 à 390 µg/ml pour les *Staphylocoques* contre 920 µg/ml. Les souches *Pseudomonas aeruginosa* restent les moins sensibles.



Photo IX



Photo X

Photo IX : Contact direct : *E. coli* à la dilution 1/6 (huile essentielle d'*Origanum glandulosum*)

Photo X : Contact direct : *E. coli* à la dilution 1/5 (huile essentielle d'*Origanum glandulosum*)

IV.2.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu liquide et détermination des concentrations minimales bactéricides (CMBs)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne d'un produit en milieu liquide est une méthode incontournable, si on veut déterminer secondairement la concentration minimale bactéricide (CMB) (**Chevalier, 2003**). Pour cela, nous avons également déterminé le pouvoir antibactérien de ces trois huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu liquide (Tableau 46, 47). Ensuite, nous avons déterminé les concentrations minimales bactéricides (CMBs).

Dans un premier temps, nous avons déterminé les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoniaes verticillata* en utilisant trois émulsifiants : l'éthanol (à 95%), le Tween 80 (à 10%) et l'agar (nous sommes passés de 0,2% à 0,3%). Ensuite, nous avons déterminé les

CMBs de l'huile essentielle des deux autres plantes en utilisant du Tween 80. Nous avons choisi cet émulsifiant car nous avons obtenu des solutions stables et nous avons voulu comparer ces résultats avec ceux de la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Tableau (46) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* selon la méthode de Maruzzella

Souches bactériennes	Témoin Alcool	Témoin Agar	Témoin Tween 80	Solution mère 12370 µg/ml	10 ⁻¹ 1237 µg/ml			10 ⁻² 123,7 µg/ml
					Al	Ag	Tw	
P ₂	+	++	++	+	++	++	++	++
P ₃	+	++	++	+	++	++	++	++
KL ₁	+	++	++	-	++	++	++	++
KL ₂	+	++	++	-	++	++	++	++
L ₁₁	+	++	++	-	++	++	++	++
L ₁₅	+	++	++	-	++	++	++	++
Pr	+	++	++	-	+	+	+	++
E ₆	+	++	++	-	-	+	+	++
E ₂	+	++	++	-	-	+	+	++
E ₃	+	++	++	-	-	-	+	++
Ci	+	++	++	-	-	-	+	++
E ₁	+	++	++	-	-	-	-	++
En	+	++	++	-	-	-	-	++
St ₂	+	++	++	-	-	-	-	++
E ₄	+	++	++	-	-	-	-	++
St ₁	+	++	++	-	-	-	-	++
St ₃	+	++	++	-	-	-	-	++
SL	+	++	++	-	-	-	-	++

Légende : - : pas de croissance, + : croissance faible, ++ : bonne croissance, Al : alcool, Ag : agar, Tw : Tween

Tableau (47) : Pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum* selon la méthode de Maruzzella

Souches bactériennes	T	<i>Thymus</i>	<i>Thymus</i>	<i>Thymus</i>	<i>Origanum</i>	<i>Origanum</i>	<i>Origanum</i>
		Solution mère 13010 µg/ml	10 ⁻¹ 1301 µg/ml	10 ⁻² 130 µg/ml	Solution mère 12450 µg/ml	10 ⁻¹ 1245 µg/ml	10 ⁻² 124,5 µg/ml
P ₂	+	+	+	+	+	+	+
P ₃	+	+	+	+	+	+	+
KL ₁	+	-	+	+	-	+	+
KL ₂	+	-	+	+	-	+	+
L ₁₁	+	-	+	+	-	+	+
L ₁₅	+	-	+	+	-	+	+
Pr	+	-	+	+	-	+	+
E ₆	+	-	-	+	-	+	+
E ₂	+	-	-	+	-	+	+
E ₃	+	-	-	+	-	+	+
Ci	+	-	-	+	-	-	+
E ₁	+	-	-	+	-	-	+
En	+	-	-	+	-	-	+
St ₂	+	-	-	+	-	-	+
E ₄	+	-	-	+	-	-	+
St ₁	+	-	-	+	-	-	+
St ₃	+	-	-	+	-	-	+
SL	+	-	-	+	-	-	+

Légende : - : pas de croissance, + : croissance, T : témoin

L'activité de ces huiles essentielles sur l'ensemble des souches bactériennes testées est considérable sauf sur les *Pseudomonas aeruginosa* qui se révèlent très résistantes même à la solution mère. Nous constatons également que la Salmonelle, les trois Staphylocoques et l'*E. coli* de référence (E₄) restent les plus sensibles à toutes ces huiles essentielles.

Les concentrations minimales bactéricides (CMBs) de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (en présence des trois émulsifiants : Agar, Tween et éthanol), vis-à-vis de chacune des bactéries testées sont rapportées sur la figure (26) (Tableau (48), annexe II).

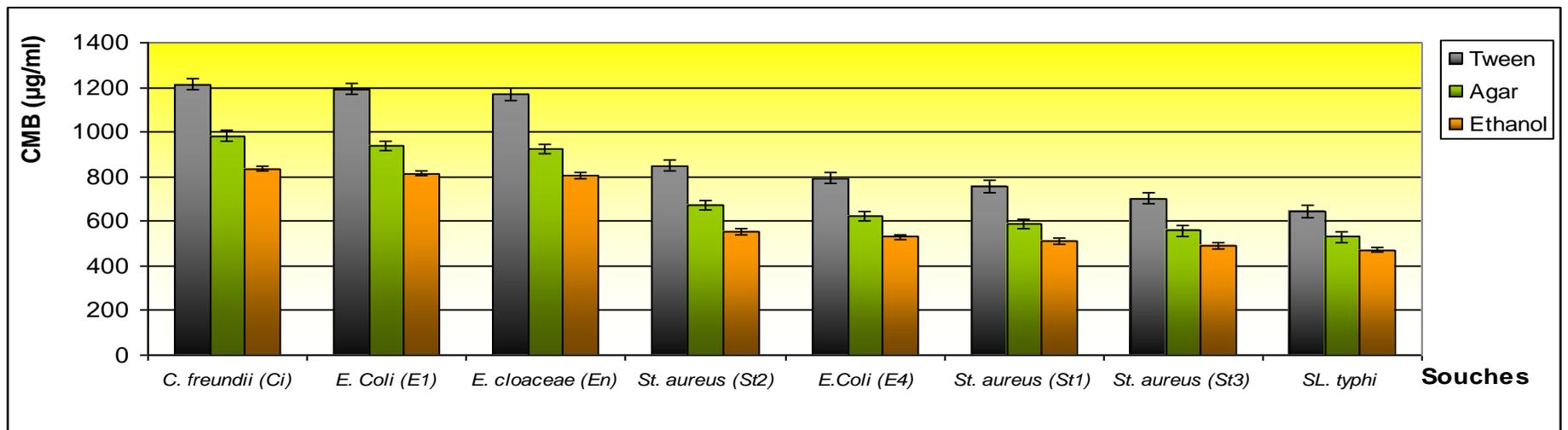
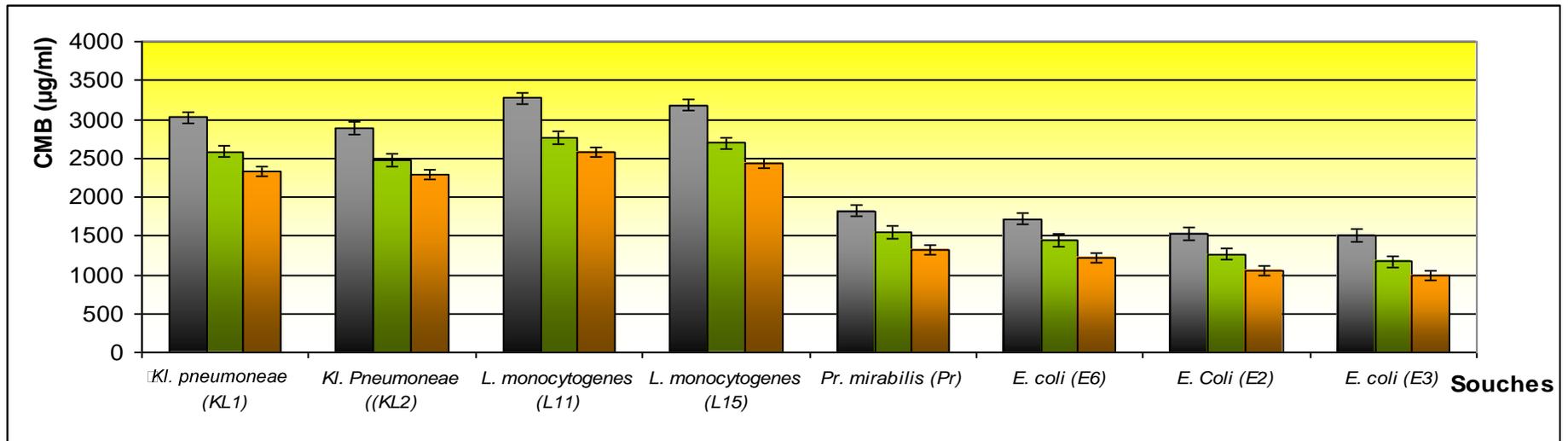


Figure (26) : Concentrations minimales bactéricides (CMBs) en µg/ml de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticuillata* en fonction des trois émulsifiants (Tween, agar, éthanol) relatives aux bactéries testées

L'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* présente une action bactéricide vis-à-vis de toutes les bactéries testées (en présence des trois émulsifiants), excepté les *Pseudomonas aeruginosa* qui présente une sensibilité uniquement en présence de l'éthanol (7000 et 7180 µg/ml).



Photo XI : Milieu liquide (huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*) : *Ps. aeruginosa*

Légende : Les trois premiers tubes : Témoin en présence d'éthanol, de Tween et de l'agar respectivement ; les trois seconds tubes (en présence de Tween) : P2 à la dilution 1/1,5, P2 à la dilution 1/2 et P3 à la dilution 1/2 respectivement ; les quatre derniers tubes (en présence d'agar) : P2 à la dilution 1/2, 1/1,5 et P3 à la dilution 1/2, 1/1,5 respectivement.

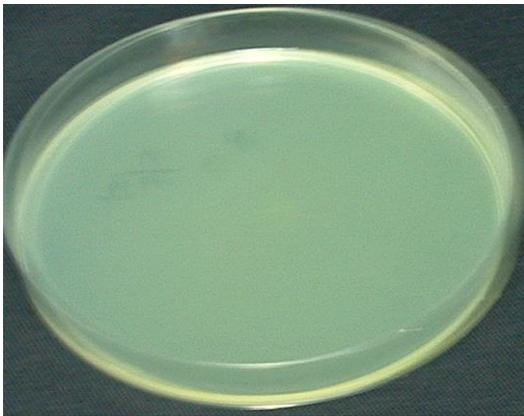


Photo XII

Photo XII : Milieu liquide : *Pseudomonas aeruginosa* (P₂) à la dilution 1/1,8 (huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* en présence d'éthanol)

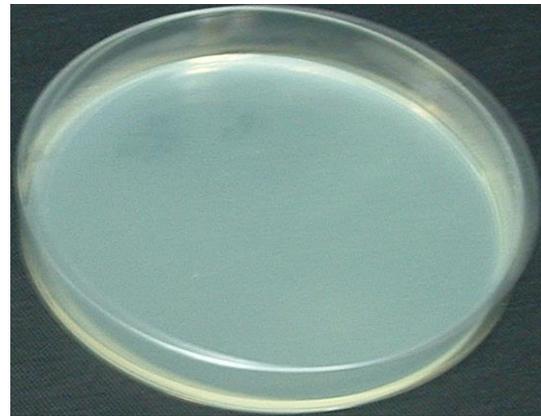


Photo XIII

Photo XIII : Milieu liquide : *Pseudomonas aeruginosa* (P₂) à la dilution 1/1,7 (huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* en présence d'éthanol)

Nous rapportons sur la figure (27) (Tableau 48, annexe II) les concentrations minimales bactéricides (CMBs) des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* relatives aux souches bactériennes testées (en présence de Tween 80).

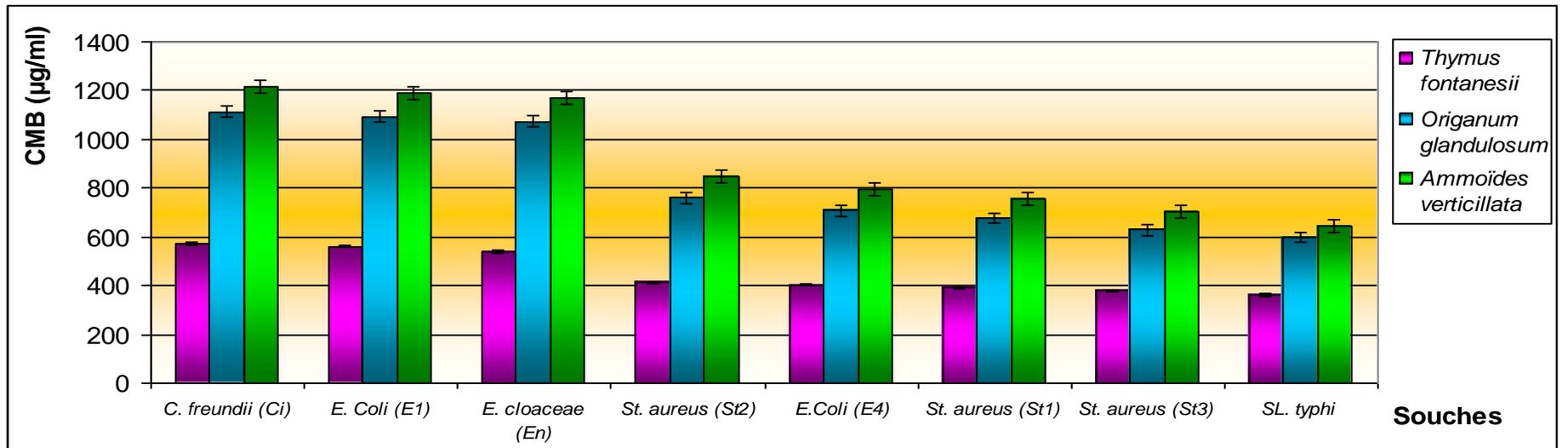
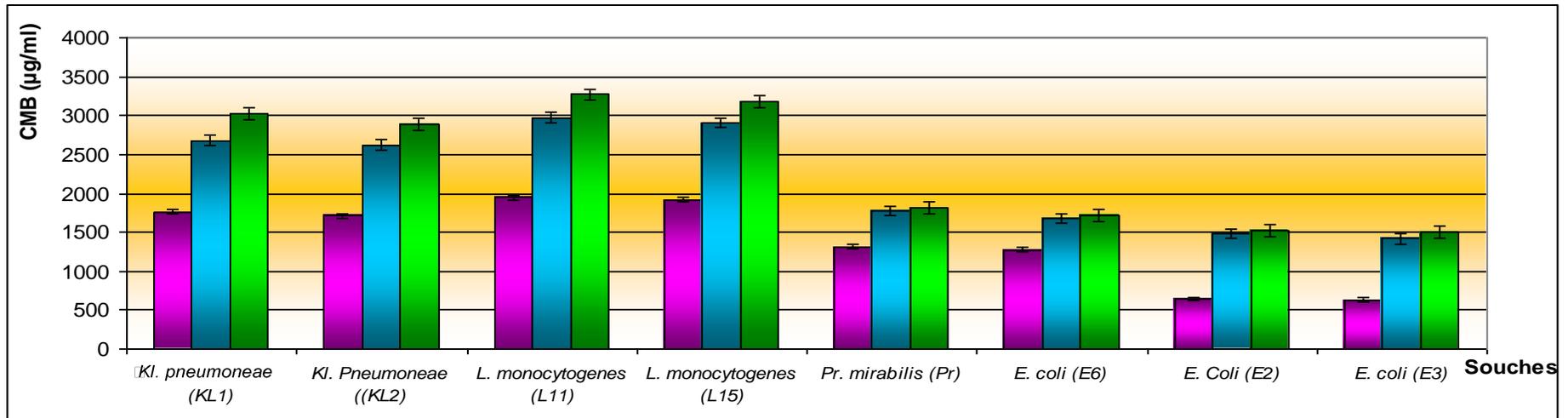


Figure (27) : Concentrations minimales bactéricides (CMBs) en µg/ml des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testés (en présence du Tween 80)

Par la détermination des CMBs, nous pouvons noter que toutes les bactéries testées réagissent exactement de la même manière vis-à-vis des huiles essentielles des trois plantes.

Ces huiles essentielles présentent une action bactéricide vis-à-vis de toutes les bactéries testées, excepté les *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons constaté également que les *Listerias* se sont révélés plus résistantes que les *Klebsielles* en milieu liquide.

Nous constatons également que la *Salmonelle*, les trois *Staphylocoques* et l'*E. coli* de référence (E₄) sont les plus sensibles à toutes ces huiles essentielles.

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste la plus efficace, car elle demande des quantités nettement inférieures d'huile essentielle pour une meilleure efficacité bactéricide.

Nous avons comparé nos résultats à ceux de **Simeon de Bouchberg et al. (1976)**, qui ont déterminé les CMBs de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à chimiotype à carvacrol avec un pourcentage de 80% sur plusieurs souches notamment des *St. aureus* (250 – 1000 µg/ml), des *E. coli* (500 – 1000 µg/ml) des *Kl. pneumoneae* (1000 µg/ml) et des *Ps. aeruginosa* (4000 – 8000 µg/ml). Ces valeurs concordent avec nos résultats sauf pour *Pseudomonas*, ceci s'explique probablement par le fait que notre souche est très pathogène.



Photo XIV

Photo XIV : Milieu liquide: *Enterobacter cloacae* à la dilution 1/25 (huile essentielle de *Thymus fontanesii*)



Photo XV

Photo XV : Milieu liquide: *Enterobacter cloacae* à la dilution 1/24 (huile essentielle de *Thymus fontanesii*)

IV.2.4. Activité antibactérienne de la phase volatile des huiles essentielles et détermination des quantités minimales inhibitrices (QMIs)

Par cette méthode, nous avons évalué l'activité des substances volatiles des huiles essentielles sur les mêmes germes utilisés précédemment (Tableau 49).

Tableau (49) : Effet de la phase volatile des huiles essentielles des trois plantes sur la croissance des bactéries

Souches bactériennes	25 µl			50 µl			75 µl			100 µl			125 µl			150 µl			175 µl			200 µl			Té
	T	O	A	T	O	A	T	O	A	T	O	A	T	O	A	T	O	A	T	O	A	T	O	A	
P₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
KL₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
KL₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
L₁₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
L₁₅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
En	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Pr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Ci	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
St₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
St₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
St₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
E₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
SL	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

Légende : T : H. E. de *Thymus fontanesii*, O : H. E. d'*Origanum glandulosum*, A : H. E. d'*Ammoïdes verticillata*, Té : Témoin

Cette méthode a aboutie aux mêmes observations générales faites par l'application de la technique de contact direct en milieu liquide et en milieu gélosé et de l'aromatogramme :

- L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste la plus efficace ;
- La résistance des *Pseudomonas aeruginosa* aux trois huiles essentielles ;
- Les souches de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhi* et d'*E. coli* de référence E₄ sont les plus sensibles.

Nous rapportons sur la figure (28) (Tableau (50), annexeII) les quantités minimales inhibitrices (QMIs) des huiles essentielles des trois plantes vis-à-vis de chacune des bactéries testées.



Photo XVI

Photo XVI : Microatmosphère : *Listeria monocytogenes* (L₁₁) à la QMI 120µl (huile essentielle de *Thymus fontanesii*)



Photo XVII

Photo XVII : Microatmosphère : *Listeria monocytogenes* (L₁₁) au niveau du témoin

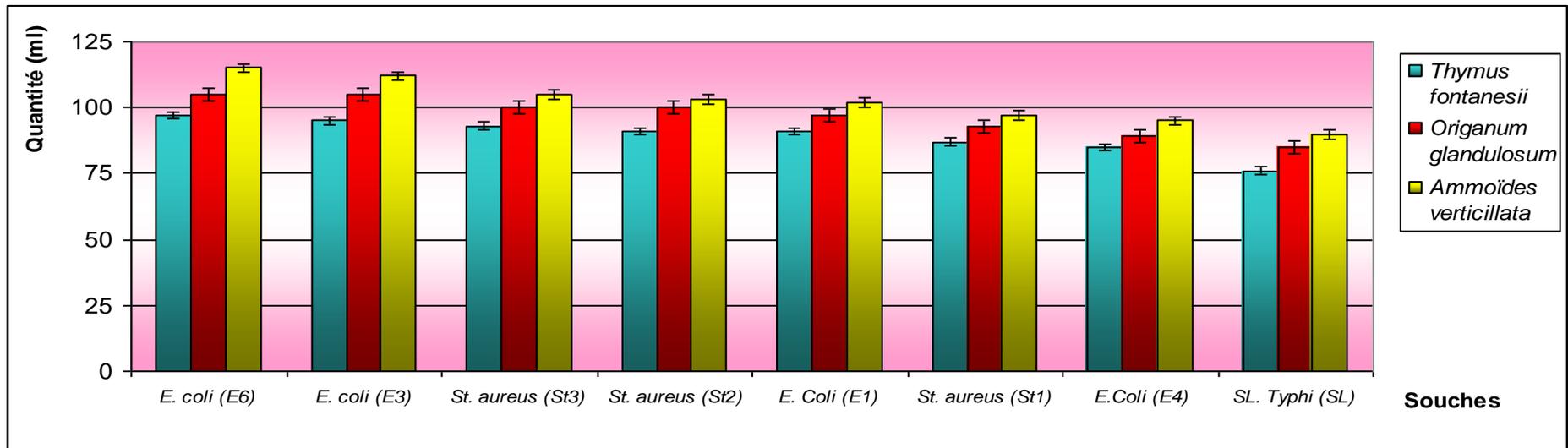
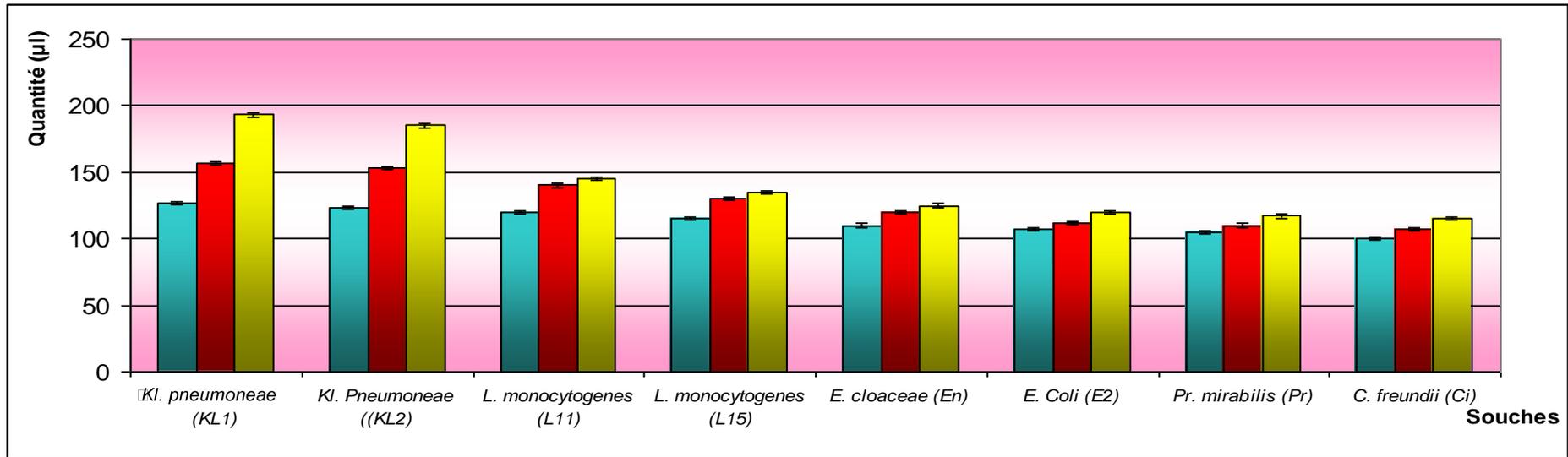


Figure (28) : Quantités minimales inhibitrices (QMIs) en µl des huiles essentielles des trois plantes relatives aux bactéries testées

Par la détermination des QMIs, nous pouvons noter que toutes les bactéries testées réagissent exactement de la même manière vis-à-vis des huiles essentielles des trois plantes.

On remarque également que cette méthode ne confirme pas certains résultats obtenus avec la méthode de contact direct en milieu gélosé et en milieu liquide et celle de l'aromatogramme. En effet *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* (E₂) et *Staphylococcus aureus* (St₃) se sont révélés plus résistants à la phase vapeur.

Nous notons une forte activité antibactérienne de la phase vapeur de ces huiles essentielles sur la Salmonelle, le Staphylocoque de référence (St₁) et l'*E. coli* de référence (E₄).

Nous constatons également que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste la plus efficace, car elle demande des quantités nettement inférieures d'huile essentielle pour une meilleure efficacité bactériostatique. Mais ces résultats nous permettent quand même, de conclure que nos huiles essentielles affectent la croissance de toutes les bactéries, jusqu'à leur inhibition totale en présence de faibles quantités d'huile essentielle, sauf les souches de *Pseudomonas* qui sont très résistants même à des quantités très importantes de l'ordre de 800 µl.

On remarque également que les Klebsielles et les Listerias restent toujours les souches les plus résistants après les *Pseudomonas*, puisqu'elles sont inhibées à des QMIs très élevées par rapport aux autres bactéries.

Bousmaha-Marroki (2007), a déterminé les QMIs de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp. *eu-ciliatus* (contenant 75% en phénols), sur plusieurs souches bactériennes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*. Elle a noté une forte activité antibactérienne de la phase vapeur de cette huile sur l'ensemble des bactéries testées sauf la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est révélée la moins sensible : QMIs de l'ordre de 20 à 25 µl pour les Staphylocoques, QMIs allant de 30 à 40 µl pour les entérobactéries et QMIs de 200 µl pour *Pseudomonas*. Nous avons constaté que cette huile essentielle est plus active que la nôtre (huile essentielle de *Thymus fontanesii* contenant 68,3% en phénols), ceci est probablement lié soit à sa richesse en phénols, soit à l'inoculum de l'ordre de 10⁶ UFC/ml (contre 10⁸ UFC/ml).

Enfin, nous avons voulu évaluer également l'activité antibactérienne de la phase vapeur de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha* vis-à-vis des bactéries testées précédemment. Cependant, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* s'est avérée inactive sur l'ensemble des souches, même à des quantités de l'ordre de 240µl. Par contre les trois *Staphylococcus aureus* et la *Salmonella typhi* se sont révélés sensibles à l'huile essentielle de *Satureja calamintha* : QMIs de l'ordre de 21 5µl pour *SL. typhi*, 215µl, 220 µl et 240 µl pour les staphylocoques St₃, St₁ et St₂ respectivement.

Cette étape n'a pas pu être effectuée avec l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, en raison de son trop faible rendement de l'ordre de 0,53%.

➤ **Conclusion :**

L'importante activité des huiles essentielles de ces trois plantes est due à leur richesse en phénols. Les composés les plus antimicrobiens sont les phénols (carvacrol, thymol), viennent ensuite les alcools (cinéole, linalol..) et dans une faible mesure les alcènes (*p*-cymène, pinène, terpinène..) (Cosentino et al., 1999 ; Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et al., 2002 ; Burt, 2004). En effet, plusieurs travaux ont démontré que le pouvoir antimicrobien élevé des huiles essentielles de plusieurs espèces de thym et d'origan, est attribué à leur richesse en phénols (carvacrol et thymol) (Juliano et al., 2000 ; Karaman et al., 2001 ; Arras et al., 2001 ; Friedman et al., 2002 ; Sokmen et al., 2004 ; Nevas et al., 2004 ; Kabouche et al., 2005 ; Bousmaha- Marroki et al., 2007 ; Oussalah et al., 2007).

La plupart des travaux qui ont eu pour objet l'étude du mécanisme d'action des phénols, avancent que leur principal site d'action est la membrane plasmique bactérienne (Shunying et al., 2005).

Ils sont aptes à désintégrer la membrane cellulaire des bactéries (Ultee et al., 1999). La membrane perd sa structure et devient plus perméable aux ions (Lambert et al., 2001) et peut également permettre la dissipation du gradient pH, la diminution du potentiel membranaire et l'inhibition de la synthèse de l'ATP (Ultee et al., 1999 ; Ultee et al., 2000).

Actuellement, ces composés monoterpéniques oxygénés attaquent non seulement la paroi et la membrane cellulaire en détruisant sa perméabilité et libérant ses constituants intracellulaire (ribosome, glutamate de Na), mais aussi, ils sont susceptibles d'interférer avec différentes fonctions cellulaires : transport d'électron, synthèse des protéines et des acides nucléiques, réactions enzymatiques (Shunying et al., 2005).

La variabilité de l'activité antibactérienne de ces plantes est étroitement liée à la composition chimique de leurs huiles essentielles. Ainsi, l'HE de *Thymus fontanesii* s'est avérée nettement plus active que celles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*. Ceci s'explique par le fait que la première est plus riche en phénols (carvacrol et thymol : 68,8%) par rapport aux autres huiles essentielles (thymol et carvacrol : 49% pour *Origanum* et thymol et carvacrol : 49,7% pour *Ammoïdes*). En effet, plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (Cosentino et al., 1999). Le thymol et le carvacrol ont un effet synergique (Didry et al., 1993).

Par ailleurs, l'activité antibactérienne plus ou moins importante de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* par rapport à celle d'*Ammoïdes verticillata* est étroitement liée à leur teneur en monoterpènes hydrocarbonés.

Certains travaux ont démontré que les huiles essentielles qui sont riches en composés oléfiniques ont un pouvoir antibactérien considérable (Lis-Balchin et Deans, 1998 ; Rasooli et Mirmostafa, 2002). Or, ces deux huiles essentielles contiennent environ le même pourcentage en monoterpènes hydrocarbonés (44,2%, dans l'huile essentielle d'*Origanum* et 42,8%, dans l'huile essentielle d'*Ammoïdes*). La seule différence concernant la composition chimique de ces deux huiles essentielles réside au niveau de la teneur en ces différentes oléfines. En effet, l'huile essentielle d'*Origanum* est plus riche en *p*-cymène et en γ -terpinène (17,7% contre 10,8% et 20,0% contre 10,2%, respectivement). Par ailleurs, l'action inhibitrice du *p*-cymène vis-à-vis de plusieurs bactéries a été rapporté par divers études (Kim et al., 1995 ; Cosentino et al., 1999 ; Rasooli et Mirmostafa, 2002 ; Cimanga et al., 2002). En outre, Ultee et al. en 2002, avancent que ce monoterpène facilite le transport des phénols, ainsi un effet synergique s'exerce en présence de ces deux composés.

Ainsi, bien que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est attribuée principalement à son composé majoritaire, l'effet synergique ou antagoniste de chacun de ses constituants présents en faible teneur est également considéré (Paster et al., 1995 ; Chang et al., 2001 ; Daferera et al., 2003).

Les espèces bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus résistantes aux trois huiles essentielles. Ceci peut être lié, soit à l'inoculum lourd qu'on a utilisé, soit à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières. La pathogénicité de cette bactérie est due à la production de plusieurs facteurs de virulence intra et extracellulaires (Rumbaugh et

al., 1999). Par ailleurs, plusieurs auteurs rapportent la faible voire l'absence d'activité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles de divers espèces de thym et d'origan (Janssen *et al.*, 1986 ; Biondi *et al.*, 1993 ; Ruberto et Baratta, 2000 ; Karaman *et al.*, 2001 ; Pintore *et al.*, 2002 ; Wilkinson *et al.*, 2003 ; Hersch-Martinez *et al.*, 2005). En outre, Walsh *et al.* (2003) rapportent que le thymol n'est pas actif sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les huiles essentielles des trois plantes présentent une forte activité sur les souches *Staphylococcus aureus*, ce qui serait lié à la positivité de leur Gram. En effet, la plupart des études rapportent souvent que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles (Smith-Palmer *et al.*, 1998, Oussalah *et al.*, 2007), car la paroi de ces bactéries est constituée essentiellement de lipopolysaccharides qui limitent la diffusion des composés hydrophobes et évitent l'accumulation des huiles essentielles dans la membrane cellulaire (Bezić *et al.*, 2003). L'importante sensibilité du *Staphylococcus aureus* à l'huile essentielle d'origan a été rapportée également par Lambert *et al.* en 2001.

Par contre, les souches *Listeria monocytogenes* qui sont des bactéries à Gram positif se sont révélées plus résistantes que la plupart des bactéries à Gram négatif. Cette constatation est en accord avec les travaux de Kim *et al.* en 1995, menés sur le pouvoir antimicrobien de plusieurs composants des huiles essentielles contre cinq contaminants pathogènes des préparations alimentaires. Ces espèces se sont montrées également plus résistantes que les Klebsielles en milieu liquide.

Il est important de noter que les trois huiles essentielles présentent une activité considérable vis-à-vis de la souche *Salmonella typhi*. Il a été démontré que cette espèce microbienne manifeste une très grande résistance aux agents antimicrobiens (Mimica-Dukić *et al.*, 2003).

L'activité de la phase vapeur de ces trois huiles essentielles ne confirme pas certains résultats obtenus avec la méthode de contact direct en milieu gélosé et en milieu liquide et celle de l'aromatogramme. En effet, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* (E₂) et *Staphylococcus aureus* (St₃) se sont révélés plus résistants à la phase vapeur. Ceci est du probablement au fait qu'un composé volatil donné, responsable de l'inhibition d'un microorganisme par contact direct, ne réagit pas de la même manière que dans la phase vapeur (Delespaul, 2000). En outre, les trois huiles essentielles se sont avérées très actives sur l'ensemble des souches testées, excepté les *Pseudomonas*.

Ainsi, ces résultats nous permettent de conclure, que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont en relation avec leur composition chimique qui varie entre les différentes espèces, entre les différentes espèces du même genre et même entre les échantillons d'une même espèce. Plusieurs facteurs sont responsables de la variabilité de la composition chimique : l'espèce, le chemotype, l'origine du matériel végétal, le moment de la récolte, les conditions climatiques, la procédure de séchage et la technique d'extraction des huiles essentielles (Shu et Lawrence, 1997 ; Salgueiro et al., 1997).

V. Etude statistique

Les résultats obtenus concernant le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* au niveau des différentes méthodes, ont été soumis un traitement statistique des données.

V.1. Méthode de l'aromatogramme

Nous avons utilisé l'analyse de variance à deux facteurs (effet huile et effet bactérie combinés) et à un facteur (effet huile) pour comparer les moyennes des zones d'inhibition relatives aux différentes bactéries entre les trois huiles essentielles :

❖ **ANOVA à deux entrées : Comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles (effet huile et effet bactérie combinés)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	68,91	34,454	26,25	0,000
Bactérie	15	2696,12	179,741	136,95	0,000
Interaction	30	8,56	0,285	0,22	1,000
Erreur	192	252,00	1,313		
Total	239	3025,58			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Huile	Moyenne	
<i>Thymus</i>	20,1125	(-----*-----)
<i>Origanum</i>	19,4625	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	18,8000	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
19,00 19,50 20,00 20,50

Il y a un effet huile (P=0,000), et un effet bactérie (P=0,000) sans interaction.

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Bactéries	Moyenne	
KL 1	16,2000	(-*-)
Kl 2	16,2667	(-*-)
L11	16,4667	(-*-)
L15	16,6667	(-*-)
Pr	17,0667	(-*-)
E6	17,2000	(-*-)
E2	17,4000	(-*-)
E3	17,6667	(-*-)
Ci	18,2667	(-*-)
E1	18,6667	(-*-)
En	19,0000	(-*-)
St2	21,8667	(-*-)
E4	22,4000	(-*-)
St1	24,5333	(-*-)
St3	25,5333	(-*-)
SL	26,1333	(-*-)

-----+-----+-----+-----+
18,0 21,0 24,0 27,0

Nous pouvons classer ces souches en trois groupes en fonction de leur degré de sensibilité :

- Les souches KL₁, KL₂, L₁₁, L₁₅, Pr, E₆, E₂, E₃, Ci, E₁ et En sont faiblement sensibles ;
- Les souches St₂ et E₄ sont moyennement sensibles ;
- Enfin, les souches St₁, St₃ et SL sont très sensibles.

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	68,9	34,5	2,76	0,065
Erreur	237	2956,7	12,5		
Total	239	3025,6			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+-----			
<i>Thymus</i>	80	20,112	3,511			(-----*-----)	
<i>Origanum</i>	80	19,463	3,504			(-----*-----)	
<i>Ammoïdes</i>	80	18,800	3,581	(-----*-----)			
				-----+-----+-----+-----+-----			
				18,40	19,20	20,00	20,80

La variation des moyennes des zones d'inhibition relatives aux trois huiles n'est pas significative (P=0,065). On constate également une opposition des moyennes des zones d'inhibition entre les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et d'*Ammoïdes verticillata*, qu'on vérifie par :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Thymus* et d'*Ammoïdes***

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	1	68,9	68,9	5,48	0,020
Erreur	158	1986,8	12,6		
Total	159	2055,7			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+-----			
<i>Thymus</i>	80	20,112	3,511			(-----*-----)	
<i>Ammoïdes</i>	80	18,800	3,581	(-----*-----)			
				-----+-----+-----+-----+-----			
				18,40	19,20	20,00	20,80

Effectivement à $\alpha=5\%$, le test est significative (P=0,020).

Cette évaluation nous a permis de conclure que les différences entre les valeurs relatives à l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles ne sont pas significatives (P=0,065). Par contre, ces variations sont hautement significatives si on prend en considération l'effet bactérie (P=0,000). De même, nous pouvons constater que l'analyse de variance à un facteur contrôlé a permis de mettre en évidence une différence très significative des diamètres des zones d'inhibition entre les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et d'*Ammoïdes verticillata*.

En outre, nous avons comparé les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles relatives à seule une bactérie (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)), par une analyse de variance à un facteur :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	8,40	4,20	2,52	0,122
Erreur	12	20,00	1,67		
Total	14	28,40			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
<i>Thymus</i>	5	17,000	0,707	(-----*-----)
<i>Origanum</i>	5	16,400	1,140	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	5	15,200	1,789	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
 14,4 15,6 16,8 18,0

Le test est également non significatif (P=0,122>0,05) si on prend en considération une seule bactérie.

Par ailleurs, Les tailles des échantillons par bactérie étant très réduites (n=5), l'hypothèse de normalité (utilisé dans le cadre de l'ANOVA) peut être relativement forte. Dans ce cas, nous avons voulu vérifier ces résultats par un test non paramétrique, celui de Kruskal-Wallis :

❖ **Test de Kruskal-Wallis : Comparaison des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des trois huiles essentielles relatives à une bactérie**

Huile essentielle	N	Médiane	Rang moyen	Z
<i>Thymus</i>	5	17,00	10,4	1,47
<i>Origanum</i>	5	16,00	8,1	0,06
<i>Ammoïdes</i>	5	15,00	5,5	-1,53
Global	15		8,0	

B H = 3,01 DL = 2 **P = 0,223**

Les résultats obtenus par le test de Kruskal-Wallis confirment ceux obtenus par l'analyse de variance à un facteur, en notant que le degré de non significativité est plus fort (pour ANOVA I $P=0,122$, alors que pour ce test $P=0,223$).

V.2. Méthode de contact direct en milieu gélosé

Nous avons utilisé également l'analyse de variance à deux facteurs (effet huile et effet bactérie combinés) et à un facteur (effet huile) pour comparer les CMI's relatives aux différentes bactéries entre les trois huiles essentielles :

❖ **ANOVA à deux entrées : Comparaison des CMI's des trois huiles essentielles (effet huile et effet bactérie combinés)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	18583752	9291876	1115,21	0,000
Bactérie	15	91789635	6119309	734,44	0,000
Interaction	30	4367235	145574	17,47	0,000
Erreur	192	1599733	8332		
Total	239	116340355			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Huile	Moyenne	
<i>Thymus</i>	759,08	(*)
<i>Origanum</i>	1278,66	(*)
<i>Ammoïdes</i>	1400,93	(*)

800 1000 1200 1400

Il y a un effet huile (P=0,000), un effet bactérie (P=0,000) et un effet interactif. La moyenne des CMI's de *Thymus fontanesii* relatives aux différentes bactéries est largement inférieure à celle des huiles essentielles des autres plantes.

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Bactéries	Moyenne	
KL1	2146,80	(*)
KL2	2092,20	(*)
L11	2040,20	(*)
L15	1995,53	(*)
Pr	1567,13	(*)
E6	1460,73	(*)
E2	1064,93	(*)
E3	1010,47	(*)
Ci	826,47	(*)
E1	811,27	(*)
En	796,07	(*)
St2	568,73	(*)
E4	542,73	(*)
St1	511,87	(*)
St3	476,20	(*)
SL	428,20	(*)

500 1000 1500 2000

On peut classer ces souches bactériennes en quatre groupes, selon leur degré de sensibilité :

- Les souches KL₁, KL₂, L₁₁ et L₁₅ sont très faiblement sensibles ;
- Les souches Pr et E₆ sont faiblement sensibles ;
- Les souches E₂, E₃, Ci, E₁ et En sont moyennement sensibles ;
- Enfin, les souches St₂, E₄, St₁, St₃ et SL sont très sensibles.

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé (effet huile): Comparaison des CMI des trois huiles essentielles**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	18583752	9291876	22,53	0,000
Erreur	237	97756603	412475		
Total	239	116340355			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+-----
<i>Thymus</i>	80	759,1	487,2	(----*-----)
<i>Origanum</i>	80	1278,7	668,3	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	80	1400,9	743,9	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
750 1000 1250 1500

On remarque également que le test est très significatif (P=0,000). L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est également caractérisée par un fort potentiel antibactérien. Par contre, on constate que les moyennes des CMI des huiles essentielles d'*Origanum* et d'*Ammoïdes* relatives aux différentes bactéries sont très proches. Pour cela, nous avons voulu comparer leurs CMI :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : comparaison des CMI des huiles essentielles d'*Origanum* et d'*Ammoïdes***

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	1	498195	498195	1,00	0,320
Erreur	158	79103884	500657		
Total	159	79602078			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+-----
<i>Origanum</i>	80	1283,3	671,3	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	80	1394,9	741,2	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
1200 1320 1440 1560

Le test révèle une non significativité (P=0,320).

Nous pouvons constater que les CMI relatives aux différentes bactéries entre les huiles essentielles de ces trois plantes sont très variables en présence (P=0,000) ou en absence de

l'effet bactérie (P=0,000). La détermination des concentrations minimales inhibitrices, nous a permis de mettre en évidence le fort potentiel antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* car la moyenne des CMI en fonction de l'écart type regroupé est de l'ordre de 760µg/ml, largement inférieure à celles obtenues avec les huiles essentielles des autres plantes. Par contre, On peut voir une certaine concordance des résultats entre l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, puisque les différences entre les CMI des deux huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes ne sont pas significatives (P=0,320).

Comme précédemment, nous avons analysé la variation des CMI des trois huiles essentielles relatives à seule une bactérie (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)), par une analyse de variance à un facteur et vérifier nos résultats par un test non paramétrique, de Kruskal-Wallis qui confirme celui de l'ANOVA I :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMI des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	2819636	1409818	33,06	0,000
Erreur	12	511676	42640		
Total	14	3331312			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
<i>Thymus</i>	5	1544,6	101,5	(-----*-----)
<i>Origanum</i>	5	2348,0	145,3	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	5	2547,8	310,6	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
1600 2000 2400 2800

On note également une différence hautement significative entre les moyennes des CMI des trois huiles si on prend en considération une seule bactérie.

❖ **Test de Kruskal-Wallis : Comparaison des CMI des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Huile essentielle	N	Médiane	R. moyen	Z
<i>Thymus</i>	5	1590	3,0	-3,06
<i>Origanum</i>	5	2283	10,4	1,47
<i>Ammoïdes</i>	5	2590	10,6	1,59
Global	15		8,0	

B H = 9,38 DL = 2 **P = 0,009**

Ce test (P=0,009) confirme celui de l'ANOVA I (P=0,000).

V.3 Méthode de contact direct en milieu liquide

Nous avons jugé intéressant de comparer les CMBs de l'huile essentielles d'*Ammoïdes verticillata* en présence des trois émulsifiants (Tween 80, Agar, Ethanol) par une analyse de variance à un facteur (effet émulsifiant) :

❖ ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (en présence d'agar et du Tween 80)

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Emulsifiant	1	3172506	3172506	4,28	0,040
Erreur	158	117062223	740900		
Total	159	120234729			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
Agar	80	1359,5	799,8	(-----*-----)
Tween	80	1641,1	917,6	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
1200 1400 1600 1800

Il y a un effet émulsifiant car les différences entre les moyennes des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives aux différentes souches bactériennes sont significatives (P=0,040).

❖ ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (en présence d'agar et de l'éthanol)

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Emulsifiant	1	987845	987845	1,64	0,202
Erreur	158	94887826	600556		
Total	159	95875670			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
Agar	80	1359,5	799,8	(-----*-----)
Ethanol	80	1202,3	749,2	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
1050 1200 1350 1500

Par contre, l'éthanol n'influe pas sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* car le test de l'ANOVA I prouve une non significativité (P=0,202).

En comparant les CMBs obtenues avec l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata* pour les trois émulsifiants utilisés, on peut avancer que le Tween 80 influe sur l’activité antibactérienne de cette huile essentielle. En effet, les CMBs obtenues en présence d’agar sont largement inférieures que celles obtenues en présence du Tween 80. Ces différences sont significatives (P=0,040). En outre, en présence d’éthanol, les concentrations minimales bactéricides sont les plus faibles. La comparaison de ces valeurs avec celles en présence d’agar n’est pas significative (P=0,202). Ces résultats nous permettent de conclure que le Tween 80 diminue l’activité des huiles essentielles. En effet, **Remmal et al. (1993b)** et **Delespaul et al. (2000)**, ont démontré que l’usage de détergents, ou de solvants qui sont souvent utilisées pour l’étude de l’activité antimicrobienne des huiles essentielles, abaisse considérablement l’activité des huiles essentielles. **Crémieux et al. en 1981**, avancent que le Tween 80 entraîne la neutralisation des phénols. Ainsi, ils deviennent moins actifs. Par contre, l’éthanol contribue à l’activité antimicrobienne de l’huile essentielle puisqu’on a obtenu des CMBs moins importantes.

En outre, nous avons analysé la variation des CMBs de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata* relatives à seule une bactérie (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)), par une analyse de variance à un facteur et vérifier nos résultats par un test non paramétrique (nombre d’essai par bactérie est faible, n=5), celui de Mann-Whitney :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs de l’huile essentielle d’*Ammoïdes verticillata* relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁) (en présence d’agar et du Tween 80)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Emulsifiant	1	483120	483120	20,92	0,002
Erreur	8	184760	23095		
Total	9	667880			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----+			
Tween 80	5	2583,6	150,1	(-----*-----)			
Agar	5	3023,2	153,8			(-----*-----)	
				-----+-----+-----+-----+			
				2600	2800	3000	320

Il y a un effet émulsifiant (P=0,002), même si on prend en considération une seule bactérie.

❖ **Test de Mann-Whitney : Comparaison des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁) (en présence d'agar et du Tween 80)**

	N	Médiane
Huile essentielle		
Agar	5	2474,0
Tween 8	5	3092,0

L'estimation ponctuelle de ETA1-ETA2 est -344,0
 Le pourcentage IC (96,3) pour ETA1-ETA2 est (-618,1 ; -274,0) W = 16,0
 Le test de ETA1 = ETA2 contre ETA1 différent de ETA2 est significatif sur **0,0216**

Effectivement, il y a un effet émulsifiant. Ce test (P=0,0216) confirme celui de l'ANOVA I (P=0,02).

➤ **Comparaison des CMBs des huiles essentielles des trois plantes (en présence de Tween 80) :**

Nous avons également comparé les CMBs des huiles essentielles des trois plantes en présence d'un même émulsifiant (Tween 80) par une analyse de variance à deux facteurs (effet huile et effet bactérie combinés) et à un facteur (effet huile) :

❖ **ANOVA à deux entrées : Comparaison des CMBs des trois huiles essentielles (effet huile et effet bactérie combinés) (en présence du Tween 80)**

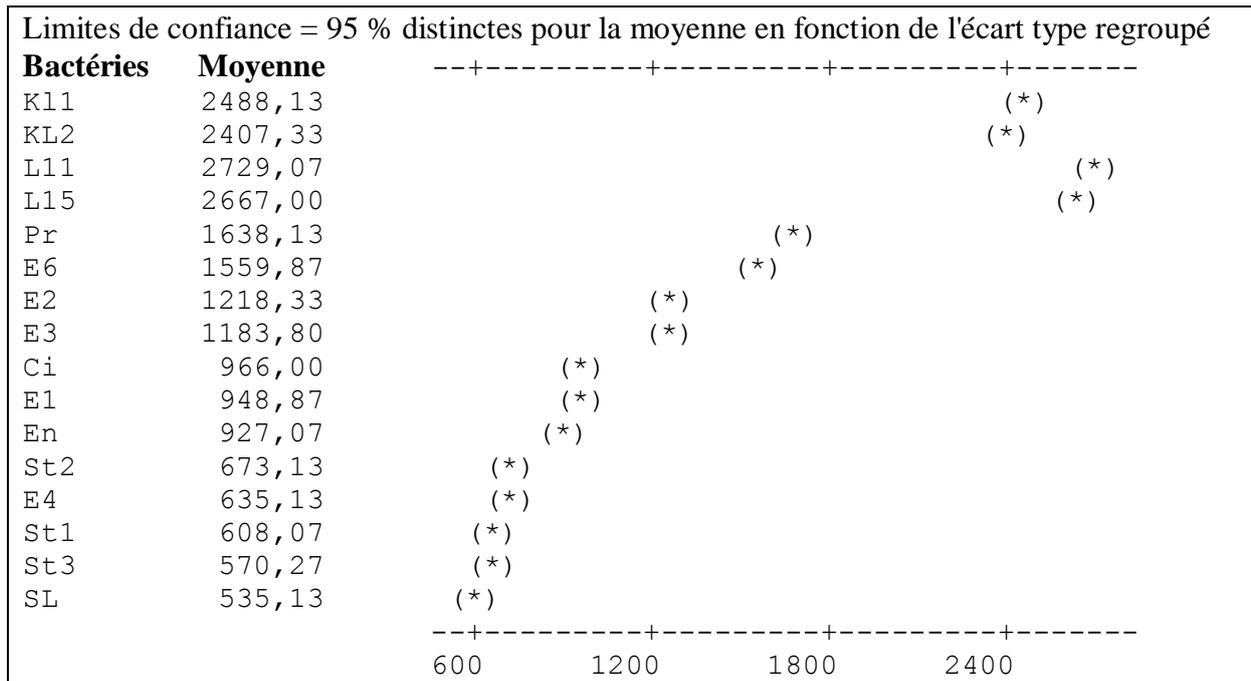
Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	23296255	11648127	1745,94	0,000
Bactérie	15	142485101	9499007	1423,81	0,000
Interaction	30	5631154	187705	28,14	0,000
Erreur	192	1280936	6672		
Total	239	172693446			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Huile	Moyenne				
<i>Thymus</i>	925,39	(*)			
<i>Origanum</i>	1512,64			(*)	
<i>Ammoïdes</i>	1641,10				(*)

-----+-----+-----+-----+-----
 1000 1200 1400 1600

On remarque qu'il y a un effet huile (P=0,000), un effet bactérie (P=0,000) et un effet interactif (P=0,000). On note également que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est également la plus efficace car la moyenne des CMBs relatives aux différentes souches bactériennes est largement inférieure à celle des CMBs des huiles essentielles des autres plantes.



On peut également classer ces bactéries en trois groupes selon leur degré de sensibilité :

- Les bactéries KL₁, KL₂, L₁₁ et L₁₅ sont faiblement sensibles ;
- Les bactéries Pr, E₆, E₂, E₃, Ci, E₁ et En sont moyennement sensibles,
- Les bactéries St₂, E₄, St₁, St₃ et SL sont très sensibles.

Nous avons analysé également ces résultats par une ANOVA I (effet huile), sans prendre en considération l'effet bactérie.

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs des trois huiles essentielles (en présence du Tween 80)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	23296255	11648127	18,48	0,000
Erreur	237	149397191	630368		
Total	239	172693446			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
Thymus	80	925,4	597,4	(-----*-----)
Origanum	80	1512,6	832,0	(-----*-----)
Ammoïdes	80	1641,1	917,6	(-----*-----)

900 1200 1500 1800

Les différences entre les moyennes des CMBs des trois huiles essentielles relatives aux différentes bactéries sont hautement significatives. Par contre il y a une certaine concordance

entre les moyennes des CMBs des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, qu'on peut vérifier par une ANOVA I :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs des huiles essentielles d'*Origanum* et d'*Ammoïdes* (en présence du Tween 80)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	1	660105	660105	0,86	0,355
Erreur	158	121202248	767103		
Total	159	121862352			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
<i>Origanum</i>	80	1512,6	832,0	(-----*-----)
<i>Ammoïdes</i>	80	1641,1	917,6	(-----*-----)

---+-----+-----+-----+-----
 1350 1500 1650 1800

Effectivement ce test confirme une non significativité (P=0,355) entre les moyennes des CMBs de ces deux huiles essentielles.

Ces résultats nous permettent de confirmer ceux obtenus par contact direct en milieu gélosé car les CMBs (en présence du Tween 80) relatives aux différentes souches bactériennes varient d'une manière hautement significative entre les trois huiles essentielles en présence (P=0,00) ou en absence de l'effet bactérie (P=0,00). Par contre les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* présentent un même niveau d'efficacité puisque l'analyse de variance à un facteur contrôlé ne prouve aucune variation entre les CMBs de ces huiles essentielles (P=0,355).

✓ Comme précédemment, nous avons analysé la variation des CMBs des trois huiles essentielles relatives à une seule bactérie (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)), par une analyse de variance à un facteur et vérifier nos résultats par un test non paramétrique (faible échantillon, n=5), de Kruskal-Wallis :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMBs (en présence du Tween 80) des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	4279815	2139907	151,74	0,000
Erreur	12	169229	14102		
Total	14	4449044			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
<i>Thymus</i>	5	1758,8	55,5	(--*--)
<i>Origanum</i>	5	2682,4	124,8	(--*--)
<i>Ammoïdes</i>	5	3023,2	153,8	(--*-)

-----+-----+-----+-----+
2000 2400 2800 3200

Il y a également un effet huile (P=0,000), si on prend en considération une seule bactérie.

❖ **Test de Kruskal-Wallis : Comparaison des CMI (en présence du Tween 80) des trois huiles essentielles relatives *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Huile essentielle	N	Médiane	Rang moyen	Z
<i>Thymus</i>	5	1734	3,0	-3,06
<i>Origanum</i>	5	2767	8,6	0,37
<i>Ammoïdes</i>	5	3092	12,4	2,69
Global	15		8,0	

B H = 11,18 DL = 2 **P = 0,004**

Ce test (P=0,004) confirme également celui de l'ANOVA I (P=0,000).

➤ **Comparaison entre les moyennes des CMI et des CMBs (en présence du Tween 80) relatives aux différentes bactéries :**

Nous avons voulu comparer les moyennes des CMI et des CMBs (en présence du Tween 80) des huiles essentielles des trois plantes relatives aux différentes bactéries. Pour cela, nous avons analysé ces résultats par une ANOVA à deux facteurs contrôlés (effet milieu (liquide et solide) et effet huile) :

❖ **ANOVA à deux entrées : Comparaison entre les CMI et les CMBs des trois huiles essentielles (effet huile et effet milieu combinés)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Milieu	1	5469230	5469230	10,49	0,001
Huile essentielle	2	41745710	20872855	40,03	0,000
Interaction	2	134298	67149	0,13	0,879
Erreur	474	247153794	521422		
Total	479	294503030			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Milieu	Moyenne	
CMI	1146,22	(-----*-----)
CMB	1359,71	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
1100 1200 1300 1400

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Huile	Moyenne	
<i>Thymus</i>	842,23	(----*----)
<i>Origanum</i>	1395,65	(----*----)
<i>Ammoïdes</i>	1521,01	(----*----)

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
750 1000 1250 1500

Il y a un effet milieu (P=0,000) et un effet huile (P=0,001) sans interaction (P=0,879). L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est également la plus efficace.

Nous avons également comparé les CMI et les CMBs (en présence du Tween comme émulsifiant) de chaque huile essentielle par une analyse de variance à deux facteurs contrôlés (effet milieu (solide, liquide) et effet bactérie combinés) :

❖ **ANOVA à deux entrées : Comparaison entre les CMI et les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (effet milieu et effet bactérie combinés)**

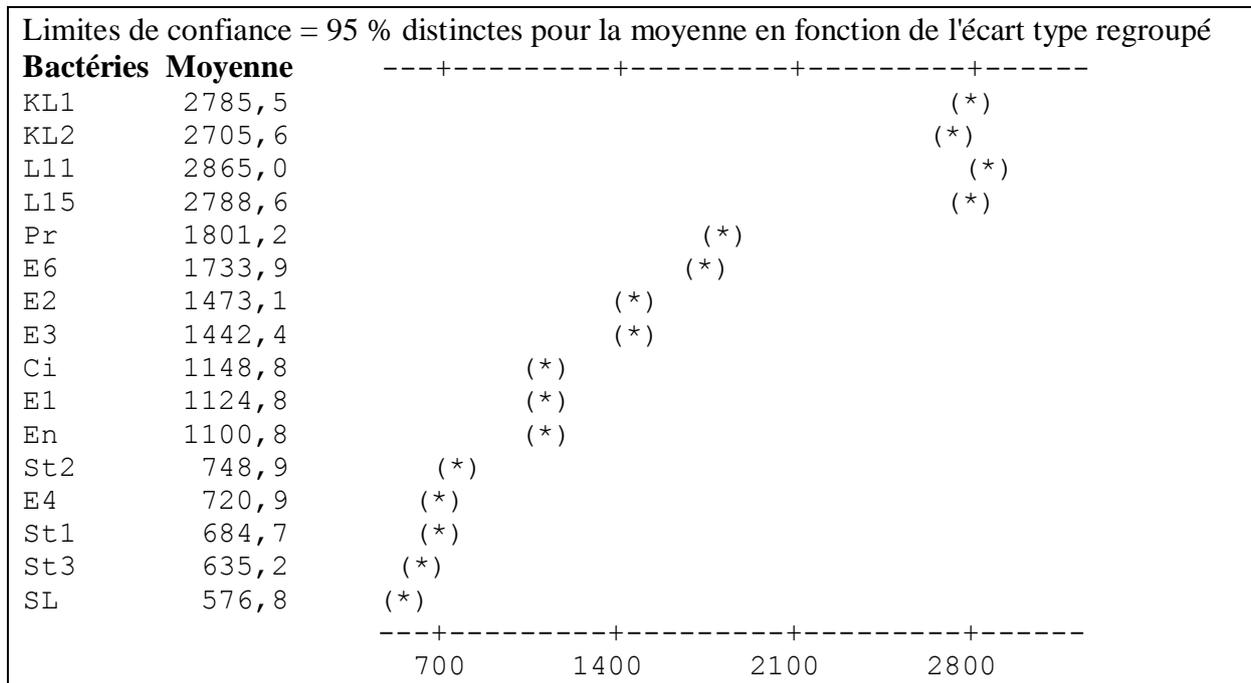
Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Milieu	1	2307361	2307361	177,24	0,000
Bactérie	15	106316207	7087747	544,46	0,000
Interaction	15	2257637	150509	11,56	0,000
Erreur	128	1666309	13018		
Total	159	112547514			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

MiLieu	Moyenne	
CMI	1400,93	(--*--)
CMB	1641,10	(--*--)

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
1440 1520 1600 1680

Il y a un effet milieu (P=0,000), un effet bactérie (P=0,000) et un effet interactif (P=0,000), en prenant en considération l'effet des différentes souches bactériennes.



Là aussi, on peut classer ces bactéries en trois groupes selon leur degré de sensibilité :

- Les bactéries faiblement sensibles sont : KL₁, KL₂, L₁₁ et L₁₅ ;
- Les bactéries moyennement sensibles sont : Pr, E₆, E₂, E₃, Ci, E₁ et En ;
- Les bactéries très sensibles sont : St₂, E₄, St₁, St₃, SL.

Il est à noter que ces mêmes résultats ont été obtenus avec les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum*.

✓ En outre, nous avons jugé plus intéressant de comparer les moyennes des CMI et des CMB de chaque huile essentielle relatives aux souches bactériennes par une ANOVA I (effet milieu) :

Il n'y a aucune influence ($P=0,071$) du milieu sur l'activité de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*.

Ces résultats nous permettent de conclure que les différences entre les CMI et les CMBs des huiles essentielles des différentes plantes ne sont pas significatives ($P>0,05$). Ils concordent avec ceux obtenus par **Canillac et Moury (2001)** lors de leur étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Picea excelsa* sur plusieurs germes pathogènes, notamment *Listeria*, *Staphylococcus aureus* et les coliformes. **Courvalin et al. (1990)** confirment également nos résultats (Tableau (51), annexe II) en rapportant qu'une souche est considérée sensible, si le rapport CMB/CMI est inférieure à 4. En outre, **Cosentino et al. (1999)** ont déterminé les CMI et les CMBs des huiles essentielles de quatre variétés de thym sur quatorze souches bactériennes. Ils avancent que dans la majorité des cas les valeurs des CMI sont très proches de celles des CMBs. Ceci indique que les huiles essentielles incriminées sont bactéricides.

Par ailleurs, nous avons effectué une ANOVA I pour comparer les CMI et les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à une seule souche bactérienne (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)) et vérifié ces résultats par un test non paramétrique ($n=5$), celui de Mann-Whitney :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMI et des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Milieu	1	565013	565013	9,40	0,015
Erreur	8	480622	60078		
Total	9	1045634			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
CMI	5	2547,8	310,6	(-----+-----+-----+-----+-----)
CMB	5	3023,2	153,8	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
2500 2750 3000 3250

On constate une différence significative entre les CMI et les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁).

❖ Test de Mann-Whitney: Comparaison des CMI et des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL₁)

	N	Médiane
KL ₁ CMI	5	2590,0
KL ₁ CMB	5	3092,0

L'estimation ponctuelle de ETA1-ETA2 est -502,0
 Le pourcentage IC (96,3) pour ETA1-ETA2 est (-824,2 ; -69,1) W = 16,0
 Le test de ETA1 = ETA2 contre ETA1 différent de ETA2 est significatif sur **0,0216**

On note le même résultat que celui de l'ANOVA I (P=0,015) concernant la souche bactérienne *Klebsiella pneumoneae* (KL₁).

Ces résultats nous permettent de conclure que les différences entre les CMI et les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* ne sont pas significatives (P=0,071) si on prend en considération l'ensemble des bactéries testées. Par contre, elles sont très significatives si on prend en considération que *Klebsiella pneumoneae* (KL₁). Pour cela, nous avons voulu confirmer ces résultats en prenant une autre souche bactérienne, la plus sensible : *Salmonella typhi* (Sl) :

❖ ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des CMI et des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Salmonella typhi* (SL)

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Milieu	1	45698	45698	222,92	0,000
Erreur	8	1640	205		
Total	9	47338			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
CMI	5	509,20	13,86	(--*--)
CMB	5	644,40	14,76	(--*--)

-----+-----+-----+-----
 500 550 600 650

On note également une différence significative entre les moyennes des CMI et des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Salmonella typhi* (SL).

❖ Test de Mann-Whitney: Comparaison des CMI et des CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* relatives à *Salmonella typhi* (SL)

	N	Médiane
SL CMI	5	503,00
SL CMB	5	651,00

L'estimation ponctuelle de ETA1-ETA2 est -148,00
Le pourcentage IC (96,3) pour ETA1-ETA2 est (-148,01 ; -115,01) W = 15,0
Le test de ETA1 = ETA2 contre ETA1 différent de ETA2 est significatif sur **0,0122**

Ce test (P=0,0122) confirme celui de l'ANOVA I (P=0,000).

Les résultats obtenus pour la souche bactérienne *Salmonella typhi* (SL) confirment ceux obtenus pour la bactérie *Klebsiella pneumoneae* (KL₁).

V.4. Méthode de microatmosphère

Les QMIs des différentes huiles essentielles sont analysées par une ANOVA à deux facteurs (effet huile et effet bactérie combinés) et à un facteur (effet huile) :

❖ ANOVA à deux entrées : Comparaison des QMIs des trois huiles essentielles (effet huile et effet bactérie combinés)

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	17269	8634,69	657,88	0,000
Bactérie	15	107067	7137,83	543,83	0,000
Interaction	30	11647	388,24	29,58	0,000
Erreur	192	2520	13,13		
Total	239	138504			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Huile	Moyenne	
<i>Thymus</i>	101,375	(*)
<i>Origanum</i>	112,688	(-*)
<i>Ammoïdes</i>	122,125	(-*)

---+-----+-----+-----+-----+-----
 102,0 108,0 114,0 120,0

Il y a un effet huile (P=0,000), un effet bactérie (P=0,000) et un effet interactif (P=0,000). Par ailleurs, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste toujours la plus efficace.

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Bactéries	Moyenne	
KL1	159,000	(*)
KL2	153,667	(*)
L11	135,000	(*)
L15	126,667	(*)
En	118,333	(*)
Pr	113,000	(*)
E2	110,667	(*)
Ci	107,333	(*)
E6	105,667	(*)
E3	104,000	(*)
St3	99,333	(*)
St2	98,000	(*)
E1	96,667	(*)
St1	92,333	(*)
E4	89,667	(*)
SL	83,667	(*)

-----+-----+-----+-----+-----+-----
 100 120 140 160

On peut également classer ces souches bactériennes en quatre groupes selon leur degré de sensibilité :

- Les souches KL₁ et KL₂ sont très faiblement sensibles ;
- Les souches L₁₁ et L₁₅ sont faiblement sensibles ;
- Les souches En, Pr, E₂, Ci, E₆ et E₃ sont moyennement sensibles ;
- Les souches St₃, St₂, E₁, St₁, E₄ et SL sont très sensibles.

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des QMIs des trois huiles essentielles**

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	17269	8635	16,88	0,000
Erreur	237	121235	512		
Total	239	138504			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	+-----+-----+-----+-----			
<i>Thymus</i>	80	101,38	14,69	(------*-----)			
<i>Origanum</i>	80	112,69	21,54	(-----*-----)			
<i>Ammoïdes</i>	80	122,13	29,24	(-----*-----)			
				+-----+-----+-----+-----			
				96,0	104,0	112,0	120,0

La variation des moyennes des QMIs des trois huiles essentielles relatives aux différentes souches bactériennes est également hautement significative.

Nous avons vérifié s'il y a une certaine concordance des résultats entre les huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum* puis entre les huiles essentielles de cette dernière avec celle d'*Ammoïdes verticillata* :

❖ **ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des QMIs des huiles essentielles de *Thymus* et d'*Origanum***

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	1	5119	5119	15,06	0,000
Erreur	158	53696	340		
Total	159	58815			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	-----+-----+-----+-----			
<i>Thymus</i>	80	101,38	14,69	(------*-----)			
<i>Origanum</i>	80	112,69	21,54	(-----*-----)			
				-----+-----+-----+-----			
				100,0	105,0	110,0	115,0

Les différences entre les moyennes des QMIs des deux huiles essentielles sont hautement significatives (P=0,000).

❖ ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des QMIs des huiles essentielles d'Origanum et d'Ammoïdes

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	1	3563	3563	5,40	0,021
Erreur	158	104186	659		
Total	159	107749			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
Origanum	80	112,69	21,54	(-----*-----)
Ammoïdes	80	122,13	29,24	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
108,0 114,0 120,0 126,0

Là aussi, la variation des moyennes des QMIs des deux huiles essentielles est significative.

Nous pouvons conclure que les différences entre les moyennes des QMIs des huiles essentielles des trois plantes sont hautement significatives (P=0,000). Il en est de même si on prend en considération que l'effet de l'huile. Par ailleurs, on note également une différence significative entre les moyennes des QMIs des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et d'*Origanum glandulosum* et celles entre *Origanum glandulosum* et *Ammoïdes verticillata*. On peut avancer que la phase vapeur de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste également la plus efficace.

Comme précédemment, nous avons analysé la variation des QMIs des trois huiles essentielles relatives à seule une bactérie (*Klebsiella pneumoneae* (KL₁)), par une analyse de variance à un facteur et vérifié nos résultats par un test non paramétrique (n=5), de Kruskal-Wallis :

❖ ANOVA à un facteur contrôlé : Comparaison des QMIs des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL 1)

Source	DL	S. carrés	CM	F	P
Huile essentielle	2	10920,00	5460,00	728,00	0,000
Erreur	12	90,00	7,50		
Total	14	11010,00			

Limites de confiance = 95 % distinctes pour la moyenne en fonction de l'écart type regroupé

Niveau	N	Moyenne	EcTyp	
Thymus	5	127,00	2,74	(-*)
Origanum	5	157,00	2,74	(-*)
Ammoïdes	5	193,00	2,74	(-*)

-----+-----+-----+-----+-----
140 160 180 200

Il y a également un effet huile (P=0,000) si on prend en considération une seule bactérie.

❖ **Test de Kruskal-Wallis : Comparaison des QMIs des trois huiles essentielles relatives à *Klebsiella pneumoneae* (KL 1)**

Huile essentielle	N	Médiane	Rang moyen	Z
<i>Thymus</i>	5	125,0	3,0	-3,06
<i>Origanum</i>	5	155,0	8,0	0,00
<i>Ammoïdes</i>	5	195,0	13,0	3,06
Global	15		8,0	
B H = 12,50		DL = 2		P = 0,002

Ce test (P=0,002) confirme également celui de l'ANOVA I (P=0,000).

➤ **Conclusion :**

L'ensemble des résultats obtenus en testant le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, soumis à un traitement statistique, nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a le plus fort potentiel antibactérien ;
- Il y a une certaine concordance des résultats entre l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* et celle d'*Ammoïdes verticillata*, sauf au niveau de la phase vapeur où les différences entre les moyennes des QMIs des huiles essentielles de ces deux plantes relatives aux différentes souches bactériennes sont significatives ;
- La variation des moyennes entre les CMI et les CMBs des huiles essentielles des différentes plantes relatives à l'ensemble des bactéries testées n'est pas significative ;
- La méthode de l'aromatogramme ne permet pas d'avancer les conclusions citées ci-dessus car les différences des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles entre les trois plantes relatives aux différentes espèces bactériennes ne sont pas significatives ;
- Les CMBs de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* obtenus en présence de Tween 80 sont largement supérieures à celles obtenus en présence de l'Agar. Ces différences sont significatives. Par contre, la variation des moyennes entre les CMBs de cette même huile en présence d'éthanol et celles en présence d'agar n'est pas significative.

Par ailleurs, les souches bactériennes testées ont réagit de la même manière au niveau des différentes méthodes utilisés sauf pour la phase vapeur ou certaines bactéries se sont révélées plus résistantes par rapport au contact direct. Ainsi, nous pouvons les classer en trois groupes selon le degré de leur sensibilité, comme suit :

- Les souches les plus sensibles sont : les trois *Staphylococcus aureus* (St₂, St₁, St₃), l'*E. coli* de référence (E₄) et la *Salmonella typhi* (SL) ;
- Les souches moyennement sensibles sont : *Proteus mirabilis* (Pr), les *E. coli* (E₆, E₂, E₃, E₁), *Enterobacter cloacae* (En) et *Citrobacter freundii* (Ci)
- Les souches faiblement sensibles sont : *Klebsiella pneumoneae* (KL₁, KL₂) et *Listeria monocytogenes* (L₁₁, L₁₅).

Conclusion

L'emploi intensif des antibiotiques est lié à l'augmentation des résistances et à la perte d'intérêt d'un grand nombre de molécules, qualifiées de « médicaments miracles » car elles provoquent une spectaculaire guérison pour des maladies autrefois considérées comme incurables. Cette diminution de l'efficacité des moyens de lutte oblige donc à explorer de nouvelles pistes, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides. La nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche d'un principe actif dans les produits naturels d'origine végétale, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, issues de plantes aromatiques qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies et pour améliorer santé et bien être.

Ainsi, nous avons contribué à la mise en valeur de six espèces végétales, poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen et très utilisées en médecine traditionnelle par la population locale : *Thymus fontanesii* (Boiss. et Reut.), *Origanum glandulosum* (Desf.), *Ammoïdes verticillata* (Desf.), *Mentha pulegium* (L.), *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. et *Ziziphora hispanica* (L.), en déterminant la composition chimique et l'activité antibactérienne de leurs huiles essentielles.

Ces différentes plantes sont très riches en huile essentielle excepté, l'espèce *Ziziphora hispanica* qui est caractérisée par un faible rendement de l'ordre de 0,53%.

Pour la caractérisation de ces produits naturels complexes, nous avons utilisé la Résonance Magnétique du Carbone 13, méthode mise au point et développée par le laboratoire d'accueil « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, depuis les années 90. C'est une méthode d'analyse efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles, basée sur la comparaison des déplacements chimiques présents dans le spectre du mélange complexe avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres élaborés au laboratoire.

L'étude détaillée de l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*, par combinaison de quatre méthodes d'analyse, deux techniques chromatographiques (CPG-Ir et chromatographie sur colonne ouverte de silice) et deux techniques spectroscopiques (CPG-SM et RMN ¹³C), nous a permis d'identifier 36 composés qui représentent 92,2 à 93,7% de la composition globale de l'huile essentielle. Elle est dominée par les monoterpènes oxygénés possédant un squelette du type *p*-menthane en position C-3, à savoir la pulégone (77,6 - 79,5%) qui est le composé majoritaire, la *para*-menth-3-en-8-ol (2,4 - 3,6%), la *cis*-isopulégone (0,6%), la *trans*-isopulégone (0,7 - 0,9%) et la pipériténone (0,6%). Néanmoins, il est important de noter que le *cis*- et le *trans*-isopulégone sont cités pour la première fois dans le genre *Ziziphora*.

D'autres composés sont présents en quantités appréciables soit : le limonène (1,7 - 2,1%), le carvacrol (1,6 - 2,8%) et le thymol (0,6 - 0,9%). Le taux des sesquiterpènes identifiés est très faible de l'ordre de 0,2 à 0,3%. Le (*E*)- β -caryophyllène (t - 0,1%) et son oxyde (0,2%) sont les deux seuls sesquiterpènes identifiés dans cette huile essentielle. Un seul composé aliphatique, l'oct-1-en-3-ol (0,1%) est également identifié dans l'huile essentielle de *Ziziphora hispanica*.

L'analyse des huiles essentielles des plantes suivantes : *Origanum glandulosum*, *Ammoïdes verticillata*, *Mentha pulegium* et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, a été effectué en combinant deux méthodes d'analyse (une technique chromatographique (CPG-Ir) et une technique spectroscopique (RMN ^{13}C)).

Au total, seize composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* représentant 94,9 et 98,6% de la composition globale de l'huile essentielle. Les trois échantillons analysés (récoltés dans la même station sur trois années successives) sont qualitativement très proches. Cette huile essentielle est riche en monoterpènes, avec notamment une forte prépondérance des monoterpènes oxygénés ((91,9 - 95,8%). Cette fraction est dominée par des composés possédant un squelette de type *p*-menthane en position C-3. Nous pouvons noter, parmi eux la forte abondance de la pulégone et du menthone. En effet, ces derniers représentent respectivement (62,7 - 78,0%) et (7,7 - 23,1%), soit entre 85,7 et 86,7% au total. Le taux des monoterpènes hydrocarbonés identifiés ne représente que 1,3 à 1,9% de la composition globale. Un seul composé linéaire, l'octan-3-ol (0,9 - 1,2%) est également identifié. L'oxyde de caryophyllène (0,1 - 0,2%) est le seul sesquiterpène identifié lors de l'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, a permis d'identifier dix sept constituants représentant au total 82,2 à 96,2% de la composition globale de l'huile essentielle. Nous avons constaté que pour les trois échantillons analysés (récoltés dans la même station sur trois années successives), la nature des constituants est la même. Cependant, leurs teneurs diffèrent. Sur les dix sept composés identifiés, quinze sont des monoterpènes, avec notamment une forte teneur des monoterpènes oxygénés (80 - 89,8%) dont la plupart sont des composés possédant un squelette du type *p*-menthane en position C-3. Deux échantillons sont caractérisés par une forte abondance de la pulégone (33,3 - 35,5%), suivi de l'isomenthone (17,2 - 24,1%). Quatre autres monoterpènes oxygénés sont également identifiés en quantités appréciables, soit : le néo-isomenthol (9,6 - 10,0%), le menthone (8,5 - 9,6%), le 1,8-cinéole (6,6 - 8,2%) et le néo-menthol (5,6 - 7,1%).

Les monoterpènes oxygénés du troisième échantillon sont dominés par l'isomenthone (27,1%), suivi par la pulégone (20,4%). Les composés présents en quantités appréciables, cités précédemment, sont également identifiés dans cet échantillon, soit le 1,8-cinéole (10,2%), le menthone (9,3%), le néo-menthol (5,5%) et le néo-isomenthol (5,9%).

Un seul sesquiterpène hydrocarboné, le germacrène D est également identifié (0,1 – 1,0%). Le *trans*-caryophyllène (0,1 – 1,0%) est le seul sesquiterpène oxygéné identifié lors de l'analyse de l'huile essentielle de *Satureja calamintha*.

La richesse des huiles essentielles de *Ziziphora hispanica*, de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha subsp. nepeta* en pulégone confère à ces plantes un intérêt industriel. En effet, par réduction de la pulégone, on obtient du menthol. Ce dernier est largement consommé par l'industrie des tabacs (principalement aux Etats-Unis). En pharmacie, il entre dans la formulation de crèmes antiprurigineuses et de préparations destinées à « décongestionner » les voies aériennes supérieures en cas de rhinite. C'est également un aromatisant, il est incorporé dans des produits d'hygiène buccale (pâtes dentifrices), les produits de rasage. Les industries agro-alimentaires, principalement la confiserie (chewing-gums), l'utilisent également (**Bruneton, 1999**).

La caractérisation des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*, a permis l'identification de douze composés représentant un pourcentage variant entre 93,5 et 95,4% de la composition globale de ces huiles essentielles, selon les différentes stations étudiées. Les cinq échantillons analysés sont quantitativement et qualitativement très proches avec le thymol comme composé majoritaire (41,0 et 51,3%). Par contre le carvacrol est présent en faible teneur (2,9 – 3,6%). Ces huiles essentielles ne contiennent que des monoterpènes dont huit oléfines (40,1 – 48,9%) et quatre monoterpènes oxygénés (44,7 et 54,9%). La variation des teneurs des monoterpènes hydrocarbonés en quantités appréciables, à savoir : le γ -terpinène (16,4 – 23,8%) et le *p*-cymène (12,4 – 20,3%) n'est pas importante.

Pour *Ammoïdes verticillata*, l'analyse de ses huiles essentielles a permis d'identifier douze composés représentant 93,6 à 96,8% de la composition chimique globale. Les trois échantillons (récoltés dans la même station sur trois années successives) analysés sont quantitativement et qualitativement très proches. Le taux des monoterpènes oxygénés identifiés représente environ 50% de la composition globale. Le thymol est le monoterpène oxygéné majoritaire de l'ordre de 48,7 à 51,6%. Par contre le carvacrol est présent en très faible teneur (0,3%). Nous avons caractérisé également huit monoterpènes hydrocarbonés qui

représentent 42,6 à 46,5% de la composition chimique globale, avec prédominance du limonène (18,2 – 21,1%), suivi du γ -terpinène (10,2 – 12,4%) et du *p*-cymène (9,9 – 10,8%).

L'étude détaillée de cinq échantillons de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* par application conjointe d'une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux techniques spectroscopiques (RMN ¹³C et CPG-SM), nous a permis d'identifier vingt huit composés représentant 97,2 à 98,4% de la composition chimique globale de l'huile essentielle. Les cinq échantillons étudiés présentent une composition chimique homogène dominée par le carvacrol (66,7 – 69,5%). Par contre, la teneur en thymol varie entre 0,5 et 0,7%. Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes, soit vingt quatre composés qui représentent 96,1 à 97,3%. Par contre, les sesquiterpènes sont présents en faibles teneurs (quatre constituants, avec un pourcentage variant entre 0,9 et 1,1%). Les monoterpènes présents en quantités appréciables sont : le γ -terpinène (5,8 – 9,6%), le *p*-cymène (6,1 – 9,1%), le linalol (2,8 – 4,0%), et l' α -pinène (2,5 – 3,0%). Les sesquiterpènes oléfiniques identifiés (le δ -cadinène et l'*allo*-aromadendrène) sont présents en très faibles teneurs (0,1% et trace, respectivement). Le (*E*)- β -caryophyllène est le sesquiterpène oxygéné majoritaire (0,6 – 0,9%), accompagné de son oxyde (0,1 – 0,2%). Trois monoterpènes linéaires sont également identifiés en très faibles teneurs, soit : le 1-octen-3-ol (0,1 – 0,2%), le 3-octanone (0,1 – 0,2%) et le 3-octanol (0,1%).

L'analyse chimique des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata* récoltée dans différentes stations de la région de Tlemcen, nous a permis de constater que l'origine et l'année de récolte du matériel végétal n'influent pas sur la composition chimique de ces produits naturels. Nous pouvons conclure que ces espèces végétales sont susceptibles d'avoir un intérêt industriel compte tenu de leur richesse en huile essentielle et de leur composition chimique stable et homogène. Elles peuvent également être recommandée comme une source potentielle de carvacrol et de thymol. En effet les huiles essentielles riches en phénols et leur principes actifs (thymol et carvacrol) entrent dans la formulation de diverses préparations pharmaceutiques : pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour le traitement des affections des voies respiratoires et préparations pour inhalation et l'hygiène buccale. Ces huiles essentielles sont largement utilisées -comme antiseptique- par l'aromathérapie (**Bruneton , 1999**).

Vu l'intérêt économique directement lié à la composition qualitative et quantitative des huiles de ces plantes, il est souhaitable d'envisager la plantation de ces espèces végétales en déterminant des conditions et des zones favorables à leur développement.

Après la détermination de la composition chimique, nous avons étudié le pouvoir antibactérien de ces produits naturels sur des souches d'origine hospitalière et sur celles de référence.

Dans un premier temps, nous avons testé si ces huiles essentielles avaient une activité antibactérienne en appliquant une méthode rapide, celle de diffusion sur disque.

Les résultats obtenus concernant l'activité des huiles essentielles de *Ziziphora hispanica*, de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- L'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, est nettement plus active que celle de *Ziziphora hispanica* et de *Mentha pulegium*, et ceci vis-à-vis de la majorité des bactéries testées, à l'exception des genres *Pseudomonas*, *Klebsiella* et *Listeria* qui se sont révélés particulièrement très résistantes.
- Les huiles essentielles des trois plantes présentent une très bonne activité sur les souches de *Staphylococcus aureus*, d'*Escherichia coli* de référence et de *Salmonella typhi*.

Les résultats obtenus concernant l'activité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, nous amène à conclure que :

- Comme précédemment, les différentes souches bactériennes réagissent de la même manière à l'ensemble des huiles essentielles testées.
- Ces substances sont très actives sur la quasi-totalité des bactéries testées. Cependant, elles sont inactives sur les deux espèces de *Pseudomonas aeruginosa*, qui se révèlent très résistantes.
- Les *Staphylococcus aureus*, l'*Escherichia coli* de référence et la *Salmonella typhi* sont les plus sensibles à l'action des huiles essentielles de ces trois plantes.

Ensuite, nous avons étudié le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de ces trois dernières plantes qui se sont montrées les plus efficaces, en définissant les paramètres suivants : CMI, CMB et QMI. D'une façon générale, nous pouvons avancer que :

- L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* s'est avérée nettement plus active que celles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoïdes verticillata*, néanmoins, il y a une certaine concordance des résultats entre les huiles essentielles des ces deux espèces végétales, sauf au niveau de la phase vapeur ou les différences entre les moyennes des QMIs des huiles

essentielles de ces deux plantes relatives aux différentes souches bactériennes sont significatives ;

- L'aromatogramme ne permet pas d'avancer que telle ou telle huile essentielle est efficace car les différences des moyennes des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles entre les trois plantes relatives aux différentes espèces bactériennes ne sont pas significatives ;
- Les CMBs obtenues avec l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* pour les trois émulsifiants utilisés, nous a permis d'avancer que l'éthanol et le Tween 80 influent sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. En effet, Les CMBs obtenues en présence d'agar sont largement inférieures que celles obtenues en présence du Tween 80. En outre, en présence d'éthanol, les concentrations minimales bactéricides sont les plus faibles, mais ne varient pas d'une manière significative par rapport à celles obtenues en présence de l'agar ;
- Il y a une certaine concordance entre les CMI et les CMBs des huiles essentielles des différentes plantes car les différences ne sont pas significatives ;
- Contrairement aux phases vapeurs, les résultats obtenus par contact direct en milieu gélosé et en milieu liquide confirment les résultats obtenus avec l'aromatogramme. En effet, l'*Enterobacter cloacae*, l'*Escherichia coli* (E₂) et le *Staphylococcus aureus* (St₃) se sont révélés plus résistants à la phase vapeur.
- Les espèces bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* se sont montrées très résistantes aux trois huiles essentielles ;
- Les huiles essentielles des trois plantes présentent une forte activité sur les souches de *Staphylococcus aureus*, d'*Escherichia coli* de référence et de *Salmonella typhi* ;

L'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de ces trois plantes, nous permet d'avancer qu'elles sont très actives contre la quasi-totalité des bactéries testées. Cette efficacité leur confère un intérêt certain en tant qu'agents antimicrobiens dans plusieurs domaines :

- Dans le milieu hospitalier, nous pouvons proposer l'application des huiles essentielles contre les infections ou bien pour désinfecter : les mains, les chambres des malades, les plaies et les muqueuses, le matériel de soins et les instruments. En effet, l'utilisation des désinfectants fait partie des moyens de lutte contre l'infection. Elle intervient dans de nombreux protocoles et mesures d'hygiène qui ont pour objectif de limiter les possibilités de transmission des microorganismes.

- Dans le domaine agro-alimentaire, nous pouvons utiliser les huiles essentielles pour prévenir la détérioration des produits alimentaires qui est due à diverses bactéries.

De plus, l'utilisation des huiles essentielles comme agents antimicrobiens présente deux caractéristiques principales : leur origine naturelle (se sont des substances naturelles) qui est un moyen de sécurité pour l'être humain et pour l'environnement. De plus, elles n'entraînent ni résistance des germes, ni sélectivité des flores saprophytes et pathogènes, ni altération des systèmes de défense. Cependant, avant d'envisager l'utilisation de ces métabolites à forte valeur ajoutée, il est nécessaire de voir l'effet de ces huiles essentielles *in vivo* et d'entreprendre des études toxicologiques et pharmacologiques. Il est souhaitable également de faire des fractionnements et sélectionner les fractions caractérisées par un potentiel antimicrobien considérable.

Enfin, la connaissance des plantes médicinales fait partie de l'héritage culturel des peuples, notamment en milieu rural, mais il est menacé par l'évolution rapide du mode de vie. C'est l'appauvrissement culturel qui conduit à l'anéantissement d'un héritage biocénétique avec toutes les conséquences que cela implique engendrant les situations irréversibles que subissent les écosystèmes. Ainsi, il est nécessaire de préserver ces plantes médicinales car elles constituent une composante fondamentale du système de santé dans le monde et peuvent fournir des remèdes de qualité et de coût raisonnable.

*Références
Bibliographiques*

Abdelouahid D. E., Bekhechi C. (2002). Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha). *Biologie et Santé*, 4: 91 – 100.

Adams R. P. (1989). Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy. *Academic Press, Inc., San Diego.*

Adio A. M., Paul C., Kloth P., Konig W. A. (2004). Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulata*. *Phytochemistry*, 65: 199 – 206.

Adzet T., Passet J. (1972). Chemotaxonomie du genre *Satureia-Calamintha*. *Rivista Italiana ERROS*, 54: 482 – 486.

Agrawala J. N., Pant M. C. (1986). Effect of feeding *Carum copticum* seeds on serum lipids, high density lipoproteins (HDL) and serum cholesterol binding reserve in the albino rabbits. *Indian J. of Medical Research*, 83: 93 – 95.

Akgül A., De Pooter H. L., De Buyck L. F. (1991). The essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* and *Ziziphora clinopodioides* from Turkey. *J of Essential oil Research*, 3: 7 – 10.

Alami M., Barret R., Brion J. D., Enguehard-Gueiffier C., Foliot P., Gaudy C., Gerondeau N., Gueiffier A., Lanotte P., Leconte-Astruc V., Mereghetti L., Peyrat J. F., Ratsimbazafy V., Tandé D. (2005). Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. *Elsevier*, pp 14.

Aleman L.B. (1989). Exceptional Resolution and New Signals Detected in the ¹³C NMR Spectra of Alkanes. *Magn. Res. Chem.*, 27: 1065 - 1073.

Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 4168 – 4170.

Allegrini J. Simeon de Buochberg M. (1972). Une technique d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. *Production et Problèmes Pharmaceutiques*, 27: 891 – 897.

Ambasta S. P., Ramachandran K., Kashyapa K., Chand R., Edits (1986). The useful plants of India. *Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi, India*, pp 643.

Anonyme I : <http://images.google.com>

Anonyme II : <http://fr.wikipedia.org/wiki/origanum>

Anonyme III : <http://www.passionbassin.com/photo.php>

Anonyme IV : http://www.wikipedia.org/wiki/Menthe_pouliot

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J. Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson, Paris.*

Arras G., Usai M. (2001). Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hoffing. Oil a dits effect in subatmospheric pressure conditions. *J. of Food Protection*, 64: 1025 – 1029.

Ashraf M., Bhattay M. K. (1975). Studies on the essential oils of Pakistani species of the family umbelliferae. Part I. *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (ajowan) seed oil. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, 18: 232 – 235.

Association Française de normalisation (AFNOR) (1992). Recueil des normes françaises : Huiles essentielles.

Atik-Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab S. A., Boti J. B., Casanova J. (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé dans la région de Tlemcen. *Biologie et Santé*, 7 : 6 – 11.

Avesina A. (1985). Law in medicine. *Second éd. Soroush Press*, Tehran, 2, pp 187.

Aviana A., Edadi R., Tahmasebi G. (2002). Laboratory evaluation of some plants essences of control *Varroa destructor* experimental and applied. *Acarology*, 27: 319 – 327.

Baba Aïssa F. (1991). Les plantes médicinales en Algérie. *Bouchéne and Diwan*.

Baba Aïssa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. *Ed. Librairie Moderne-Rouiba*, pp 46 – 47 – 194 – 195 – 231.

Balbaa I., Hilal S. H., Haggag M. Y. (1973). The volatile oil from herb and fruits of *Carum copticum* at different stages of growth. *Planta Medica*, 23: 301 – 307.

Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J. (2000). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour and Fragrance J.*, 15 : 50 – 54.

Baldovini N., Tomi F., Casanova J. (2001). Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ¹³C-NMR. *Phytochem. Anal.*, 12: 58 - 63.

Bandini P., Pacchiani M. (1981). Costituenti, proprietà e Usi di *Calamintha nepeta*. *Essenze Deriv. Agrum.*, 51: 325 – 330.

Baser K. H. C., Ozek T., Tumen G., Sesik E. (1993). Composition of essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish Origin. *J. of Essential Oil Research*, 4 : 139 – 142.

Baser K. H. C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa from Turkey. *Pure Appl. Chem.*, 74: 527 – 545.

Baudoux D. (2001). Aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. *2^{ème} éd. Atlantica*, pp 25 – 26 - 34 – 35.

Baytop T., Sütlüpinar N. (1986). Characteristics of « Nanahan » cultivated in Anatolia and its volatile oil. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 22: 73 – 76.

Baytop T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and present). *2^{ème} éd. Nobel Medical Publishers*.

Bekhechi C. (2002). Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. *Mémoire de Magister*, option Biologie Moléculaire et Cellulaire, université Abou Bakr Belkaïd.

Belhattab R., Larous L., Kalantzakis, Boskou D., Exarchou V. (2004). Antifungal properties of *origanum glandulosum* Desf. extracts. *J. of Food, Agriculture & Environment*, 2: 69 - 73.

Belhattab R., Larous L., Figueiredo A. C., Santos P. A. G., Barroso J. G., Pedro L. G. (2005). *Origanum glandulosum* Desf. Grown Wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance J.*, 20: 209-212.

Bellakhdar J. (1978). Médecine traditionnelle et toxicologique Ouest Saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. *Ed. Techniques Nord-africaines*, Rabat.

Bellakhdar J., Chasse R., Fleurentin J., Younos C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopeae. *J. of Ethnopharmacology*, 15: 123 – 143.

Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Editions Ibis presse*, Paris, pp : 764.

Bellomaria B., Della Mora L. (1985). Novità nell'uso di piante officinali per la zona di Matelica (Macerata), anche in confronto con altre zone delle Marche. *Arch Bot Biogeograf Ital.*, 61: 51–80.

Beloued A. (2001). Plantes médicinales d'Algérie. *Ed. Office des publications universitaires*.

Bendahou M., Benyoucef M., Benkada D., Soussa Elisa M. B. D., Galvao E. L., Marques M. M. O., Muselli A., Desjobert J. M. Bernardini A. F., Costa J. (2007). Influence of the processes extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. *J. of Applied Sciences*, 8: 1152 – 1157.

Bendahou M. (2007). Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat d'Etat*, option Biochimie, université Abou Bakr Belkaïd.

Béniston Ws. Nt. (1984). Fleurs d'Algérie. *Ed. Entreprise Nationale du livre*.

Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ayadi A., Ihlal M. (1984). Method to study antimicrobial effects of essential oils- Application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *J. of Food Protection*, 47: 748 – 752.

Benjilali B., Tataoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M., Ayadi A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 20 : 155-167.

Benjilali B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales : Cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. *Le pharmacien du Maghreb*.

- Bergogne-Bérézin E., Brognard J. M. (1999).** Bases biologiques de l'antibiothérapie. *Ed. Masson*, pp 27.
- Bergogne-Bérézin E., Dellamonica P. (1999).** Antibiothérapie en pratique clinique. 2^{ème} Ed. *Masson*, pp 3.
- Beylier-Maurel M. F. (1976).** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana EPPOS*, 58: 253-256.
- Bezić N., Skočibušić M., Dunkić V., Radonić A. (2003).** Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 17: 1037 – 1040.
- Bhargava, HaKsar (1961) in Mehta R. L., Zayas J. F. (1995).** Anoxidative effect of Ajowan in a model system. *JAOCs*, 72: 1215 – 1218.
- Bighelli A., Tomi F., Casanova J. (1994).** Computer-aided carbon-13 NMR Study of phenols contained in liquids produced by pyrolysis of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 6: 461 - 464.
- Bigo De Grosso M., Moyna P. (1985).** Composicion quimica de las esencias de *Mentha* del Uruguay. *An. Real Acad Farm.*, 51: 333 – 338.
- Bilia A. R., Flamini G., Taglioli V., Morelli I., Vincieri F. F. (2002).** GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chemistry*, 76: 307 – 310.
- Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G. (1993).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance J.*, 8: 331 – 337.
- Borrel (200).** Les infection nosocomiales, cours maladie. *L'homme et L'environnement.* Université Lumière Lyon II.
- Boskabady M. H., Shaikhi J. (2000).** Inhibitory effect of *Carum copticum* on histamine (H₁) receptors of isolated guinea-pig. Tracheal chains. *J. of Ethnopharmacology*, 69: 217 – 227.
- Boti J.B., Koukoua G., N'Guessan T.Y., Muselli A., Bernardini A.F., Casanova J. (2005).** Composition of leaf, stem bark and root bark oils from *Isolona cooperi* investigated by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, 16: 357 – 363.
- Boti J.B., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J. (2006).** Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour and Fragrance J.*, 9: 164 – 168.
- Boti J.B., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J. (2006).** Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour and Fragrance J.*, 21: 268 – 273.
- Boullard B. (2001).** Dictionnaire : plantes médicinales du monde. (*Réalités et Croyances*) *Ed., ESTEM*, pp 348.

- Boulos L. (1983).** Medicinal plants of North Africa. *Reference Publication: Algonac, MI*, pp 109 - 175.
- Bousmaha L., Atik Bekkara F., Tomi F., Casanova J. (2005).** Advances in the chemical composition of *Lavandula dentata* L. essential oil from Algeria. *J. of Essential Oil Research*, 17: 292 – 295.
- Bousmaha L., Boti J. B., Atik Bekkara F., Castola V., Casanova J. (2006).** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Flavour Fragr. J.*, 21: 268 - 272.
- Bousmaha-Marroki L. (2007).** Contribution à la valorisation d'espèces végétales aromatiques des genres *Lavandula* et *Thymus* d'Algérie : Analyse des huiles essentielles par CPG, CPG-SM et RMN ¹³C et étude de leur pouvoir antimicrobien sur des germes d'origine hospitalière. *Thèse de Doctorat*, option Microbiologie & Phytochimie, Université Djilali Liabes de Sidi Bel-Abbés.
- Bousmaha-Marroki L., Atik-Bekkara F., Tomi F., Casanova J. (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Subsp. eu-ciliatus Maire from Algeria. *J. of Essential Oil Research*, 19: 401 – 404.
- Bradesi P., Tomi F., Casanova J. (1995).** Carbon-13 NMR study of farnesol, farnesyl acetate and farnesal stereoisomers: chemical shift assignment using lanthanide induced shifts. *Canadian J. Appl. Spectrosc.*, 40: 76 - 81.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J. (1996).** L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian J. Appl. Spectrosc.*, Partie 1, 4:15 – 24, Partie 2, 4 :41–50.
- Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A. F. (1997).** Chemical composition of Myrtle essential oil from Corsica (France). *J. of Essential Oil Research*, 9 : 283 – 288.
- Buchbauer G., Jirovetz L. (1994).** Aromatherapy- Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance J.*, 9: 217 – 222.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} éd. *Tec & Doc Lavoisier*, Paris.
- Burt S. A. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International J. of food Microbiology*, 94: 223 – 253.
- Canillac N., Mourey A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *J. of Food Microbiology*, 18: 261 – 268.
- Cantino P. D., Harley R. M. Wagstaff S. J. (1992).** Genera of labiatae ; status and classification. In: Harley M. R. Reynolds T.(Eds) Advances in labiatae science. *Royal Botanic Gardens*, pp 511 – 522.
- Careaga M, Fernández E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M. E., Hernandez-Sanchez H. (2003).** Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and

Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat. *International J. of Food Microbiology*, 83: 331 – 335.

Carrée P. (1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II. Ed. Ballière J. B. et fils.

Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alterniflora* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by Time-kill, Lysis, Leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 46: 1914 – 1920.

Castola V., Bighelli A., Casanova J. (1999). Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Triterpenes using ¹³C NMR Spectroscopy Exemplified by Dichloromethanic Extracts of Cork. *Appl. Spectro.*, 53: 344 - 350.

Castola V., Bighelli A., Casanova J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28: 79 - 88.

Castola V., Bighelli A., Conti L., Scano G., Mascia S., Casanova J. (2000). Identification and quantification of anhydrosugars in biomass pyrolytic oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Canadian J. Anal. Sci. Spectrosc.*, 45: 102 - 106.

Castola V., Bighelli A., Rezzi S., Melloni G., Gladiali S., Desjobert J.M., Casanova J. (2002). Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork. *Ind. Crops Prod.*, 15: 15 - 22.

Castola V., Marongiu B., Bighelli A., Floris C., Lai A., Casanova J. (2005). Extractives of Cork (*Quercus suber* L.): Chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts. *Ind. Crops Prod.*, 21: 65 - 69.

Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Proença da Cunha A. (2001). Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 1175 - 1183.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. (2003). Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. *Flavour and Fragrance J.*, 18: 532 - 538.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chemopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem. Anal.*, 15: 275 - 279.

Chaibi A., Ababouch L. H., Belasri K., Boucetta S., Busta F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *J. of Food Microbiology*, 14: 161 – 174.

Chalchat J. C., Garry R. P., Bastide P., Fabre F., Malhuret R. (1991). Corrélation composition chimique/ activité antimicrobienne : V- Contribution à la comparaison de 2 méthodes de détermination des CMI. *Plantes Médecinales et Phytothérapie*, 25 : 184 – 193.

Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J., Remmal A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Brazilian J. Infectious Disease*, 8: 217 - 226.

Chang S. T., Chen P. F., Chang S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. of Ethnopharmacology*, 77: 123 – 127.

Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L. M., Hmamouchi M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. of Ethnopharmacology*, 89: 165 – 169.

Chericoni S., Flamini G., Campeol E., Cioni P. L., Morelli I. (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum* : Variability during the year. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32: 423 – 429.

Chevalier j., Choisy C., Crémieux A., Darbord J. C., Davin-Régli A., Dubreuil L., Finance C., Linxe C., Quentin-noury C., Quero A. M., Reynaud A. (2003). Microbiologie générale et Santé. ESKA, Paris, pp 290 – 292.

Chialva F., Monguzzi F., Manitto P., Akgül A. (1993). Essential oil constituents of *Trachyspermum copticum* (L.) fruits. *J. of Essential Oil Research*, 5: 105 – 106.

Chiej R. (1984). Macdonald encyclopedia of medicinal plants. *Ed. Macdonald*, London, pp 212-217.

Choudhury S., Ahmed R., Kanjilal P. B., Leclercq P. A. (1998). Composition of the seed oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Northeast India. *J. of Essential Oil Research*, 10: 588 – 590.

Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants in the Democratic republic of Congo. *J. of Ethnopharmacology*, 79: 213 – 220.

Conner D. E., Beuchat L. R. (1984). Sensitivity of heat-stressed yeast's to essential oils of plants. *Applied Environment Microbiology*, 47: 229 – 233.

Cosentino S., Palmas F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130 – 135.

Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J. P., Goldstein F. (1990). Bactéricidie : aspects théoriques et thérapeutiques. *Maloine*, pp 374.

Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R., Wyllie S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alterniflora* (tea tree oil). *J. of Applied Microbiology*, 88: 170 – 175.

Crémieux A., Guiraud-Dauriac H., Dumenil G. (1981). Neutralisation des antiseptiques et désinfectants. *J. of pharm. Belg.*, 36: 223 – 226.

- Daferera D. J., Ziogas B. N., Polissiou M. G. (2003).** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39 – 44.
- Deak T., Beuchat L. R. (1996).** Handbook of food spoilage. New York, USA: *CRC Press*.
- De Billerbeck V. G. (2000).** Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger*/ Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet des substances volatiles en phase vapeur. *Faculté des Sciences pharmaceutiques*, Institut national polytechnique de Toulouse, pp 236.
- De Billerbeck V. G. (2002).** Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air, les contaminants biologiques des biens culturels. *Museum National d'histoire Naturelle et éd. Scientifiques et médicales*, pp 345 – 358.
- De Billerbeck V. G. (2005).** Huiles essentielles et maladies nosocomiales. *La phytothérapie Européenne*, pp 17 – 20.
- De Pooter H. L., Schamp N. (1986).** Comparaison of the volatile composition of some *Calamintha / Satureja* species. In : Progress in essential oil Research. Ed. *E-J. Brunke*, Walter De Gruyter, Berlin, pp 139 – 150.
- De Pooter H. L., Goetghebeur P., Schamp N. (1987).** Variability in composition of the essential oil of *Calamintha nepeta*. *J. of Phytochemistry*, 26: 3355 – 3356.
- Debuigue G. (1984).** Larousse des plantes qui guérissent. *Librairie Larousse*.
- Delepaul Q., De Billerbeck V. G., Roques C. G., Michel G. (2000).** The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J. of Essential Oil Research*, 12: 256 - 266.
- Demissew S. (1993).** A description of some essential oil bearing plants in Ethiopia and their indigenous uses. *J. of Essential Oil Research*, 5: 465 – 479.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M. (1993).** Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*, 48 : 301 – 304.
- Dorman H. J. D. (1999).** Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *PhD Thesis*, University of Strathclyde, Glasgow.
- Dorman H. J. D., Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Applied Microbiology*, 88: 308 – 316.
- Dragland S., Senoo H., Wake K., Blomhoff R. (2003).** Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The journal of Nutrition*, 133: 1286 – 1289.
- Dubey N. K., Mishra A. K. (1990).** Evaluation of some essential oils against dermatophytes. *Indian Drugs*, 27 : 529 – 531.

- Dusquenoy E. (2006).** Caractérisation chimique d'huiles essentielles et d'extraits de trois espèces de Corse en vue de leur valorisation: *Pinus nigra* subsp. *laricio*, *Abies alba* et *Taxus baccata*. Thèse de Doctorat de l'université de Corse.
- Dwivedi S. K., Singh K.P. (1998).** Fungitoxicity of some higher plant products against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Flavour and Fragrance J.*, 13: 397 – 399.
- Economou K. D., Oreopoulou V., Thomoupoulos C. D. (1991).** Antioxidant properties of some plant extract of the Labiatae family. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68: 109 – 113.
- Essawi T., Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Applied Microbiology*, 70: 343 – 349.
- European Committe for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2003).** Détermination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases*, 9: 1 – 7.
- Ferrari B., Tomi F., Casanova J. (2005).** Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae) *Biochem. System. Ecol.*, 33: 445 - 449.
- Ferrari B., Tomi F., Richomme P., Casanova J. (2005).** Two new irregular acyclic sesquiterpenes aldehydes from *Santolina Corsica* essential oil. *Magn. Reson. Chem.*, 43: 73 - 74.
- Ferreira M.J.P., Costantin M.B., Sartorelli P., Rodrigues G.V., Limberger R., Henriques A.T., Kato M.J., Emerenciano V.P. (2001).** Computer-Aided Method for Identification of Components in Essential Oils by ¹³C NMR Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 447: 125 - 134.
- Filippini M.H., Tomi F., Casanova J. (2000).** Composition of the leaf oil of *Ferula arrigonii* Bocchieri. *Flavour and Fragrance J.*, 15: 195 - 198.
- Fisher J., Arnold J. R. P. (2001).** Chimie pour biologistes. *Ed. BERTI*, pp 265 – 268.
- Formáček V., Kubeczka K.H. (1982).** ¹³C NMR Analysis of Essential Oils in Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects. *Margaris N., Koedam A., Vokou D., Ed., Martinus Nijhoff*, La Haye, 177 - 181.
- Fourment P., Roques H. (1941).** Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *Documents et Renseignements Agricoles*, Bull. 61, Alger.
- Fournier P. (1947 – 1948).** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. 3 vols. *Lechevalier*, Paris.
- Franzios G., Mirotsoy M., Hatzi Apostolou E., Karl J., Scouras Z. G., Mavargani-Tsapidou P. (1997).** Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2690 – 2694.
- Fraternale D., Giamperi L., Ricci D., Manuta A. (1998).** Composition of essential oil as a taxonomic Marker for *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta*. *J. of Essential Oil Research*, 10: 568 – 570.

- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002).** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. of Food Protection*, 65: 1545 – 1560.
- Gamisans J., Jeanmonod D. (1993).** Catalogue des plantes vasculaires de la Corse. *Ed. D. Jeanmonod, H. M. Burdet*, Genève.
- Garland S. (1980).** Le livre des herbes et des épices. *Ed. Fernand Nathasn.*, Paris, pp 228.
- Garnier G., Bezanger-Beauquesne I., Debraux G. (1961).** Ressources médicinales de la flore française. Tome II, *Ed. Vigot Frères*, Paris.
- Gayraud M., Lortholary O. (2003).** Soins infirmiers aux personnes atteintes de maladies infectieuses / de l'infection par le VIH. *Ed. Masson*, pp 31, 65.
- Georgiev E. V., Khadzhiiski T. T. (1969).** Changes in essential and glyceride oils during storage of raw materials: changes in oils during storage of *Carum ajowan* fruits. *Nauch. Tr., Vissh Inst. Khranit. Vkusova Prom., Plovdiv*, 16: 155 – 163.
- Gersbach P. V., Reddy N. (2002).** Non-invasive localization of thymol accumulation in *Carum copticum* (Apiaceae) fruits by chemical shift selective magnetic resonance imaging. *Annals of Botany*, 90: 253 – 257.
- Ghannadi A., Sajjadi S. E., Kabouche A., Kabouche Z. (2004).** *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. –A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 187 – 189.
- Gilani A. H., Jabeen Q., Ghayur M. N., Janbaz K. H., Akhtar M. S. (2005).** Studies on the antihypertensive, antispasmodic, bronchodilator and hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. *J. of Ethnopharmacology*, 98: 127 – 135.
- Gonny M., Bradesi P., Casanova J. (2004).** Identification of the Components of the Essential Oil from Wild Corsican *Daucus carota* L., Using ¹³C-NMR Spectroscopy. *Flavour and Fragrance J.*, 19 : 424 - 433.
- Gonny M., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J. (2006).** Analysis of *Juniperus communis* susp. Alpine needle, berry, wood end root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³CNMR. *Flavour and Fragrance J.*, 21: 99 – 106.
- Greuter W., Burdet H. M., Long G. (1986).** Med-checklist. *In Editions de Conservatoire de Jardin Botanique de la ville de Genève*, pp 3.
- Grosjean N. (2004).** Huiles essentielles : Se soigner par l'aromathérapie. *Ed. Eyrolles*, pp 98.
- Guignard J. L., Dupont F. (2004).** Botanique : Systématique moléculaire. 13^{ème} éd. *Masson*, pp 237.
- Guillen M. D., Manzanos M. J. (1998).** Study of composition of different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*, 3: 373 – 383.

Günther H. (1994). La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie. *Masson*, Paris.

Hersch-Martinez P., Leanos-Miranda B. E., Santos S. (2005). Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia*, 76: 453 – 457.

Hoi T.M., Moi L.D., Muselli A., Bighelli A., Casanova J. (1997). Analyse de l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Viêt-nam par RMN du carbone-13. 15^{ème} Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne-les-Bains 5-7/09/1996, Actes, *Rivista Ital. EPPOS*, numéro spécial, 633 - 637.

Houmani Z., Azzoudj S., Naxakis G., Skoula (2002). The essential oil composition of Algerian Zaâter: *Origanum* ssp. and *Thymus* ssp.. *J. of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9: 275 – 280.

Ietswaart J. H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf.. *In Leiden Botanical series 4*, Leiden University Press: Le Hague.

Inouye S. et al., (2001). Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.*, 7: 251 - 254.

Iscan G., Kirimer N., Kurkcuoglu M., Baser K. H. C., Demiri F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3943 – 3946.

Jacob M., Pellecier J., Tomei R. (1979). Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana EPPOS*, 11 : 26-30.

Janssen A. M., Scheffer J. J. C. (1985). Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of *Alpinia galanga*. *Planta Medica*, 507 – 511.

Janssen A. M., Chin N. L. J., Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A. (1986). Screening for antimicrobial activity of some essential oil by the agar overlay technique. *Parmaceutisch Weekblad Scientific Ed.*, 8: 289 – 292.

Janssen A. M., Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils : A 1976 – 1986 Literature Review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, 53: 395 – 398.

Joffin J. N., Leyral G. (1996). Microbiologie technique: dictionnaire des techniques. *Centre régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine*, pp 131.

Joffin J. N., Leyral G. (2001). Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3^{ème} Ed. *Biologie Technique*, pp 58.

Joshi B. S., Ramanujam S., Sahena M. B. L. (1963). Improvement of some essential oil bearing spice plants. *Bull. Regional Res. Lab. Ja.*, 1: 94– 100.

Joulain D., König W. A. (1998). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. *E. B.- Verlag*, Hamburg.

Juliano C., Mattana A., Usai M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 516 – 522.

Juven B. J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. of applied Bacteriology*, 76: 626 – 631.

Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabeled K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international J. of Aromatherapy*, 15: 129 – 133.

Kambouche N., El-Abed D. (2003). Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *J. of Essential Oil Research*, 15: 10 – 11.

Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. of Ethnopharmacology*, 76: 183 – 186.

Karawya M. S., Hifnawy M. S. (1974). Flavors and Nonalcoholic Beverages, Analytical study of the volatile oil of *Thymus vulgaris* L. growing in Egypt. *J. of the AOAC*, 47: 997 – 1001.

Kellner W., Kober W. (1954). Möglichkeiten der verwendung ätherischer öle zur raumdeinfekton. *Arzneimittelforsch*, 4 : 319 - 325.

Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F., Bahramifar N. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 86: 587 – 591.

Kim J., Marshall M. R., Vei C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839 – 2845.

Kirimer N., Baser K. H. C., Özek T., Kürkçüoğlu M. (1992). Composition of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*. *J. of Essential oil Research*, 4: 189 – 190.

Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. *J. of Essential Oil Research*, 1: 119 – 128.

Kokkalou E., Stefanou E. (1990). The volatile oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball. endemic to Greece. *Flavour and Fragrance J.*, 5: 23 – 26.

Kokkini S. (1996). Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In proceedings of the IPGRI International workshop on Oregano, 8 – 12 May 1996, Padulosi S (ed.). CIHEAM: Valenzano, pp 2 – 12.

Kováts E. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv., Chromatogr.*, 1: 229 – 247.

Kubeczka K.H., Formáček V. (1984). Application of Direct Carbon-13 NMR Spectroscopy in the Analysis of Volatiles. *Schreir P. Ed., Walter de Gruyter & Co, Berlin*, 219 - 230.

Kubeczka K.H., Schultze W., Formáček V., Herres W. (1988). New Developments in Essential Oils Analysis by Fourier-Transform Spectroscopy. 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, Washington, 16-20 Nov. 1986, *Proceedings, Elsevier Science*, 931 - 950.

Kumar A., Naik S. N., Maheshwari R. C., Gupta A. K. (1992). Optimization of process conditions from Ajowan seeds using carbon dioxide. *Indian Perfum.*, 36 : 206 – 212.

Lahlou M., Berrada R., Agoumi A., Hmamouchi M. (2000). The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in Morocco. *International J. of Aromatherapy*, 10: 108 – 123.

Lahlou S., Leal-Cardoso J. H., Magalhães P. J. C. (2000). Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: Studies in DOCA-Salt hypertensive rats. *Planta Medica*, 66: 138 – 143.

Lahlou M., Berrada R. (2001). Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *Int. J. Aromather.*, 11: 87 – 96.

Lahlou M., Berrada R., Hmamouchi M. (2001). Molluscicidal activity of thirty essential oils on *Bulinus truncatus*. *Thérapie*, 56 : 71 – 72.

Lahlou M., Berrada R. (2003). Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatised in Morocco. *Flavour and Fragrance J.*, 18 : 124 – 127.

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P., Nychas G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. of Applied Microbiology*, 91: 453 – 462.

Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B., Berrada M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Research*, 71 : 9 – 15.

Larousse (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins.

Lattaoui N., Tantaoui-Elaraki A. (1994). Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. *Rivista Italiana*, 13: 13 – 19.

Lawrence B. M. (1980). The existence of intraspecific differences in specific genera in the Labiatae family. *Paper presented at VIIIe international congress of essential oils*, Cannes, pp 118 – 123.

Lawrence M. (1978). A study of the monoterpene interrelationships of the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran. *Thèse de Doctorat*, Netherlands.

Lemordant D., Boukef K., Bensalem M. (1977). Plantes utiles et toxiques de Tunisie. *Fitoterapia*, 48 : 191 – 214.

Lesueur D., Ban N. K., Bighelli A., MUuselli A., Casanova J. (2006). Analysis of the root oil of *fofiena hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC-MS and ¹³CNMR. *Flavour and Fragrance J.*, 21: 171 – 174.

Lis-Balchim M., Deans S. G., Eaglesham E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance J.*, 13: 98 – 104.

Lorenzi H., Matos F. J. A. (2002). Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas cultivadas. *Instituto Plantarum*, pp 512.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. (2000). Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28: 61 - 78.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Jacquemond C., Tomi F., Casanova J. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. *Flavour and Fragrance J.*, 16: 89 - 96.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 77 - 104.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Jacquemond C., Casanova J. (2002). Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 796 - 805.

Lowy F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.*, 339: 520 – 532.

Lozeine K., Vauciunine J., Venskutonis P. (1998). Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. *Planta Medica*, 64: 772 – 773.

Lust J. (1983). The herb book. *Bantam Books*, pp 660.

Mahadevan (1982). Biochemical aspects of plant disease resistance. Part I: Performed inhibitory substances. *Today and Tomorrow Printers and Publishers*, New Delhi, India, pp 425 – 431.

Mahmoudi Y. (1990). La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. *Palais du livre*, Blida.

- Marino M., Bersani C., Comi G. (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International J. of Food Microbiology*, 67: 185 – 187.
- Mariotti J. P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A. F. (1997).** Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour and Fragrance J.*, 12: 147 – 151.
- Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E. (1994).** Effects of planting time and mineral fertilization on Peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour and Fragrance J.*, 9: 125 – 129.
- Martin A. J. P., Synge R. L. M. (1941).** A new form of chromatogram employing two liquide phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of higher monoaminoacids in proteins. *Biochem. J.*, 35: 1358 – 1368.
- Martins A.P., Salgueiro L., Vila R., Tomi F., Cañigueral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T. (1999).** Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*. *Planta Medica*, 65: 187 - 189.
- Mastelic J., Milos M., Kustrak D., Radonic A. (1998).** The essential oil and glucosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi.. *Croatica Chemica Acta*, 71: 147 – 154.
- Mazzanti G., Battinelli L., Salvatore G. (1998).** Antimicrobial properties of the linolool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance J.*, 13: 289 – 294.
- Mazzoni V., Bradesi P., Tomi F., Casanova J. (1997).** Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using ¹³C NMR spectroscopy: application to honeys. *Magn. Res. Chem.*, 35: 81 - 90.
- Mazzoni V., Tomi F., Casanova J. (1999).** Aduacane type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. *Flavour and Fragrance J.*, 14: 268 – 272.
- Mc Lafferty F. W., Stauffer D. B. (1994).** Wiley Registry of Mass Data. 6th éd. *Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM*, version 3.10d. Palasade Co., Newfield.
- Mehta R. L., Zayas J. F. (1995).** Anoxidative effect of Ajowan in a model system. *JAOCS*, 72 : 1215 – 1218.
- Mehta R. L., Zayas J. F., Yang S. S. (1994).** Ajowan as a source of natural lipid antioxidant. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 42 : 1420 – 1422.
- Mejholm O., Dalgaard P. (2002).** Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34 : 27 – 31.

Merad R. (1973). Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne: Les inventaires du grand Alger. Thèse d'Etat, Institut des Sciences Médicales, université d'Alger, tome II, pp 312.

Meral G. E., Konyalioglu S., Ozturk B. (2002). Essential oil composition and antioxidant of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides*. *Fitoterapia*, 73: 716 – 718.

Marino M., Bersani C., Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae. *International J. of Food Microbiology*, 67: 185 – 187.

Meyer A., Deiana J., Leclerc H. (1994). Cours de microbiologie générale. *Ed. Doin*.

Mimica-Dukić N., Božin B., Soković M., Mihajlović B., Matavulj M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essentials oils. *Planta Medica*, 69: 413 – 419.

Miri R., Ramezani M., Javidnia K., Ahmadi L. (2002). Composition of the volatile oil of *Thymus transcaspicus* Klokov from Iran. *Flavour and Fragrance J.*, 17: 245 – 246.

Montes M., Valenzuela L., Wilkomirsky T., Niedmann C. (1986). Détermination de la pulégone dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. originaire de Chili. *Ann. Pharmaceutiques français*, 44: 133 – 136.

Morales R. (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L. in the mediterranean area. *Logasalia*, 19: 249 – 262.

Morris J. A., Khetty A., Seitz E. W. (1978). Antimicrobial activity of aroma and essential oils. *J. Amer. Oils Chem. Soc.*, 56: 595 – 603.

Muselli A., Hoi T.M., Cu L.D., Moi L.D., Bessière J.M., Bighelli A., Casanova J. (1999). Composition of the essential oil of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. (*Araliaceae*) from Vietnam. *Flavour and Fragrance J.*, 14: 41 - 44.

N'Guyen Thi Tam, Duong Thi Thuam, Bighelli A., Castola V., Muselli A., Richomme P., Casanova J. (2004). *Beackea frutescens* leaf oil from Viêt-nam: Composition and chemical variability. *Flavour and Fragrance J.*, 19: 217 – 220.

Narayana C., Somayajulu B. A. R., Thirumala S. D. (1967). Recovery of fatty oil from spent seeds of Ajowan (*Trachyspermum ammi* Linn.). *Indian J. of Technology*, 5: 268 – 269.

National Institute of Standards and Technology (1999). PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. *The Perkin Elmer Corporation*.

Nauciel C., Vildé J. L. (2005). Bactériologie médicale : Connaissances et pratique. 2^{ème} Ed. *Masson*, pp 45.

Nevas M., Korhonen A. R., Lindstrom M., Turkki P., Korkela H. (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J. of Food Protection*, 67: 199 – 202.

- Ngassapa O., Runyoro D. K. B., Harvala E., Chinou I. B. (2003).** Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm. F.) Spreng (Verbenaceae). *Flavour and Fragrance J.*, 18: 221 – 224.
- Nigram C., Shakum W., Levi L. (1963).** Determination of trace constituents of oil of Ajowan. *Perfumery Essential Oil Record*, 54: 25 – 28.
- Ohno T. et al., (2003).**Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8: 207 - 215.
- Ouattara B., Simard R. E., Holley A. R., Piette G. J. P., Bégin R. (1997).** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International J. of Food Microbiology*, 37: 155-162.
- Oussalah M., Caillet S., Lacroix. M. (2006).** Mechanism of Action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. of food Protection*, 69: 1046 - 1055.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. (2007).** Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414 – 420.
- Özel M. Z., Göğüş F., Hamilton J. F., Lewis A. C. (2005).** Analysis of volatile components from *Ziziphora taurica* subsp. *taurica* by steam distillation, superheated-water extraction, and direct thermal desorption with GCXGC-TOFMS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382: 115 – 119.
- Ozturk Y., Aydin S., Tecik B., Baser K. H. C. (1995).** Effects of essential oils from certain *Ziziphora* species on swimming performance in mice. *Phytotherapy Research*, 9: 225 – 227.
- Ozturk Y., Ercisli S. (2006).** The chemical composition of the essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extracts of *Ziziphora persica* Bunge. *J. of Ethnopharmacology*, 106: 372 – 376.
- Ozturk S., Ercisli S. (2007).** Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food Control*, 18: 535 – 540.
- Padrini F., Lucheroni M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles : Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromomassage énergétique avec plus de 100 photographies. *Ed. De Vecchi*, pp 15.
- Panetta F. D. (1985).** Population study on pennyroyal mint (*Mentha pulegium* L.) I: Germination and seeding establishment. *Weed Research U. K.*, 4: 301 – 309.
- Panizzi L., Flamini G., Cioni P. L., Morelli I. (1993).** Composition and antimicrobial properties of essential oils of four mediterranean lamiaceae. *J. of Ethnopharmacology*, 39: 167 – 170.
- Papageorgio V. (1980).** GLC-MS Computer Analysis of the Essential oil of *Thymus capitatus*. *Planta Medica Supplement*, 29 – 33.

Paster M., Menashera M., Ravid U., Juven B. (1995). Antifungal activity of Oregano and Thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Protection*, 58: 84 – 85.

Paster N., Menasherov M., Ravid U., Juven B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. of Food Protection*, 58: 81 – 85.

Pedersen J. A. (2000). Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28 : 229 – 253.

Pérez-Alonso M. J., Velasco-Negueruela A., Lopez Saez J. A. (1993). The volatiles of two *Calamintha* species growing in Spain, *Calamintha sylvatica* Bromf. and *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Acta Horticulturae*, 333 : 255 – 260.

Perrucci S., Mancianti F., Cioni P. L., Flamini G., Morelli I., Macchioni G. (1994). In vitro antifungal activity of essential oils against some isolated of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Planta Medica*, 60: 184 - 187.

Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004). Microbiologie. *Dunod*, pp 164, 779 – 780.

Pessini G. L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D. A. G. (2003). Antibacterial activity of Extracts and neolignans from Piper Regnellii (Miq.) C. DC. Var. pallescens (C. DC.) yunk. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98.

Pharmacopée Européenne (2002). Méthodes physiques et physico-chimiques. Pp 48.

Pibiri M. C., Seigniez C. et al. (2001). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT*, Lausanne, LESO, EPFL.

Piccaglia R., Marotti M., Giovanelli E., Deans S. G., Eaglesham E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial crops and Products*, 2: 47-50.

Pignatti S. (1982). Flora d'Italia. Vol. II, *Edagricole*.

Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance. J.*, 17: 15 - 19.

Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Uberegger E., Conte L. S. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *Salvia fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *Origanum indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Science of Food and Agriculture.*, 82: 1645 – 1651.

Proença Da Cunha A., Roques O. R., Cardoso Do Vale J. (1976). Estudo cromatografico e quimico do oleo essencial de *Mentha pulegium* L. de Angola. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, 1: 23 – 36.

- Quézel P., Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. *Ed. CNRS*, Paris.
- Rasooli I., Mirmostafa S. A. (2002).** Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*, 73: 244 – 250.
- Rasooli I., Abyaneh M. R. (2004).** Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15: 479 - 483.
- Raybaud E. (1985).** Critique de la systématique des menthes. *Thèse de Doctorat d'état*, faculté de pharmacie, Marseille.
- Rechinger K. H. (1982).** Flora Iranica. *Ed. By Rechinger K. H., Akademische Druck-u. Verlagsanstalt*, Graz Austria, vol. 150, pp 483 – 485.
- Reddy M. V. B., Angers P., Gosselin A., Arul J. (1998).** Characterisation and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47: 1515 – 1520.
- Regnier B. (2005).** Les infections à l'hôpital. *Pour la Science*, pp 74 – 80.
- Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi R., Tantaoui-Elaraki A. (1993).** Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. of Essential Oil Research*, 5 : 179 – 184.
- Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Ettayebi R. (1993).** Inhibition of antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and ethanol in liquid medium. *J. Pharm. Belg.*, 48 : 352 – 356.
- Remmal A., Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. (2001).** Dispersion des huiles essentielles en milieux aqueux sans détergent : Application à l'activité antibactérienne. *Premier congrès de l'AMPEPM : Plantes Médicinales : Biologie et Santé*, Kenitra : Morocco.
- Rezzi S., Bighelli A., Mouillot D., Casanova J. (2001).** Chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. *Flavour and Fragrance J.*, 16: 379 - 383.
- Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Proença da Cunha A., Casanova J. (2001).** Intraspecific Chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 179 - 188.
- Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. (2002).** Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C NMR spectroscopy: application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl. Spectro.*, 56: 312 - 317.
- Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. (2005).** Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp *laricio* from Corsica. *Ind Crops Production*, 21: 65 - 69.
- Richard H. (1974).** Quelques espèces et aromates et leurs huiles essentielles. *Serie synthèse bibliographiques, C. D. U. P. A.*, pp 2.

Richard H., Benjlali B., Banquour N., Baritoux O. (1985). Etude de diverses huiles essentielles de thym de Maroc. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 18: 105 – 110.

Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J. (1996). Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and subsp. *glandulosa* from Corsica (France). *J. of Essential Oil Research*, 8: 363 – 366.

Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J. (1998). ¹³NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Flavour and Fragrance J.*, 13: 154 – 158.

Rossi P. G. (2003). Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles. *Université de Corse*, p 2.

Ruberto G., Biondi D., Ciana P., Geraci (1993). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance J.*, 8: 331 – 337.

Ruberto G., Baratta M. T (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipids model systems. *Food Chemistry*, 69: 167 – 174.

Ruberto G., Barratta M. T. , Sari M., Kaâbeche M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf.. *Flavour and Fragrance J.*, 17: 251-254.

Rumbaugh K. P., Griswoldt R. T., Hamood N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patterns with tracheal urinary tract andinfection variation in virulence factors and virulence. *J. of Hôspital Infection*. 43: 211 – 218.

Rustaiyan A., Lajevardi T., Rabbani M., Yari M., Masoudi Sh. (1999). Chemical constituents of the essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. From Iran. *Daru*, 7: 27 – 28.

Rustaiyan A., Jamzad M., Masoudi S., Ameri N. (2006). Volatile constituents of *Nepeta heliotropifolia* Lam., *Mentha mozaffarianii* Jamzad and *Ziziphora persica* Bunge. three Labiateae herbs growing wild in Iran. *J. of Essential Oil Research*, 18: 348 – 351.

Saez F. (1998). Variability in essential oils from populations of *Thymus hyemalis* Lange in southeasten Spain. *J. of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 5: 65 – 76.

Sağdaç O. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 36: 467 – 473.

Sajjadi S. E. (2003). Aromatic biodiversity among three endemic *Thymus* species of Iran. In: Biodiversity-Biomolecular aspects of biodiversity and Innovative utilization (Sener B., ed.). *Kluwer Academic/Plenum Pub.*, New York, pp 315 – 317.

Sajjadi S. E., Khatamsaz M. (2003). Composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak. ssp. *Lancifolius* (Celak) Jalas. *J. of Essential Oil Research*, 15: 34 – 34.

- Salehi P., Sonboli A., Eftekhar F., Nejad-Ebrahimi S., Yousefzadi M. (2005).** Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinipodioides* subsp. *rigida* (Boiss.) Rech. F. from Iran. *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 1892 – 1896.
- Salgueiro L. R., Vila R., Tomi F., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Cañigüeral S., Casanova J., Proença Da Cunha A., Adzet T. (1997).** Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *J. of Phytochemistry*, 45: 307 – 311.
- Şarer E., Solakel Pañçali S. (1998).** Composition of the essential oil from *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req) P. W. Ball. *Flavour and Fragrance J.*, 13 : 31 – 32.
- Sari M. (1999).** Etude ethnobotanique et pharmacopée traditionnelle dans le Tell Sétifien (Algérie). *Thèse de Magister*, université de Sétif.
- Sari M., Biondi M. D., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M. D., Bisignano G., Saija A., Daquino C, Ruberto G. (2006).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf.. *Flavour and Fragrance J.*, 21: 890 – 898.
- Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. (2006).** Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77: 279 – 285.
- Schirner M. (2004).** Huiles essentielles : Description de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. *Guy Trédaniel*, pp 23.
- Schulz H., Özkan G., Baranska M., Krüger H., Özcan M. (2005).** Characterisation of essential oils plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational spectroscopy*, 39: 249 – 256.
- Schwartz K., Ernst M., Ternes W. (1996).** Evaluation of antioxidant constituents from thyme. *J. Sci. Food Agric.*, 70: 217 – 223.
- Senatore F., Arnold N. A., Piozzi F. (2004).** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. Var. *simplicifolia* Boiss. Growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr.*, 1052 : 237 – 240.
- Sezik E., Tümen G. (1986) in Özel M. Z., Göğüş F., Hamilton J. F., Lewis A. C. (2005).** Analysis of volatile components from *Ziziphora taurica* subsp. *taurica* by steam distillation, superheated-water extraction, and direct thermal desorption with GCXGC-TOFMS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382: 115 – 119.
- Sezik E., Tümen G., Baser K. H. C. (1991).** *Ziziphora tenuior* L., a new source of pulegone. *Flavour and Fragrance J.*, 6: 101 – 103.
- Shapiro S., Meier A., Guggenheim B. (1994).** The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology*, 9: 202 – 208.
- Shu C. K., Lawrence B. M. (1997).** Reasons for the variation in composition of some commercial essential oils. In *S. J. Risch & C. T. HO (Eds.)*, ACS symposium series: vol. 660. Spices, flavor chemistry and antioxidant properties, pp 138 – 159.

- Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y., Guolin Z. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. of Ethnopharmacology*, 96: 151 – 158.
- Sijelmassi A. (1991).** Les plantes médicinales du Maroc. 2^{ème} éd. *Le fennec*.
- Sijelmassi A. (1993).** Les plantes médicinales du Maroc. 3^{ème} Ed. *Le Fennec*, Casablanca.
- Silic C. (1979).** Monographie der gattungen *Satureja* L., *Calamintha* Miller., *Micromeria* Benth., *Acinos* Miller. und *Clinopodium* L. in der Flora Jugoslaviens. *Zemaljski Muzej Bih*, Sarajevo.
- Simeon de Buochberg M. (1976).** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. et de ses constituants. *Thèse de Doctorat*, Montpellier, France.
- Simonpoli P. (1993).** In : Arburi, arbce, arbigliule : Savoirs populaires sur les plantes de Corse. Ed. *Parc Naturel Régional de la Corse*, Ajaccio, pp 72 – 74.
- Singh J., Tripathi N. N. (1999).** Inhibition of storage fungi of blackgram (*Vigna mungo* L.) by some essential oils. *Flavour and Fragrance J.*, 14: 1 – 4.
- Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1995).** Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2384 – 2388.
- Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G., Johnson C. B. (1999).** A chemosystematic investigation on the mono and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *J. of Phytochemistry*, 52 : 649 – 657.
- Skrubs G. (1972).** Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. *Flavour Ind.*, 3: 566 – 571.
- Slavkovska V., Jancic R., Bojovic S., Milosavljevic S., Djokovic D. (2001).** Variability of essential oils of *Satureja motana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. Ex. Heuff. From the central part of the Balkan peninsula. *J. of Phytochemistry*, 57: 71 – 76.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (1998).** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118 – 122.
- Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H. A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., Sahin F. (2004).** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extract of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627 – 634.
- Souleles C., Argyriadou N., Philianos S. (1987).** Constituents of essential oil of *Calamintha nepeta*. *J. Nat. Prod.*, 50: 510 – 522.
- Srinivas R. (1986).** Atlas of essential oils. *Published by author Bronx*, New york.

Srivastava M., Saxena A., Baby P. (1999). GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copticum* Benth & Hook. *Acta Alimentaria*, 28: 291-295.

Stahl-Biskup E. (1991). The chemical composition of Thymus oils: A review of the literature 1960 – 1989. *J. of Essential Oil Research*, 3: 61 – 82.

Stahl-Biskup E. (2002). Essential oil chemistry of the genus Thymus – a global view. In : Thyme – The genus Thymus.(Stahl-Biskup E. and Saez F., eds.), *Taylor & Francis Publishers*, London, pp 75 – 124.

Svoboda K. P., Deans S. G. (1995). Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. *Acta Horticult.*, 390: 203 – 209.

Tam N.T., An H.L., Bighelli A., Casanova J. (1998). Identification of the Components of *Illicium griffithii* Hook. F. et Thoms. Essential oil from vietnam using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. of Essential Oil Research*, 10: 433 - 435.

Tam N.T., An H.L., Bighelli A., Muselli A., Casanova J. (2005). Advances in the chemical composition of essential oils from *Illicium griffithii* Hook. F. et Thoms. from Vietnam. *J. of Essential Oil Research*, 17 : 79 - 81.

Teixeira Duarte M. C., Mara Figueira G., Sartoratto A., Rehder V. L. G., Delarmelina C. (2005). Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. of Ethnopharmacology*, 97: 305 – 311.

Ternes W., Gronemeyer H., Schwarz K. (1995). Determination of p-cymene-2,3-diol, thymol and carvacrol in different food stuffs. *Z. Lebnsnm. Unters. Forsch.*, 201 : 544 – 547.

Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J.(1995). Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.*, 1: 25 - 34.

Tomi F., Casanova J., Nianga M. (1996). Identification of the components of the seed Oil of *Xylopia aethiopica* from Guinea using ¹³C-NMR spectroscopy. *J. of Essential Oil Research*, 8 : 429 - 431.

Trabut L. (1935). Flore du Nord de l’Afrique : Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l’Afrique. *Collection du Centenaire de l’Algérie*, Alger.

Tucker A. O., Maciarello M. J. (1991). The essential oil of *Calamintha arkansana* (Nutt.) Shinnery. *J. of Essential Oil Research*, 3: 125 - 126.

Tumen G., Baser K. H. C., Demirci B., Ermin N. (1998). The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourili* Velen. *Flavour and Fragrance J.*, 13: 65 – 67.

Tutin T. G. (2001). Flora europaea website. *Jardin Botanique Royal Edimbourg*.

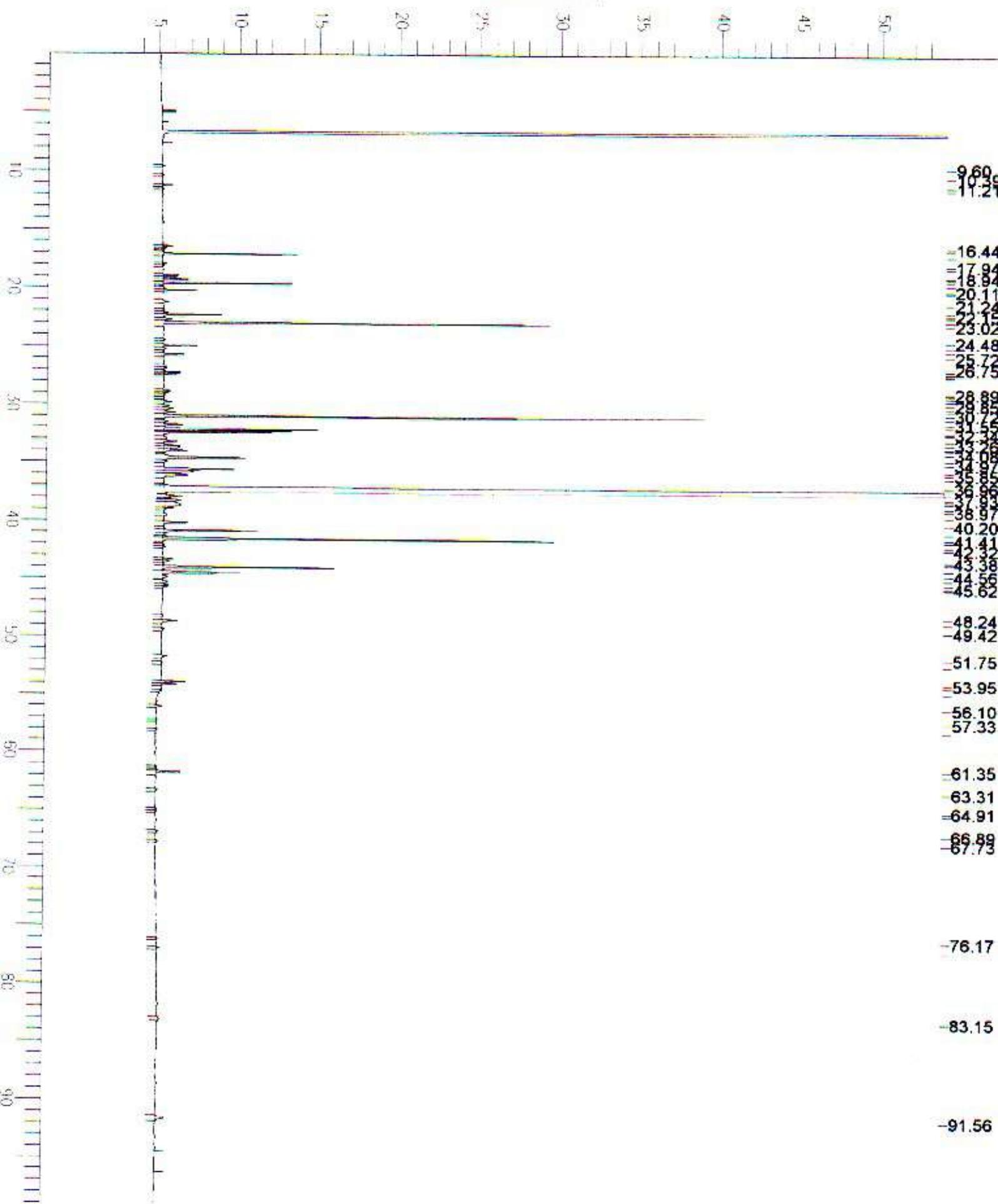
- Tzakou O., Verykokidou E., Roussis V., Chinou I. (1998).** Chemical composition and antibacterial properties of *Thymus longicaulis* subsp. *Chaoubardii* oils: Three chemotypes in the same population. *J. of Essential Oil Research*, 10: 97 – 99.
- Ultee A., Kets E. P. W., Smid E., J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the Food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4606 – 4610.
- Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol Is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1561 – 1568.
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001).** Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 584 – 640.
- Velasco-Neguerela A., Mata Rico M. (1986).** The volatile oil of *Ziziphora hispanica* L.. *Flavour and Fragrance J.*, 1: 111 – 113.
- Velasco-Negueruela A, Perez-Alonso M., Esteban J. L., Garcia Vallejo M. C., Zygadlo J. A., Guzman C. A, Ariza-Espinar L. (1996).** Essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Mentha* aff. *suaveolens* Ehrh. grown in Cordoba Argentina. *J. of Essential oil Research*, 8: 81 – 84.
- Velasco-Negueruela A, Perez-Alonso M., Mata Rico M. (1987).** Esssential oils of Iberian labiatae having pulégone as a fundamental constituent. *Anal. Bromatol*, 39: 357 – 372.
- Vernin G., Boniface C., Metzger J., Ghiglione C., Hammoud A., Suon K. N., Fraisse D., Párkányi C. (1888).** GC-MS-SPECMA Bank Analysis of *Juniperus communis* Needles and Berries. *J of phytochemistry*, 27: 1061 – 1064.
- Vernin G., Petitjean M., Poite J. C., Metzger J., Fraisse D., Suon K. N. (1986).** Mass Spectra and Kováts Indices Databank of volatile Aroma Compounds. *Chap. VII in Computer Aids to Chemistry*, Vernin G. and Chanon M. ed., Horwood E., Pub., Chilchester, pp 294 – 333.
- Vila R., Freixa B., Canigual S., Adzet T., Tomas X., Molins J. (1995).** Composition and study of the variability of the essential oil of *Thymus funkii* Cosson. *Flavour and Fragrance J.*, 10: 379 – 383.
- Vokou D., Kokkini S., Bessiere J. M. (1993).** Geographic variation of Greek Oregano (*O. vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem. System. Ecol.*, 21: 287 – 295.
- Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartolo R. G. (2003).** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria. *J. of Applied Microbiology*, 94: 240 – 247.
- Wehmer C. (1931).** Die pflanzenstoffe: Botanisch-systematisch bearbeitet. *Verlag Von Gustav Fisher*, pp 879 – 880.

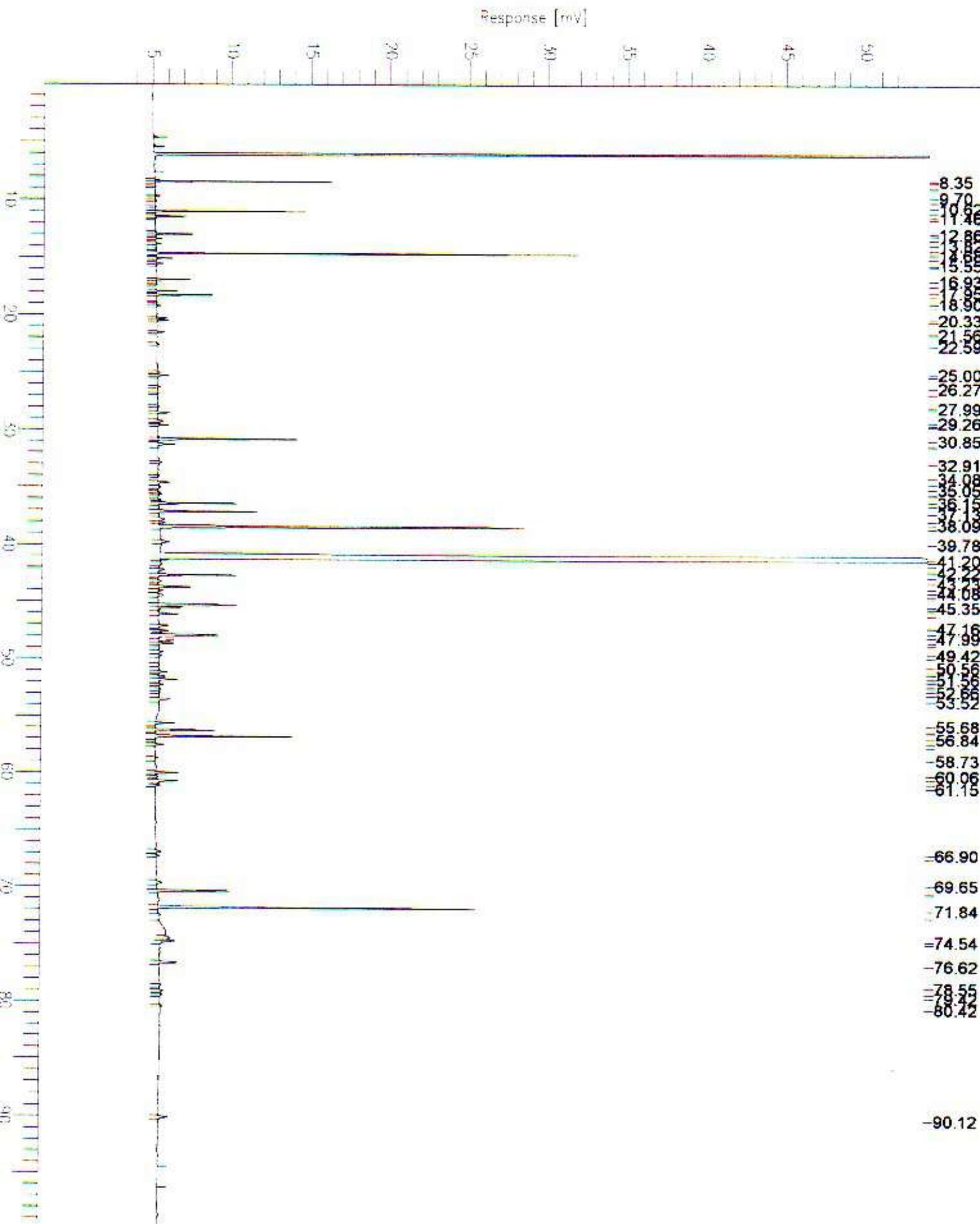
- Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. (1996).** New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil, *Liebigs Ann.*, 1195-1199.
- Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. (1997).** New *cis*-Eudesm-6-ene Derivatives from Vetiver Oil. *Liebigs Ann.*, 1783 - 1787.
- Weyerstahl P., Schlicht V. (1997).** Synthesis of *rac*-Bisabola-3(15), 10-dien-7-ol. *Liebigs Ann.*, 1789 - 1790.
- Weyerstahl P., Marschall H., Degenkolb P., Lebada P. (1999).** Synthesis of *rac*-Opposita-4(15),7(11)-dien-12-al. *Eur. J. Org. Chem.*, 675 - 678.
- Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. (2000).** 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a Sesquiterpene with a Novel Skeleton, and Other Sesquiterpenes from Haitian Vetiver Oil. *Flavour and Fragrance J.*, 15: 61 - 83.
- Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. (2000).** Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil. *Flavour and Fragrance J.*, 15: 153 - 173.
- Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H. (2000).** Constituents of Haitian Vetiver Oil. *Flavour and Fragrance J.*, 15: 395 - 412.
- Wichtl M., Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique, officinale, science et thérapeutique. *Ed. Tec & Doc.*
- Wilkinson M., Neuhaus D. (1989).** The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. *VCH*, New York.
- Wilkinson J. M., Hipwell M. Ryan T., Cavanagh H. M. A. (2003).** Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 76 – 81.
- Zargari A. (1995).** Iranian Medicinal Plants. *Tehran University Press*, Tehran, vol. 4, pp 103 – 104.
- Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H. Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997).** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. of Ethnopharmacology*, 58: 45 – 54.
- Zwaving J. H., Smith D. (1971).** Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *J. of Phytochemistry*, 10: 1951 – 1953.

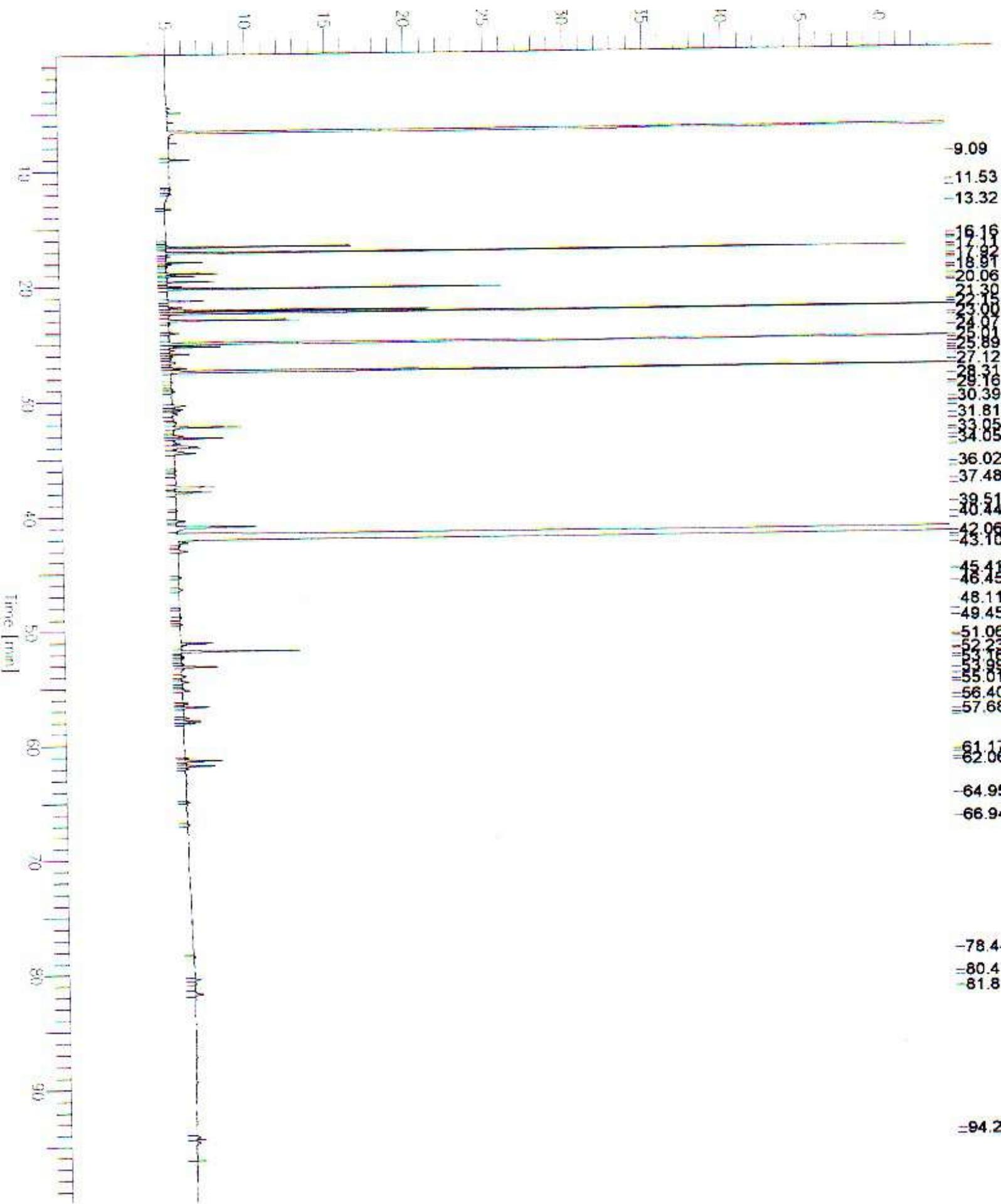
Annexes

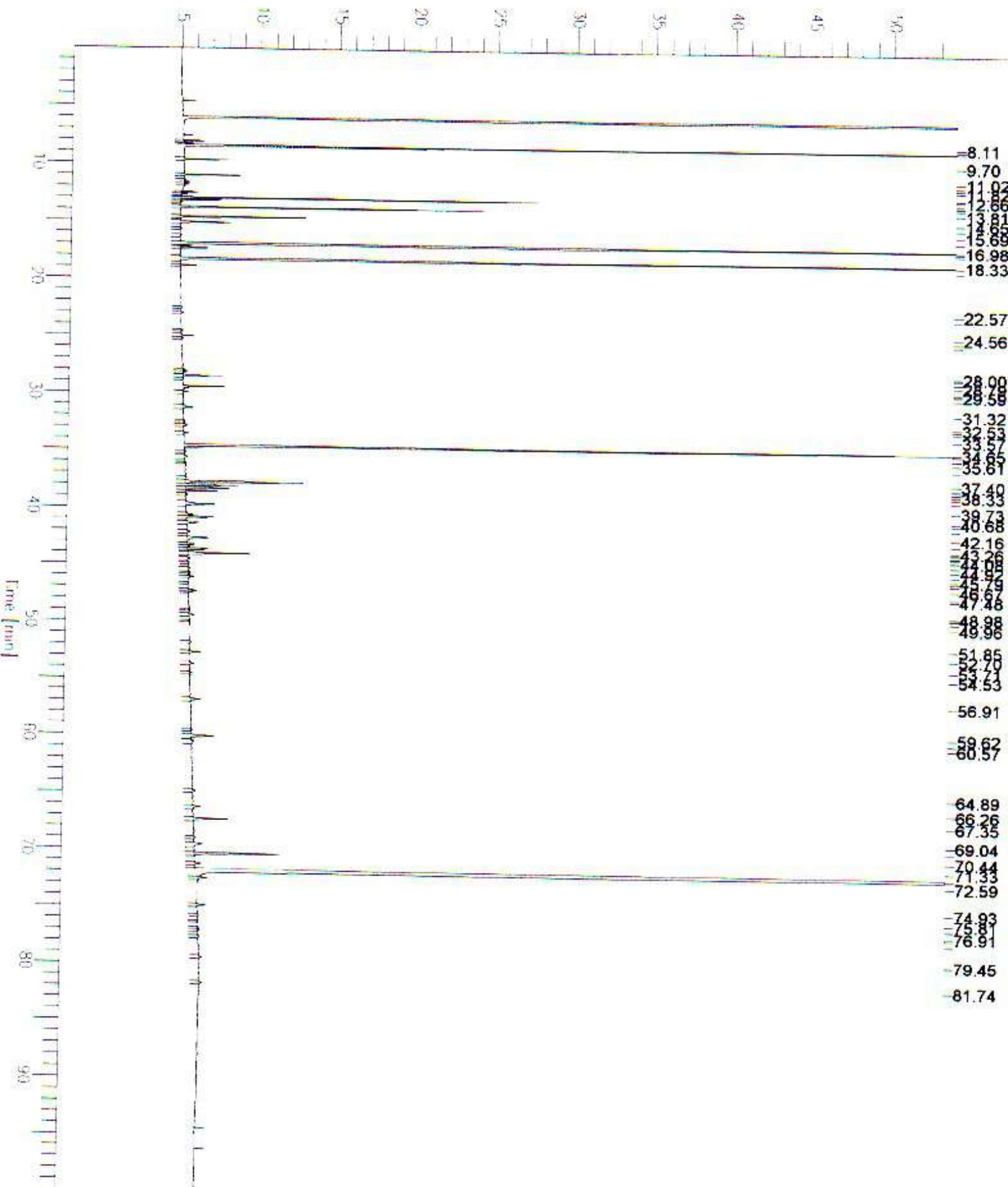
Annexes

Response [mV]

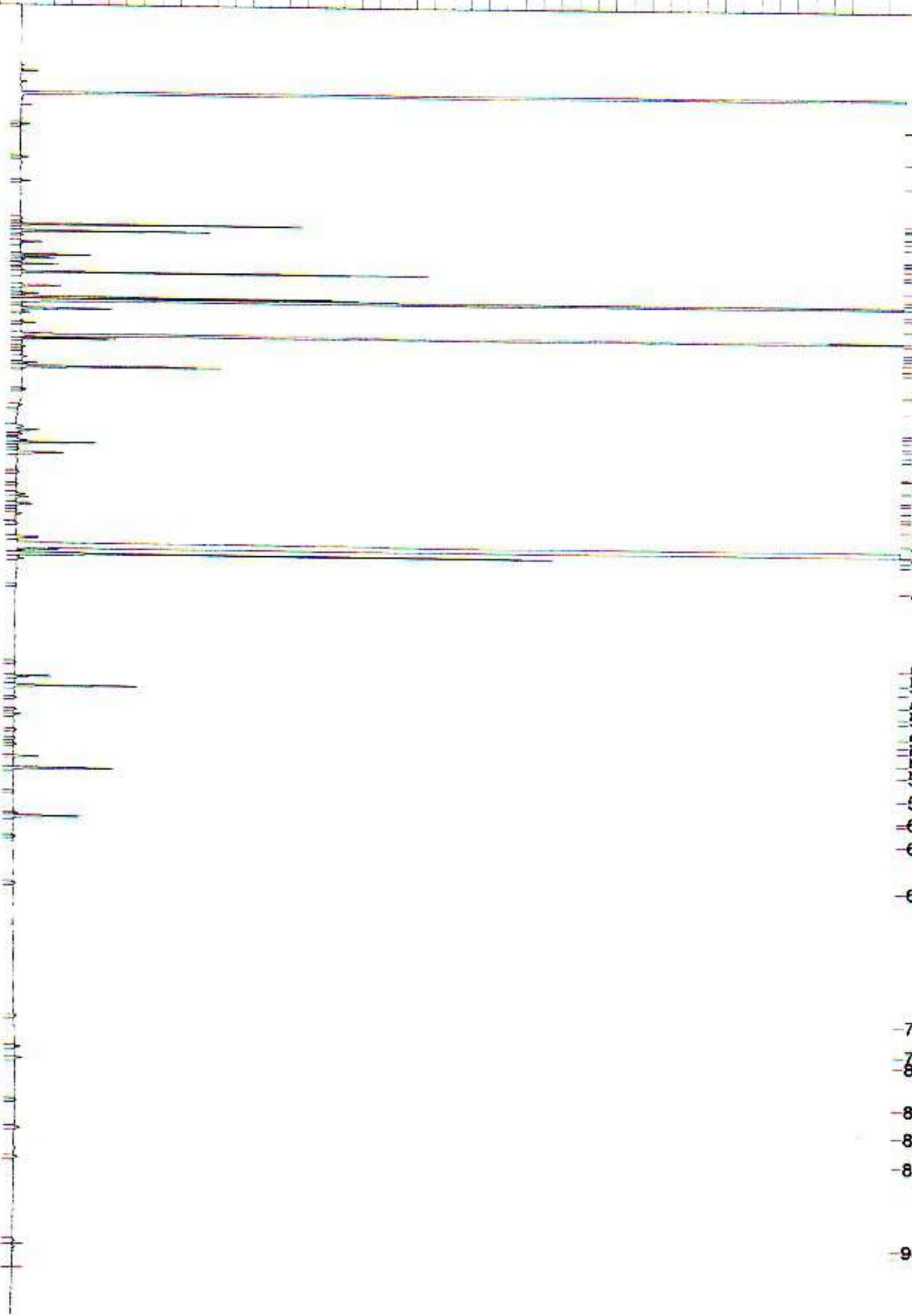


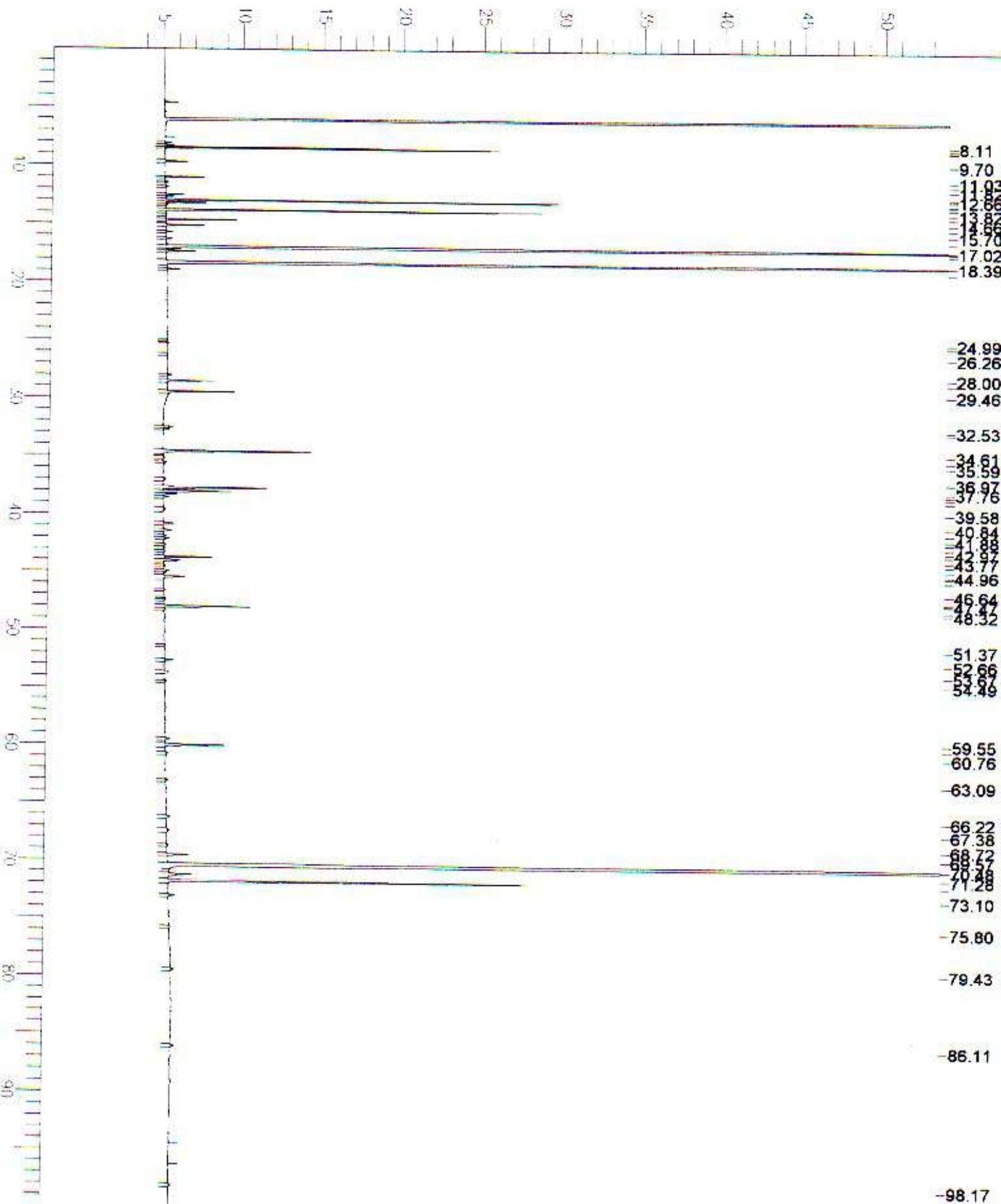


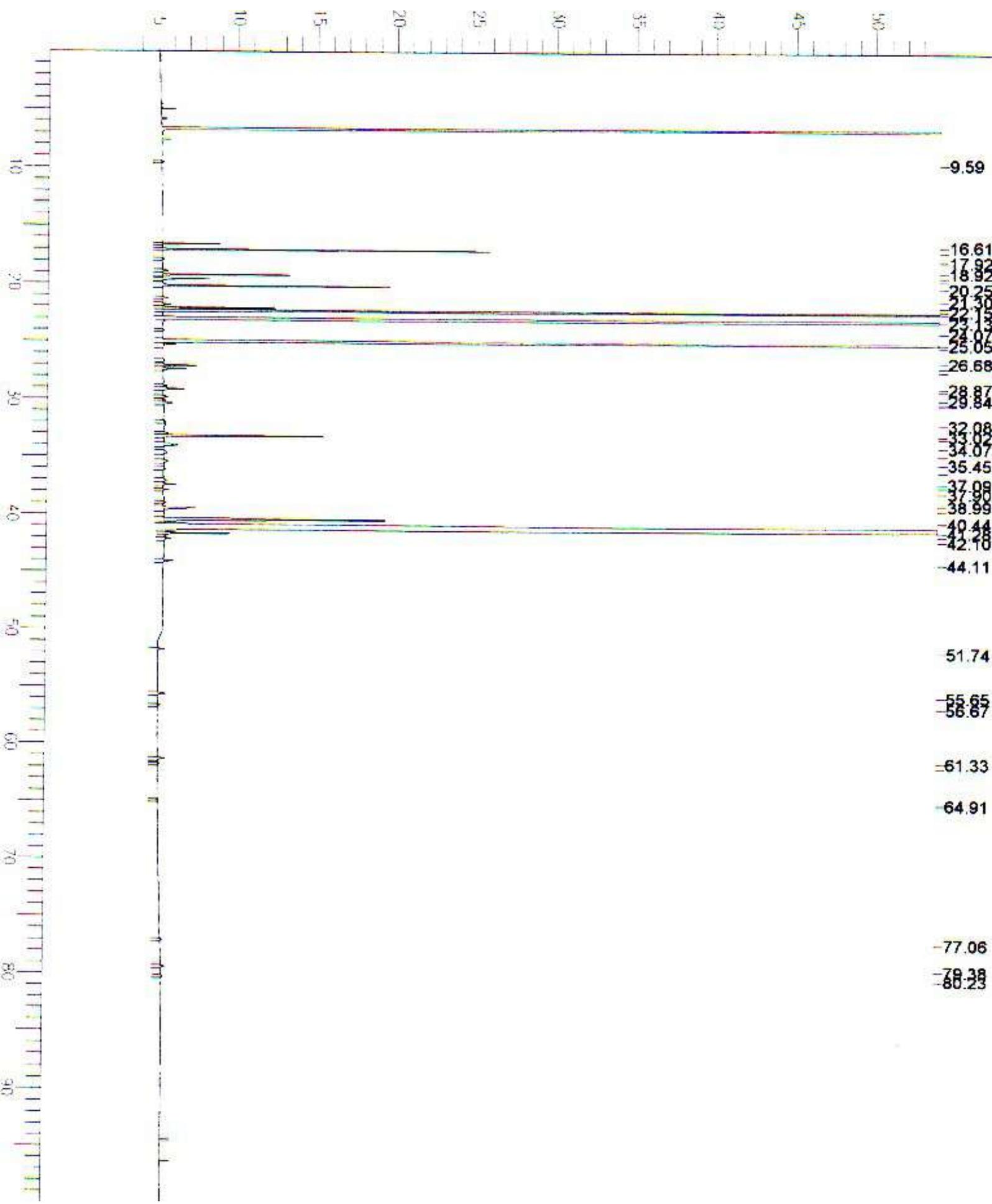


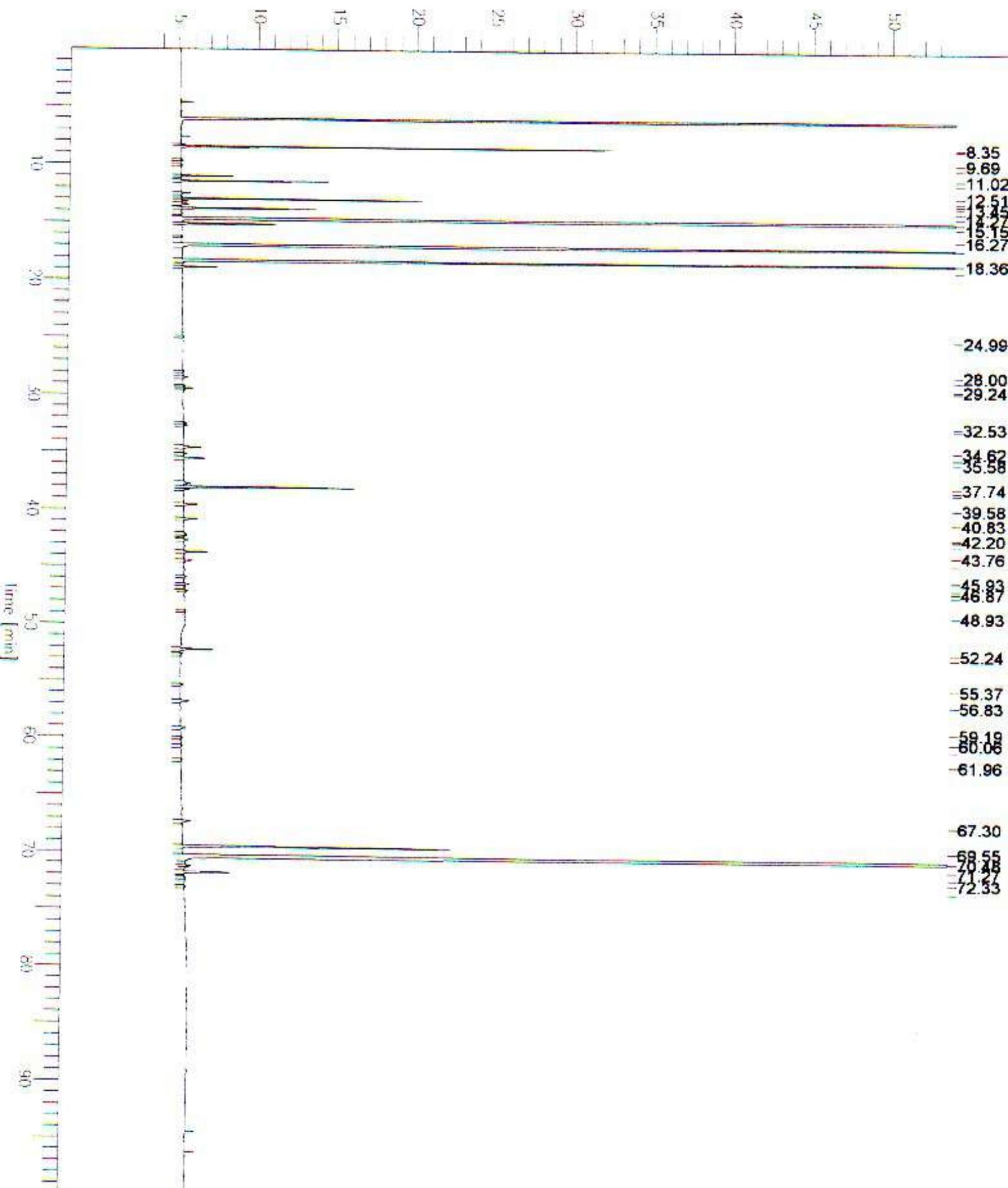


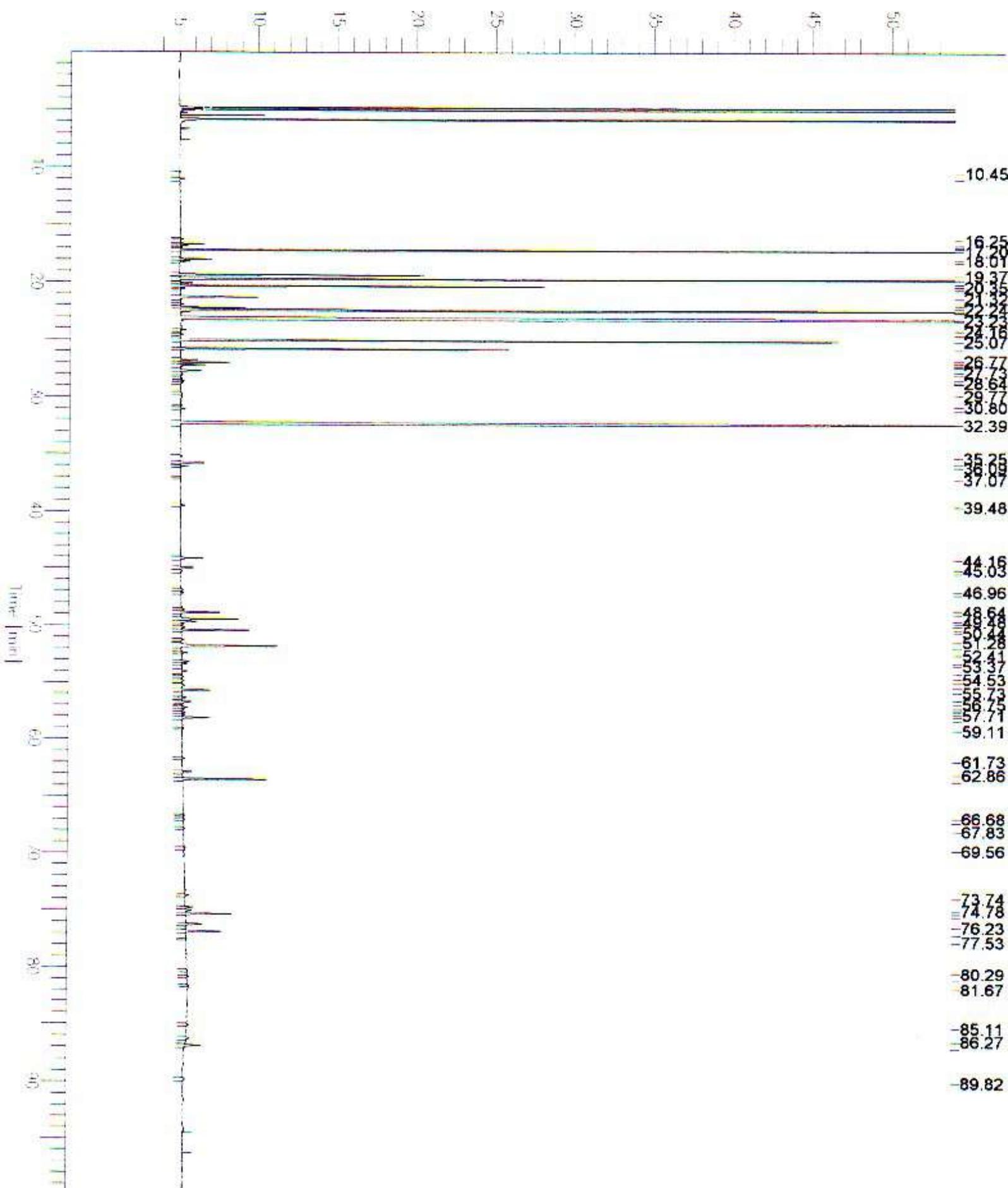
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

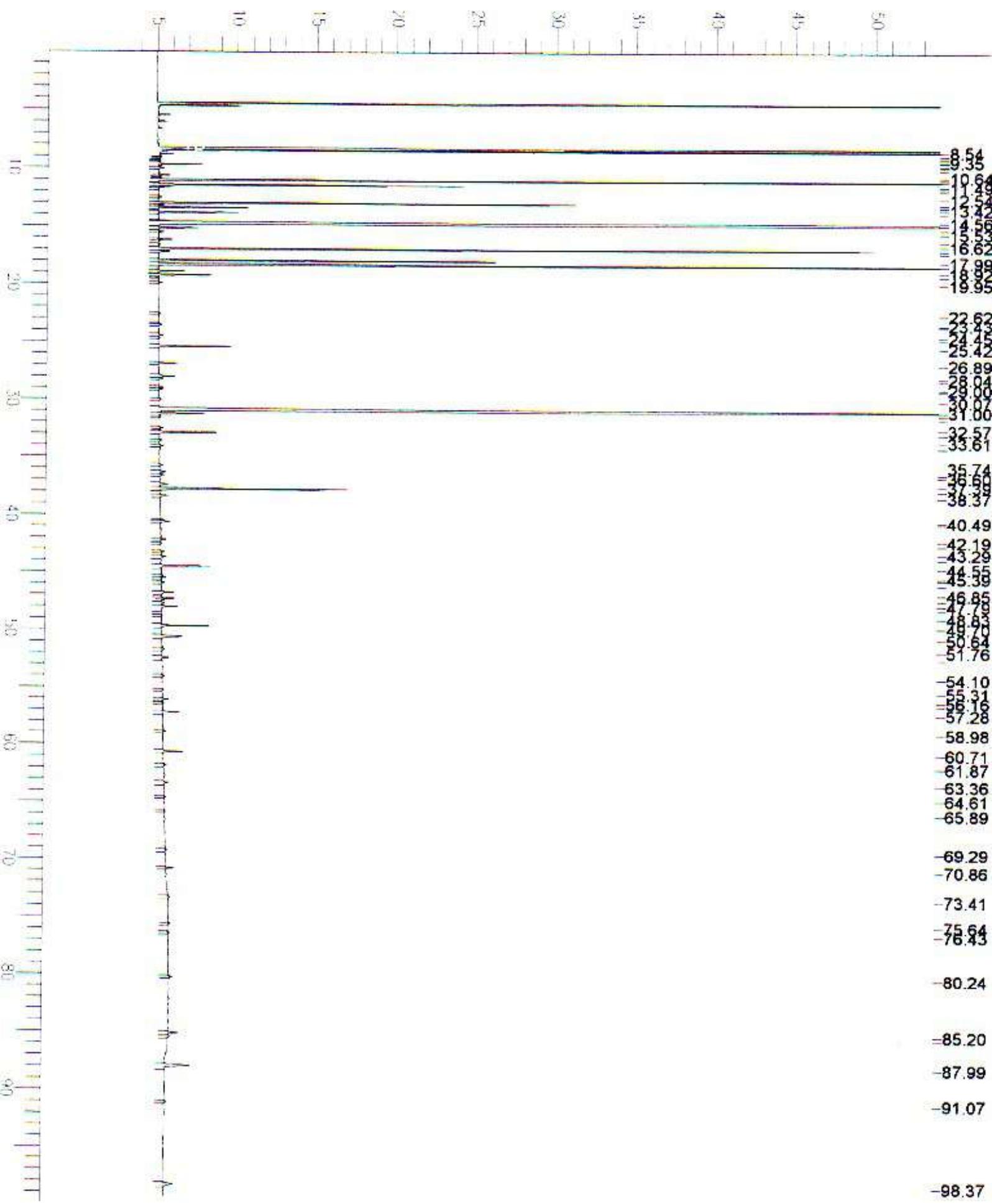


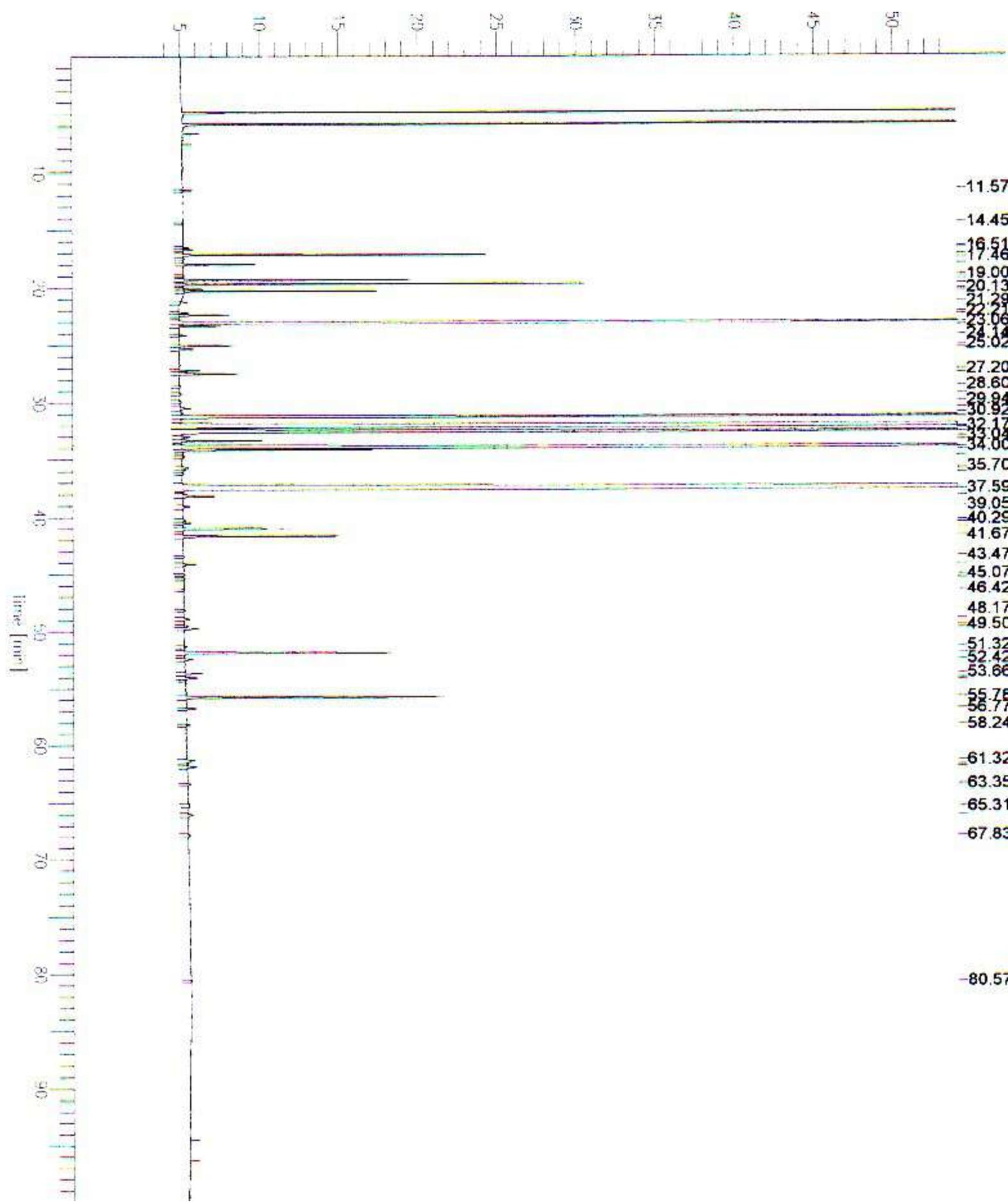


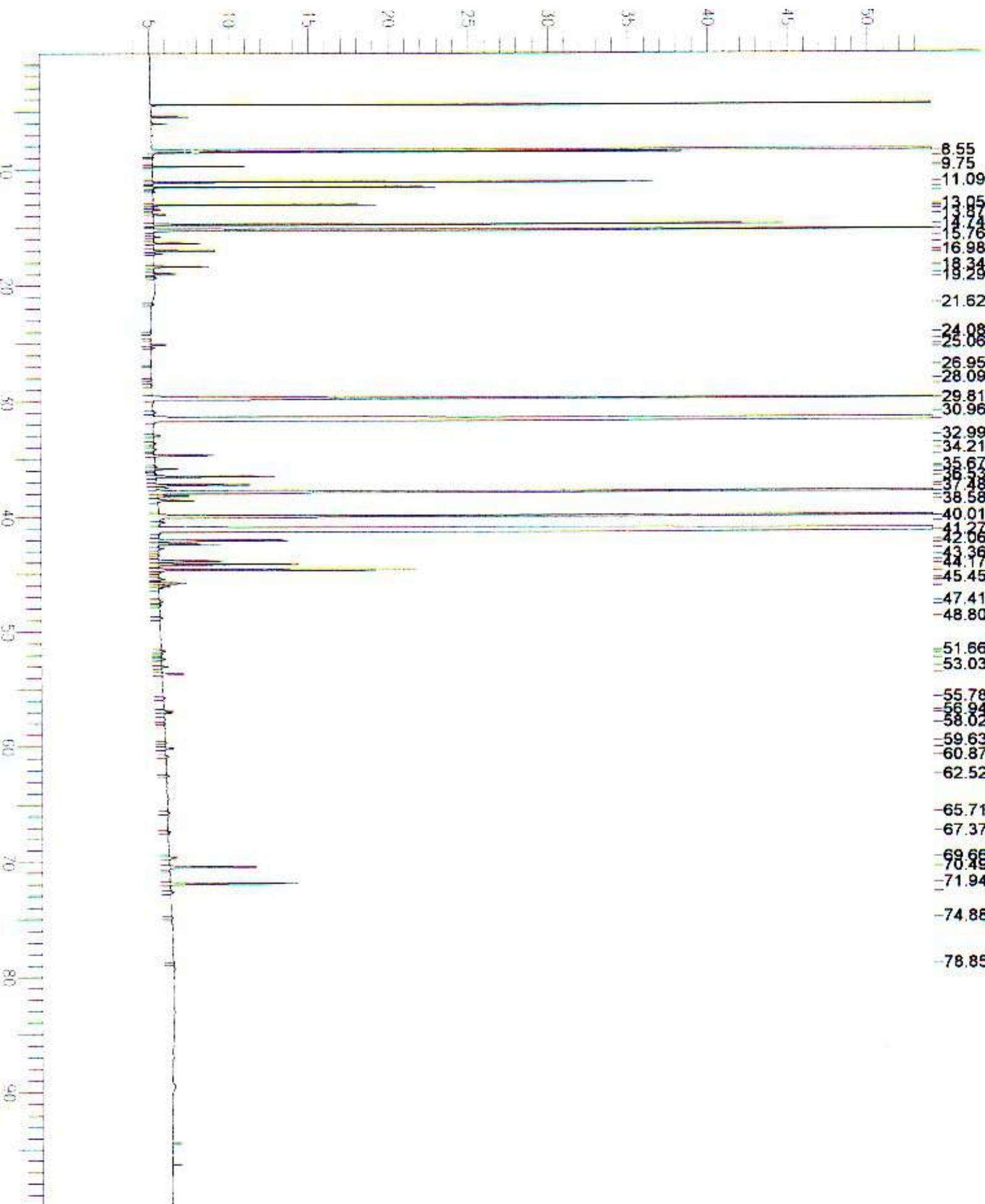












Publications

Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria.

Chahrazed Bekhechi, Fewzia Atik Bekkara and Djamel Eddine Abdelouahid,
Laboratoire des produits naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, BP 119, Imma Tlemcen.

Félix Tomi* and Joseph Casanova,
Université de Corse, UMR CNRS 6134, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France.

Abstract

The composition of the essential oil isolated by hydrodistillation from the aerial parts of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., growing wild in Algeria (Tlemcen province) was determined by GC(RI), GC/MS and ¹³C-NMR. The oil was characterized by a high content of carvacrol (67–69%) and its antibacterial activity was tested against nine bacterial strains.

Key Word Index

Thymus fontanesii, essential oil composition, carvacrol, antimicrobial activity.

Introduction

The genus *Thymus* (Lamiaceae family) is constituted by more than 100 species, most of them having been extensively investigated (1). Several species grow wild in Algeria: *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., *T. capitatus* L., *T. ciliatus* (Desf.) Benth., *T. commutatus* Ball., *T. dreatensis* Batt., *T. glandulosus* Lag., *T. guyonii* de Noé, *T. hirtus* Willd., *T. lanceolatus* Desf., *T. numidicus* Poiret, *T. pallidus* Coss. and *T. fontanesii* Boiss. et Reut. (2).

Thymus fontanesii Boiss. et Reut., endemic to Algeria and Tunisia, spontaneously grows on scrublands, giving during blossom white flowers (2). The aerial parts of plants harvested in Setif and Constantine provinces, produced by hydrodistillation an essential oil whose composition was dominated by thymol, γ -terpinene and p-cymene (3,4).

As part of our on-going work on the characterization of aromatic plants from Algeria through the composition of their essential oils (5,6), we investigated *T. fontanesii*. Five oil samples were analyzed by combination of chromatographic and spectroscopic techniques, GC (Retention Indices), GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy and its antibacterial activity tested against Gram (+) and Gram (-) bacteria.

Experimental

Plant material and essential oil isolation: A specimen has been deposited in the Herbarium of the Laboratory of Phytoecology and Botany, University Abou Bekr Belkaid,

Tlemcen, Algeria. Aerial parts of *T. fontanesii* were collected during June 2004, in full blossom, in the Province of Tlemcen in four locations: Sidi-snoussi, Remchi, Sebdou et Sebâa-chiouki and again, during June 2005, in the last location. Fresh aerial parts (200 g) were submitted to water-distillation, during 3 h, using a Clevenger-type apparatus. The oil was dried over anhydrous Na₂SO₄ and stored in the dark, at 4°C. All the oil samples were analyzed by GC (Retention Indices) and ¹³C-NMR spectroscopy, sample Sebâa-chiouki 2005 was submitted to GC/MS analysis.

GC analysis: GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with two Flame Ionization Detectors (FID), and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 μ m), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°–220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min); injector temperature: 250°C (injection mode: split 1/60); detector temperature: 250°C; carrier gas: He (0.8 mL/min). The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentage obtained by peak area normalization, without using correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation (« Target Compounds » software from Perkin Elmer).

GC/MS analysis: The essential oils were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thick-

*Address for correspondence

Received: July 2006

Revised: October 2006

Accepted: November 2006

Table I. Percentage composition of *Thymus fontanesii* oil samples from Algeria

Components/samples	Rla	Rlp	SC5	SC4	R	S	SS	Identification mode
α -thujene	920	1026	1.3	0.6	1.3	1.3	1.3	RI, MS, ¹³ C-NMR
α -pinene	929	1025	2.9	2.6	2.7	2.5	3.0	RI, MS, ¹³ C-NMR
camphene	941	1068	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	RI, MS
1-octen-3-ol	959	1446	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	RI, MS
3-octanone	960	1253	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	RI, MS
β -pinene	968	1111	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS
3-octanol	975	1389	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
myrcene	978	1161	1.3	1.2	1.5	1.2	1.4	RI, MS, ¹³ C-NMR
α -phellandrene	994	1164	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS
δ -3-carene	1003	1147	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
α -terpinene	1007	1181	1.0	1.1	1.4	1.1	1.1	RI, MS, ¹³ C-NMR
p-cymene	1011	1272	8.5	6.1	6.6	9.1	7.2	RI, MS, ¹³ C-NMR
limonene*	1020	1202	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	RI, MS, ¹³ C-NMR
1.8-cineole*	1020	1210	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS
γ -terpinene	1047	1246	5.8	7.9	9.6	6.0	6.9	RI, MS, ¹³ C-NMR
<i>trans</i> -sabinene hydrate	1050	1461	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	SM, IR
terpinolene	1076	1281	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	SM, IR
linalool	1081	1543	2.8	4.0	3.4	3.1	3.0	RI, MS, ¹³ C-NMR
borneol	1147	1700	0.7	0.4	0.3	0.4	0.4	RI, MS
terpinen-4-ol	1159	1598	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	RI, MS
<i>trans</i> -dihydrocarvone	1172	1605	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	RI, MS
<i>cis</i> -dihydrocarvone	1178	1625	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	RI, MS
thymol	1263	2187	0.5	0.6	0.7	0.6	0.6	RI, MS, ¹³ C-NMR
carvacrol	1275	2218	68.3	69.2	66.7	68.4	69.5	RI, MS, ¹³ C-NMR
β -caryophyllene	1417	1593	0.8	0.6	0.9	0.7	0.8	RI, MS, ¹³ C-NMR
<i>allo</i> -aromadendrene	1449	1611	tr	tr	tr	tr	tr	RI, MS
δ -cadinene	1512	1755	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
caryophyllene oxide	1569	1986	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	RI, MS
total (%)			97.3	97.5	98.1	97.2	98.4	
Yield (% w:w)			5.20	5.25	5.46	5.25	5.32	

SC5 / SC4 = Sebâa-chiouki 2005/2004. R = Remchi. S = Sebdu. SS = Sidi-snoussi; Rla : RI on apolar column; Rlp : RI on polar column; Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1) except for compounds with an asterisk* for which percentages are given on polar column (BP-20).

ness 0.25 μ m), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, He at 1 mL/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 μ L; injector temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60°–230°C at 2°C/min and then held isothermal (45 min); Ion source temperature, 150°C; energy ionisation, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

¹³C-NMR analysis : All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ¹³C-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width = 4 μ s (flip angle 45°); acquisition time = 2.7 s for 128K data table with a spectral width of 25000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution = 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (around 40 mg of the oil in 0.5 mL of CDCl₃).

Identification of components : Identification of the individual components was based i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds and literature

data (7); (ii) on computer matching with mass spectral libraries (8–9) and comparison with spectra of authentic samples or literature data (7,10), iii) on comparison of the chemical shifts of carbons in the ¹³C-NMR spectrum of the mixture with those of reference spectra compiled in our spectral library with the help of a laboratory produced software (11). This technique allows the identification of individual components to a content of 0.5% without any previous purification.

Microbial strains: The oil was tested against nine bacteria : - seven Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, ATCC 25922 and *Citrobacter freundii* - two Gram-positive bacteria: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 43866. Some strains were supplied by the Veterinary Centre of Tlemcen (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. aureus*) Others were isolated from clinical sittings and their identification was achieved with API 20 test strips (Biomerieux).

Antimicrobial activity : Antimicrobial tests were carried out using the disc diffusion method (12). The sterile dishes were inoculated using 1000 μ L of a suspension containing

10⁸ CFU/mL of bacteria. Discs of 6 mm in diameter were also impregnated with 3 µL of the oil and placed on the inoculated agar medium. In addition, reference discs without any oil were used for comparison. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h. At the end of the period, the developing inhibition zones were measured and reported (sensitives > 15mm) on the Table II. Studies were performed in triplicate.

Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were determined using direct contact technique in agar medium (12). Serial dilutions of the oils were carried out in Mueller Hinton agar medium. Appropriate volumes of every dilution were added to this medium to produce the required concentration range and a final concentration of Tween 80 at 10% (v/v). The Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were recorded as the lowest concentrations and quantities that inhibited any visible organism growth.

Results and Discussion

The yield of oil obtained from the aerial parts of *Thymus fontanesii* harvested in the Province of Tlemcen (Algeria), calculated on dry material basis, (w:w, mean value of three independent water-distillations), varied slightly from station to station: Sebâa-chiouki = 5.20%, Seb dou = 5.25%, Sidisnoussi = 5.32%, Remchi = 5.46%. The composition of the four samples was quite similar, carvacrol (66.7–69.5%) being by far the main component (Table I). Other constituents, present at appreciable contents, were p-cymene (6.1–9.1%), γ-terpinene (6.0–9.6%), linalool (3.0–4.0%), α-pinene (2.5–3.0%), myrcene (1.2–1.5%), and α-terpinene (1.1–1.4%). Conversely, thymol accounted only for 0.6–0.7% of the composition. Moreover, a sample harvested at Sebâa-chiouki, in June 2005, produced on oil with the same composition (68.3% of carvacrol). Obviously, aerial parts of *T. fontanesii* from the province of Tlemcen produced an oil whose composition differed substantially from that of the oil obtained from the same species harvested in Setif province and Constantine area (Algeria), dominated by thymol (67.8% and 68.2%, respectively). However, thymol and carvacrol chemotypes are the most common of the genus *Thymus* (1).

Using direct contact technique in agar medium, the oil of *T. fontanesii* exhibited significant antibacterial activity against all tested bacteria excepted *Pseudomonas aeruginosa* (Table II). Among Gram-negative bacterial strains, this oil displayed a better activity against *Salmonella typhii* (MIC = 300 µg/mL), *Escherichia coli* (380 µg/mL), *Enterobacter cloacae* (420 µg/mL) and *Citrobacter freundii* (420 µg/mL) than against *Proteus mirabilis* (1 260 µg/mL) and *Klebsiella pneumoniae* (1 450 µg/mL). Concerning Gram positive bacteria, the value of MIC was also very low for *Staphylococcus aureus* (340 µg/mL) and higher for *Listeria monocytogenes* (1 410 µg/mL).

The oils of *T. fontanesii* from Algeria have an antimicrobial activity comparable to the one observed for other carvacrol-rich thyme oils (13,14). More precisely, the values of MICs (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *St. Aureus*, *Kl. Pneumoneae*) were similar to those reported by Simeon de Bouchberg et al (15), for a sample of *Thymus vulgaris* containing carvacrol as major component (80%). Our results confirm that the antimicrobial properties of thyme essential oils are related to their high content of phenolic compounds.

References

1. E. Stahl-Biskup and F. Sâez. *Thyme, the Genus Thymus, Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. pp. 330 Taylor & Francis, London (2002).
2. P. Quezel and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, pp. 804–806, Ed. CNRS, Paris, (1963).
3. A. Ghannadi., S.E. Sajjadi, A. Kabouche and Z. Kabouche, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. – A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa, *Z. Naturforsch.*, **59**, 187–189 (2004)
4. Z. Kabouche, N. Boutaghane, S. Laggoune, Z. Ait-Kaki and K. Benlabed. *Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria*. *Int. J. Aromatherapy*, **15**, 129–133 (2005).
5. L. Bousmaha, F. Atik Bekkara, F. Tomi and J. Casanova. *Advances in the chemical composition of Lavandula dentata L. essential oil from Algeria*. *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 292–295 (2005).
6. L. Bousmaha, J.B. Boti, F. Atik Bekkara, V. Castola and J. Casanova. *Intraspecific chemical variability of the essential oil of Lavandula dentata. L. from Algeria.* *Flav. Fragr. J.*, **21**, 368–372 (2006).
7. D. Joulain and W.A. König. *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. E.B. Verlag: Hamburg, (1998)
8. NIST National Institute of Standards Library, The Perkin Elmer corporation (1997).
9. F.W. McLafferty and D.B. Stauffer, *Wiley registry of mass spectral dat., 6th ed. Mass spectrometry library search system benchtop/PBM*, version 3.10d. Palisade Co: Newfield, CA (1994).
10. R.P. Adams. *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*, Academic Press Inc: New York, NY, 1995.
11. F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli and J. Casanova, *Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy*. *J. Magn. Reson. Anal.*, 25–34 (1995).
12. B. Bendjillali, A. Tataoui-Elaraki and A. Ayadi, *Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé*. *Plant. Med. Phytother.*, **20**, 155–167 (1986),
13. S. Karaman, M. Digrak, U. Ravid and A. Ilcim, *Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of Thymus revolutus Celak from Turkey*. *J. Ethnopharmacol.*, **76**, 183–186 (2001).
14. I. Rasooli and S.E. Mirmostafa, *Antibacterial properties of Thymus pubescens and Thymus serpyllum essential oils*. *Fitoterapia*, **73**, 244–250 (2002).
15. M. Simeon de Bouchberg, J. Allegrini, C. Bessiere, M. Attisso, J. Passet and R. Granger, *Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de Thymus vulgaris Linnaeus*. *Rivista Ital. EPPOS*, **58**, 527–536 (1976).

Table II. Microbial inhibitions zones and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of essential oil of *Thymus fontanesii*

Microorganism	Inhibitions zones (mm)	MIC (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) ATCC 27853	8	16 700
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-) ATCC 700603	17	1 450
<i>Listeria monocytogenes</i> (+) ATCC 19115	18	1 410
<i>Proteus mirabilis</i> (-)	17	1 260
<i>Citrobacter freundii</i> (-)	19	420
<i>Enterobacter cloacae</i> (-)	20	420
<i>Escherichia coli</i> (-) ATCC 25922	23	380
<i>Staphylococcus aureus</i> (+) ATCC 43866	26	340
<i>Salmonella typhii</i> (-)	27	300



ISSN 0972-060X

**Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil
of *Ziziphora hispanica* (L.) from Algeria**

Chahrazed Bekhechi, Fewzia Atik Bekkara and Djamel Eddine Abdelouahid

Laboratoire des produits naturels, Département de Biologie,
Université Abou Bekr Belkaid, BP 119, Imma Tlemcen, Algeria

Kai Liu, Joseph Casanova and Félix Tomi*

Université de Corse-CNRS, UMR CNRS 6134, Equipe Chimie et Biomasse,
Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France.

Received 10 April 2007; accepted in revised form 15 June 2007

Abstract: The composition of the essential oil isolated by hydrodistillation from the aerial parts of *Ziziphora hispanica* (L.), growing wild in Algeria (province of Tlemcen) was determined by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR. The oil was characterized by a high content of pulegone (79.5%) and its antibacterial activity was tested against nine bacteria stains.

Key Words: *Ziziphora hispanica*, ¹³C NMR, GC-MS, pulegone, antimicrobial activity.

Introduction: The genus *Ziziphora* (Lamiaceae family) is known for its anti-diarhoeic and antipyretic effects¹. Three species grow wild in Algeria: *Z. capitata* (L.), *Z. tenuior* (L.) and *Z. hispanica* (L.)². A literature survey showed that the essential oil of *Ziziphora* species has to be found to be rich in pulegone: *Z. clinopodioides* (22%)^{3,4}, *Z. persica* (27.8-79.3%)^{5,6}, *Z. taurica* (37.2-81.9%)^{1,3,7}, *Z. tenuior* (86.3-87.1%)⁸. Oils of *Z. hispanica* from Spain exhibited also a high percentage of pulegone (64.5-76.7%)⁹.

As part of our on-going work on the characterization of aromatic plants from Algeria through the composition of their essential oils^{10,11,12}, we got interested by *Ziziphora hispanica*, growing wild in the Province of Tlemcen, Algeria. The composition of one oil sample, isolated from aerial parts, was investigated by chromatographic and spectroscopic techniques, GC in combination with Retention Indices (RI), GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy. Its antibacterial activity tested against Gram (+) and Gram (-) bacteria.

Experimental

Plant material, essential oil extraction and fractionation: The plant was identi-

*Corresponding author (Félix TOMI)

E- mail: < felix.tomi@univ-corse.fr >

fied by Pr. Bouazza M. and a voucher specimen (ref. no 2313) is deposited at the laboratory (Department of Biology, Faculty of Sciences, University Abou Bekr Belkaïd). Aerial parts of *Ziziphora hispanica* were collected during June 2004, at the full blossom, in Sebdou, Province of Tlemcen, Algeria. They were submitted to water-distillation (3 h), using a Clevenger-type apparatus. The essential oil was dried over Na₂SO₄ and stored in the dark, at 4°C. The oil (1 g) was fractionated over SiO₂ (10 g, 200-500 µm) leading to three fractions, eluted with pentane (F1 = 50 mg), pentane:Et₂O = 95:5 (F2 = 828 mg) and Et₂O (F3 = 107 mg), respectively. The essential oil was analyzed by GC in combination with Retention Indices (RI), GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy. The fractions of chromatography were analyzed by GC(RI), and ¹³C NMR.

GC Analysis: GC analysis was carried out using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with two Flame Ionization Detectors (FID), and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min); injector temperature: 250°C (injection mode: split 1/60); detector temperature: 250°C; carrier gas: helium (0.8 ml/min). The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentage obtained by peak area normalization, without using correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation (« Target Compounds » software from Perkin Elmer).

GC-MS Analysis: The essential oil was analysed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 ml/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 µl; injector temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermal (45 min); Ion source temperature, 150°C; ionisation energy, 70 eV; electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

¹³C NMR Analysis: All NMR spectra (essential oil and fractions of chromatography) were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ¹³C-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width = 4 µs (flip angle 45°); acquisition time = 2.7 s for 128K data table with a spectral width of 25000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution = 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (around 40 mg of the oil or fraction of chromatography, in 0.5 ml of CDCl₃).

Identification of components: Identification of the individual components was based i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds and literature data¹³; (ii) on computer matching with mass spectral

libraries¹⁴⁻¹⁵ and comparison with spectra of authentic samples or literature data^{13,16}, iii) on comparison of the chemical shifts of carbons in the ¹³C NMR spectrum of the mixture with those of reference spectra compiled in our spectral library with the help of a laboratory produced software¹⁷. This technique allows the identification of individual components to a content of 0.5% without any previous purification.

Microbial strains: The essential oil was tested against nine bacteria : seven Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoneae* ATCC 700603, *Enterobacter cloaceae*, *Salmonella typhii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, ATCC 25922 and *Citrobacter freundii* - two Gram-positive bacteria: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 601. Some strains were supplied by the Veterinary Centre of Tlemcen (*P. aeruginosa*, *K. pneumoneae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Aureus*) Others were isolated from clinical sittings and their identification was achieved with API 20 test strips (Biomerieux).

Antibacterial activity: Antimicrobial tests were carried out using the disc diffusion method. The sterile dishes were inoculated using 1000 µl of a suspension containing 10⁸ CFU/ml of bacteria. Discs of 6 mm in diameter were also impregnated with 3 µl of essential oil and placed on the inoculated agar medium. In addition, reference discs without essential oil were used for comparison. The inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h. At the end of the period, the developing inhibition zones were measured and reported on the table 2. Studies were performed in triplicate.

Results and Discussion: The composition of one oil sample, isolated from aerial parts of *Ziziphora hispanica* harvested in the Province of Tlemcen (Algeria), (yield = 0.53% on dry material basis) was investigated by chromatographic and spectroscopic techniques (GC in combination with Retention Indices, GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy), after fractionation on column of chromatography (CC) (Table 1) The oil was dominated by C-3 oxygenated *p*-menthane derivatives: pulegone (79.5%) by far the major component, *p*-menth-3-en-8-ol (2.4%) *cis*-isopulegone (0.6%) *trans*-isopulegone (0.9%) and piperitenone (0.6%). Other constituents, present at appreciable content, were limonene (1.7%), carvacrol (1.6%) and thymol (0.9%). Only two sesquiterpenes, (E)-β-caryophyllene and its oxide, have been identified. The composition of our oil sample is similar to that of oils of Spanish origin (pulegone: 62.9-76.6%)⁹. However, it differed by the content of piperitenone which is very low (0.6% vs 11.7-16.7%). A high ratio of pulegone was also reported for oils isolated from *Z. tenuior* (86.3-87.1%)⁸, *Z. persica* (79.3%)⁶ and *Z. taurica* ssp. *cleonioides* (81.9%)⁷. It should be pointed out the presence of *cis*- and *trans*-isopulegones which are reported for the first time in *Ziziphora* species.

Using the direct contact technique in agar medium, the oil of *Z. hispanica* exhibited moderate antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhii* (Table 2). Similar results are reported in the literature for pulegone-rich oils from various *Ziziphora* species: *Z. clinopodioides* oil, (pulegone = 31.9%) active against several bacteria⁴; *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* oil (pulegone, 45.8%) moderately active against *B. subtilis*

and *S. epidermis*¹⁸; *Z. persica* oil (pulegone = 79.3%) active against 32 bacteria (particularly *Bacillus dyspauri*)⁶. Hence, the antibacterial activity of *Z. hispanica* essential oil could be associated to the presence of pulegone. However, the small amount of carvacrol and thymol (2.5%) contribute also to the antibacterial activity¹⁹.

Acknowledgements: B. C. express her gratitude to the "Ministère de l'Éducation et de la Recherche Scientifique" d'Algérie and to the University Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) for a research grant.

References

1. **Ozel, M.Z., Gogus, F., Hamilton, J.F. and Lewis, A.C. (2005).** Analysis of volatile components from *Ziziphora taurica* subsp. *taurica* by steam distillation, superheated-water extraction, and direct thermal desorption with GC×GC-TOFMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 115-119.
2. **Quezel, P. and Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed. CNRS, Paris, pp 804-806.
3. **Baser, K.H.C. (2002).** Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa from Turkey. *Pure Appl. Chem.* 74, 527-545.
4. **Otzuk, S. and Ercisli S. (2007).** Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food Control.* 18, 535-540.
5. **Rüstaiyan, A., Jamzad, M., Masoudi S., and Ameri, N. (2006).** Volatile constituents of *Nepeta heliotropifolia* Lam., *Mentha mozaffarianii* Jamzad and *Ziziphora persica* Bunge. Three Labiateae Herbs Growing Wild in Iran. *J. Essent Oil Res.* 18, 348-351.
6. **Ozturk, S. and Ercisli, S. (2006).** The chemical composition of the essential oil and *in vitro* antibacterial activities of essential oil and methanol extracts of *Ziziphora persica* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology.* 106, 372-376
7. **Meral, G.E., Konyalioglu, S. and Ozturk, B. (2002).** Essential oil composition and antioxidant of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *Cleonoides*. *Fitoterapia.* 73, 716-718.
8. **Sezik, E., Tümen, G. and Baser, K.H.C. (1991).** *Ziziphora tenuior* L., a new source of pulegone, *Flav. Fragr. J.* 6, 101-103.
9. **Velasco Neguerela A. and Mata Rico M. (1986).** The volatile oil of *Ziziphora hispanica* L. *Flav. Fragr. J.* 1, 111-113.
10. **Bousmaha, L., Boti, J.B., Atik Bekkara, F., Castola, V. and Casanova, J. (2006).** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dendata* L. from Algeria. *Flav. Fragr. J.* 21, 368-372.
11. **Bekhechi, C., Atik Bekkara, F., Abdelouahid, D.E., Tomi F. And Casanova, J. (2007).** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *J. Essent Oil Res.* in press.
12. **Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V. And Casanova, J. (2007).** Composition and chemical variability from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria: part II, fruit oil. *J. Essent Oil Res.* in press.

13. **Joulain, D. and König, W.A. (1998).** The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B. Verlag, Hamburg.
14. **NIST National Institute of Standard Library. (1997).** The Perkin Elmer corporation.
15. **McLafferty, F.W. and Stauffer, D.B. (1994).** Wiley registry of mass spectral data, 6th ed. Mass spectrometry library search system benchtop/PBM, version 3.10d. Palisade Co: Newfield.
16. **Adams, R.P. (1995).** Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy, Academic Press Inc: New-York, NY.
17. **Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A. and Casanova, J. (1995).** Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* 1, 25-34.
18. **Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M. (2005).** Essential oil composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (Boiss.) RECH. f. from Iran. *Biol. Pharm. Bull.* 28(10), 1892-1896.
19. **Burt, S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology.* 94, 223-253.

Table 1. Percentage composition of *Ziziphora hispanica* oil sample from Algeria

Component	RIa	RIp	Percentage	Identification mode
α -Pinene	930	1025	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
Sabinene	964	1122	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
β -Pinene	970	1112	0.4	RI, MS, ¹³ C NMR
Myrcene	979	1161	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
Oct-1-en-3-ol	958	1447	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
p-Cymene	1010	1271	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
Limonene*	1019	1202	1.7	RI, MS, ¹³ C NMR
1.8-Cineole*	1019	1209	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
γ -Terpinene	1047	1245	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
p-Mentha-3,8-diene	1058	1257	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
Terpinolene	1077	1283	tr	RI, MS
Linalool	1081	1543	tr	RI, MS
<i>trans</i> -p-Mentha-2,8-diene-1-ol	1101	1626	tr	RI, MS
<i>cis</i> -p-Mentha-2,8-diene-1-ol	1114	1657	tr	RI, MS
<i>trans</i> -Pinocarveol	1122	1654	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
<i>trans</i> -Verbenol	1126	1669	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
Menthone	1130	1463	0.3	RI, MS, ¹³ C NMR
<i>p</i> -Menth-3-en-8-ol	1131	1605	2.4	RI, MS, ¹³ C NMR
Menthofurane	1146	1483	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
<i>trans</i> -Isopulegone	1148	1583	0.9	RI, MS, ¹³ C NMR

table 1. (continued)

Component	RIa	RIp	Percentage	Identification mode
<i>cis</i> -Isopulegone	1149	1572	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
Borneol	1148	1700	tr	RI, MS
Terpineol-4	1160	1598	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
α -Terpineol	1172	1696	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
Myrtenol	1178	1789	tr	RI, MS
<i>trans</i> -Carveol	1196	1834	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
<i>cis</i> -Carveol	1213	1866	tr	RI, MS
Pulegone	1219	1654	79.5	RI, MS, ¹³ C NMR
Piperitone	1226	1772	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
<i>cis</i> -Piperitone oxide	1233	1722	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
Thymol	1262	2186	0.9	RI, MS, ¹³ C NMR
Carvacrol	1272	2217	1.6	RI, MS, ¹³ C NMR
Piperitenone	1314	1916	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
(E)- β -Caryophyllene	1417	1595	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
Mintlactone	1450	2220	0.3	RI, MS, ¹³ C NMR
Caryophyllene oxide	1569	1986	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
total %			92.2	

RIa: RI on apolar column,

RIp: RI on polar column. Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1) except for compounds with an asterisk* for which percentages are given on polar column (BP-20).

Table 2. Microbial inhibitions zones of essential oil of *Ziziphora hispanica*.

Microorganism	Inhibition zones (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) ATCC 27853	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-) ATCC 700603	08.0
<i>Listeria monocytogenes</i> (+)	08.3
<i>Proteus mirabilis</i> (-)	09.0
<i>Citrobacter freundii</i> (-)	09.7
<i>Escherichia coli</i> (-) ATCC 25922	10.3
<i>Enterobacter cloacae</i> (-)	10.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (+) ATCC 601	12.7
<i>Salmonella typhi</i> (-)	13.3

Article original

Pharmacognosie

Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie

C. Bekhechi, F. Atik-Bekkara, D. E. Abdelouahid

Laboratoire des produits naturels, département de biologie, université Abou Bekr Belkaid, BP 119, Imma Tlemcen, Algérie

Correspondance : e-mail : bekhechichahrazed@yahoo.fr

Résumé : La composition de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation de la partie aérienne d'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) poussant à l'état spontané en Algérie est déterminée par CPG et RMN C¹³. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* présente une teneur élevée en thymol variant entre 41 et 49,5 %. Nous avons également déterminé l'activité de l'huile essentielle de cette espèce vis-à-vis des bactéries à Gram + et à Gram -. On constate qu'elle est très active sur l'ensemble des bactéries testées, sauf les *Pseudomonas* qui se révèlent très résistantes.

Mots clés : *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*(Desf.) – RMN C¹³ – CPG – Thymol – Activité antibactérienne

Composition and antibacterial activity of the essential oils contained in Algerian *Origanum glandulosum* (Desf.)

Abstract: The composition of the essential oil isolated by hydrodistillation from the aerial parts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) growing wild in Algeria was determined by GC and ¹³C NMR. The oil was characterized by high thymol content (41-49.5%) and its antibacterial activity was tested against bacteria Gram (-) and Gram (+). The oil is very active against all bacteria tested except *Pseudomonas* which turned out to be very resistant.

Introduction

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des Lamiacées, comporte 38 espèces qui sont largement répandues dans les régions euro-sibérienne et irano-sibérienne. Cependant, la plupart des espèces, environ 75 %, sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions méditerranéennes de l'Est [20, 36]. L'origan est souvent considéré comme une forme sauvage de la marjolaine, c'est l'ornement odorant des montagnes. Cependant, le terme origan provient de deux mots grecs « oros » et « genos », c'est-à-dire

« éclat des montagnes » [30]. Cette plante est utilisée dans les préparations culinaires et est considérée essentiellement comme une plante médicinale pour traiter les maladies sévères. Elle jouit d'une grande faveur populaire en Algérie et en Tunisie comme remède contre la toux et les affections respiratoires. En effet, cette plante expectorante, stomachique, stimulante, tonique possède des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antitussives [3, 40]. Les espèces d'*Origanum* sont utilisées également comme des désinfectants puissants et comme des agents odoriférants dans les parfums [12].

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante dite *Origanum glandulosum* Desf. [31] (Syn : *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* [20]), qui pousse spontanément dans tout le nord de l'Afrique, en particulier dans les montagnes, à une altitude de 300 à 1 600 m, surtout dans les endroits rocheux [20]. Selon Quezel et Santa [31], l'espèce *Origanum glandulosum* est une plante à tiges toutes dressées. L'inflorescence est en épis denses, à fleurs restant contiguës après la floraison. La corolle a une lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure. C'est une espèce endémique en Algérie et en Tunisie et qui pousse au niveau des broussailles et des garrigues. L'étude phytochimique d'*Origanum glandulosum* de la région de Sétif en Algérie montre que les huiles essentielles de cette plante présentent de fortes teneurs en carvacrol (47 %), suivi de γ -terpinène (13,4 %), de *p*-cymène (11,2 %) et de thymol (6,6 %) [5]. Par ailleurs, les analyses chromatographiques effectués par Ruberto et al. [36] sur les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*, récolté dans quatre stations différentes dans la région de Sétif (Algérie), signalent la présence de deux chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol, suivi de *p*-cymène (3,6-25,8 %) et de γ -terpinène (4,8-13,2 %). Ces auteurs avancent également que l'huile essentielle de cette plante possède une activité antioxydante considérable, due à la présence des composés phénoliques.

Sari et al. [38] ont effectué une étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

récolté dans différentes régions de l'est de l'Algérie. Ils avancent l'existence de deux chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol. Les résultats obtenus montrent que les composés majoritaires identifiés sont les suivants : le thymol (18,5-73,1 %), le carvacrol (7,6-72,6 %), le *p*-cymène (1,7-18,5 %) et le γ -terpinène (1,1-18,7 %). L'étude qui a eu pour objet l'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* rapporte que ces produits naturels ont montré un effet inhibiteur sur les levures et moisissures isolées à partir de l'hôpital central de Sétif [6].

La présente étude est relative à la composition quantitative et qualitative de divers échantillons d'huiles essentielles extraites à partir d'*Origanum glandulosum* récolté à partir de trois stations qui se trouvent dans la région de Tlemcen (Algérie). Nous avons également déterminé l'activité d'un seul échantillon de cette espèce vis-à-vis des bactéries de référence et celle d'origine hospitalière.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal (parties aériennes) provient de la région de Tlemcen (Algérie) à partir de différentes stations, à savoir : Sebdo, Beni-Mester et Terni. La récolte a été faite au mois de juin, en pleine floraison de la plante.

Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger pendant une durée de trois heures, et l'hydrodistillat obtenu est séché par du Na₂SO₄. Elles sont conservées dans des tubes en verre fumé à l'abri de la lumière et à une température entre 0 et 4 °C.

Analyse des huiles essentielles

Les analyses des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* ont été effectuées par l'université de Corse-CNRS, équipe « Chimie et Biomasse », UMR CNRS 6134.

Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 × 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm), polaire (BP20), polyéthylène glycol et apolaire (BP1, diméthylsiloxane) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur : hélium, pression en tête de colonne : 20 psi, programmation de température : de 60 à 220 °C à 2 °C/min avec un palier de 20 min à 220 °C, température de l'injecteur : 250 °C, température des détecteurs : 250 °C, injection : mode split.

Analyse par spectroscopie de la résonance magnétique du carbone 13 (RMNC¹³)

Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme deutérié, sur un spectromètre de marque « Bruker », opérant à 100,623 MHz pour le ¹³C, sous les conditions opératoires suivantes : sonde de 5 mm, durée d'impulsion (PW) : 4 µs (angle 45°), temps d'acquisition : 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spéciale (SW) de 25 000 Hz (250 ppm), résolution digitale : 0,183 Hz/pt, mode de découplage pulsé (*composite phase decoupling*), le nombre d'accumulations est compris entre 2 000 et 3 000 pour chaque enregistrement. Les déplacements chimiques sont des données en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne. L'analyse d'un mélange est menée sur un échantillon de 40 mg dilué dans 0,5 ml de CDCl₃.

Identification des constituants

Les constituants ont été identifiés :

- par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane (C₈-C₂₈) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire ;

- par RMN du C¹³, selon une méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse [43]. Cette méthode est fondée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire. L'identification est ainsi réalisée par la prise en compte du nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, du nombre de superpositions des signaux et des variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$). En plus de ces paramètres, qui sont directement accessibles par un logiciel élaboré au laboratoire de chimie et biomasse à l'université de Corse, l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Dans les échantillons étudiés, les composés ont été identifiés jusqu'à une teneur de 0,3-0,4 %.

Étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*

Les souches pathogènes testées

- Bactéries à Gram - : *Pseudomonas aeruginosa* (P₂), *Ps. aeruginosa* (P₃) ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* (KL₁), *KL. pneumoniae* (KL₂) ATCC 700603, *Enterobacter cloacae* (En), *Salmonella typhi* (SL), *Proteus mirabilis* (Pr),

Escherichia coli (E₁), *E. coli* (E₂), *E. coli* (E₃), *E. coli* (E₄) ATCC 25922, *E. coli* (E₆) et *Citrobacter frundii* (Ci) ;

– bactéries à Gram + : *Listeria monocytogenes* (L₁₁) ATCC 19111, *L. monocytogenes* (L₁₅) ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* (St₁) ATCC 601, *S. aureus* (St₂) et *S. aureus* (St₃) ATCC 43866.

Les souches, qui ne sont pas de référence, sont obtenues à partir du laboratoire de microbiologie des hôpitaux et sont isolées à partir des plaies post-opératoires infectées. Ensuite, elles sont identifiées sur des plaques API 20 E pour les entérobactéries, et api Staph (pour *Staphylococcus aureus*). Les inoculums sont préparés à partir de cultures en milieu liquide de 18 h, dilués dans de l'eau physiologique de manière à renfermer environ 10⁸ germes/ml, soit à une densité variant entre 0,08 et 0,1 à 625 nm [11, 22].

Technique d'étude du pouvoir antimicrobien

Nous avons évalué la sensibilité de ces germes vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* provenant de la station de Terni. Nous avons appliqué trois méthodes et nous avons utilisé le milieu Mueller Hinton pour les différentes techniques.

La technique de l'antibio-aromatogramme (méthode de Vincent)

Afin de tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de l'antibiogramme par diffusion à partir de disques imprégnés d'huile essentielle pure [21]. Les milieux coulés en boîte de Petri sontensemencés avec 1 ml de suspension bactérienne de 10⁸ germes/ml et l'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration [39]. L'huile essentielle est déposée sous volume de 3 µl sur des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre. En parallèle, nous avons utilisé des témoins afin de vérifier la croissance des différentes souches.

La technique de contact direct

Elle est fondée sur l'utilisation sous forme d'émulsion de ces produits non miscibles à l'eau. L'émulsifiant utilisé est le Tween 80 dilué à 10 % dans de l'eau distillée stérile [8, 9, 15]. Nous avons utilisé la même méthode pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Enfin, l'ensemencement a été réalisé de la même manière que précédemment. Dans les témoins, nous avons mis 15 % de Tween 80 afin de vérifier qu'il n'inhibe pas la croissance des différentes souches. Remarque : pour les *Pseudomonas*, nous avons augmenté la quantité d'huile essentielle dans la solution mère. Nous avons mis 1,75 ml d'huile essentielle au lieu de 1 ml d'huile essentielle.

La technique de micro-atmosphère

Elle permet d'évaluer l'activité des substances volatiles [7, 24] sur les mêmes germes utilisés précédemment. Les milieux coulés en boîte de Petri sontensemencés avec 1 ml de suspension bactérienne de 10⁸ germes/ml, et l'excédent

de l'inoculum est éliminé par aspiration [39]. Ensuite, des disques de papier filtre stérile sont déposés aseptiquement sur les couvercles des boîtes de Petri. Ces disques ont un diamètre de 9 cm et sont imprégnés de différentes quantités d'huile essentielle pure allant de 50 à 200 µl avec un pas de 25 µl.

Ensuite, nous avons déterminé les quantités minimales inhibitrices (QMI) en utilisant la même méthode mais avec des intervalles variant selon la sensibilité des souches et avec un pas de 5 µl. En parallèle, nous avons utilisé des témoins afin de vérifier la croissance des différentes souches. Pour chaque méthode et pour une même souche, nous avons réalisé cinq essais afin de pouvoir établir une moyenne dans les mesures d'inhibitions et d'obtenir une meilleure fiabilité des résultats.

Résultats et discussions

Rendements

Les rendements moyens en huiles essentielles obtenus (calculés en fonction de la masse du matériel végétal sèche) varient sensiblement entre les différentes stations : Beni-Mester = 3,53 %, Terni = 3,90 %, Sebdo = 3,95 %. La détermination quantitative des huiles essentielles dans cette espèce végétale révèle sa richesse en ses métabolites secondaires. L'étude phytochimique de cette même espèce poussant dans la région de Sétif, effectuée par Belhatab et al. [5], leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles de l'ordre de 2,7 %. Nos résultats sont proches de ceux qui ont été obtenus avec cette même espèce par Ruberto et al. [36]. Ces auteurs ont noté que les rendements en huiles essentielles de cette espèce récoltée dans différentes stations de la région de Sétif sont variables allant de 2,3 à 5 %. Les rendements en huile essentielle de cette même plante récoltée dans différentes stations de la région Est de l'Algérie, effectué par Sari et al. [38], leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles allant de 0,8 à 3 %.

Analyse des huiles essentielles

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* poussant spontanément dans la région de Tlemcen (Algérie), nous avons procédé à une analyse de quatre échantillons d'huile essentielle de cette plante récoltée dans trois stations différentes, à savoir : Sebdo, Beni-Mester et Terni. Pour cette dernière station, nous avons effectué deux récoltes sur deux années successives. Le Tableau 1 fait état des composés identifiés et de leurs teneurs dans les quatre échantillons. L'analyse de ces huiles essentielles par CPG-Ir et par RMN C¹³ nous a permis d'identifier douze composés qui représentent un pourcentage variant entre 93,5 et 94,7 % selon les différentes stations étudiées. Les quatre échantillons analysés sont quantitativement et qualitativement très

Tableau 1. Composition chimique des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* des différentes stations

Composés identifiés	Ir A	Ir P	OG 1	O 1	OBM	OSB
α -thujène	920	1 026	1,1	1,5	1,6	1,6
α -pinène	929	1 025	0,7	0,6	0,7	0,7
β -pinène	968	1 111	0,2	0,2	0,2	0,2
Myrcène	978	1 161	1,7	2,0	2,1	2,1
α -terpinène	1 007	1 181	1,7	1,8	2,2	2,4
Para-cymène	1 011	1 272	18,3	17,7	20,3	15,7
Limonène*	1 020	1 202	0,3	0,4	0,4	0,3
γ -terpinène	1 047	1 246	16,4	20,0	21,4	23,8
Terpinène-4-ol	1 159	1 598	0,5	0,4	0,4	0,4
α -terpinéol	1 171	1 695	0,3	0,3	0,4	0,2
Thymol	1 263	2 187	49,5	45,4	41,0	44,4
Carvacrol	1 275	2 218	2,9	3,6	2,9	2,9
Total (%)			93,5	93,9	93,6	94,7

Légende : OG 1 /O 1: Terni /2004/2005, OBM: Beni-Mester, OSB : Sebdu.

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1) à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque* [dont les pourcentages sont ceux sur colonne polaire (BP-20)] IRa et IRp : indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire.

proches. La même observation est faite pour la station de Terni concernant les deux années successives. Ces huiles essentielles ne contiennent que des monoterpènes dont 8 oléfines (40,4-48,9 %) et 4 monoterpènes oxygénés (44,7 et 53,2 %). Le thymol est le composé majoritaire (41,0 et 49,5 %) et les mêmes composés sont identifiés dans tous les échantillons. En revanche, le carvacrol est présent en faible teneur (2,9-3,6 %). Les autres monoterpènes oxygénés identifiés sont également présents en très faibles teneurs : le α -terpinéol (0,2-0,4 %) et le terpinène-4-ol (0,4-0,5 %).

Ces huiles essentielles renferment également des monoterpènes hydrocarbonés en quantités appréciables, à savoir : le γ -terpinène (16,4-23,8) et le *p*-cymène (15,7-20,3).

Nous constatons également l'existence en moindres quantités d'autres monoterpènes oléfiniques, qui sont : le α -terpinène (1,7-2,4), le myrcène (1,7-2,1), l' α -thujène (1,1-1,6), l' α -pinène (0,6-0,7), le limonène (0,3-0,4) et le β -pinène (0,2). Ces analyses nous permettent de constater une stabilité et une homogénéité dans la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*. Ainsi, l'origine et l'année de cueillette du matériel végétal ne semblent pas avoir une influence sur la composition chimique de cette huile essentielle. Par ailleurs, ces résultats nous amènent à supposer que nos huiles essentielles appartiennent à un seul groupe chimique à thymol/ γ -terpinène/ *p*-cymène. Enfin, vu la richesse de cette espèce, récoltée dans la région de Tlemcen (Algérie), en huile essentielle ainsi que l'homogénéité et la stabilité de la composition chimique de son huile essentielle, cette plante est susceptible d'avoir un intérêt industriel et peut être également recommandée comme source potentielle de thymol.

L'étude phytochimique d'*Origanum glandulosum* de la région de Sétif (Algérie) a été effectuée par Belhatteb et al. [5]. Ils ont mis en évidence 29 composés qui représentent

89,4 %. Ils montrent que l'huile essentielle de cette plante présente une forte teneur en carvacrol (47 %), suivi de γ -terpinène (13,4 %), de *p*-cymène (11,2 %) et de thymol (6,6 %). Cette huile essentielle est de type chimique différent des nôtres.

Par ailleurs, la comparaison de nos résultats avec les travaux de Ruberto et al. [36], effectués sur l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* récolté dans quatre stations (Ouled Lyiche, Djebel Megriss, Anini et Tafat) de la région de Sétif (Algérie), permet de distinguer que l'huile essentielle de cette plante récoltée à Ouled Lyiche et à Djebel Megriss présente le même composé majoritaire que celui de nos échantillons, à savoir le thymol ; en revanche, l'huile essentielle de cette même espèce récoltée à Anini et à Tafat est de type chimique à carvacrol. Elles renferment également des quantités appréciables en d'autres composés, à savoir : *p*-cymène (3,6-25,8) et γ -terpinène (4,8-13,2).

Sari et al. [38] ont effectué une étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* récolté dans différentes régions de l'est de l'Algérie. Ils ont identifié trente composés qui représentent un pourcentage variant entre 97,7 et 99,6 %. Ils avancent l'existence de deux chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol. Les résultats obtenus montrent que les composés majoritaires identifiés sont les suivants : le thymol (18,5-73,1 %), le carvacrol (7,6-72,6 %), le *p*-cymène (1,7-18,5 %) et le γ -terpinène (1,1-18,7 %).

Étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

Détermination de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disques

Les résultats de la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles provenant de la station de Terni, de la région de Tlemcen, sur plusieurs souches qui

Tableau 2. Diamètres des zones d'inhibition, concentrations minimales inhibitrices (CMI) et quantités minimales inhibitrices (QMI) des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* relatives aux bactéries testées

Souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	QMI (μl)
P2	08,0	> 15 980	R
P3	08,0	> 15 980	R
KL1	16,4	2 350	157
KL2	16,4	2 300	153
L11	16,6	2 230	140
L15	16,8	2 180	130
Pr	17,0	1 660	112
E6	17,2	1 510	105
E2	17,4	1 300	110
E3	17,6	1 210	105
Ci	18,0	970	107
E1	18,4	950	97
En	18,8	930	120
St2	22,0	660	100
E4	22,6	600	90
St1	24,6	580	93
St3	25,6	530	100
SL	26,0	480	90

Légende : Huile essentielle d'*Origanum glandulosum* (station de Terni, 2005). Le diamètre des disques est compris dans le diamètre du halo d'inhibition.

sont responsables des maladies nosocomiales, figurent dans le Tableau 2. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm [4, 37] ou à 15 mm [34]. Si l'on considère les résultats fournis par la technique de Vincent, on observe de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibition obtenus, allant de 08,0 à 26 mm.

Notre huile essentielle agit de façon très active sur l'ensemble des souches testées, sauf les deux *Pseudomonas* qui se révèlent très résistantes. Par ailleurs, nos résultats montrent donc une grande variabilité des qualités bactériostatiques de l'huile essentielle vis-à-vis des différentes souches. Enfin, les trois staphylocoques, l'*E. coli* de référence (E_4) et la salmonelle se révèlent très sensibles. Parmi les études qui ont eu pour objet la détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de certaines sub-espèces d'*Origanum vulgare*, celles de Morris et al. [26] et de Dorman et Deans [17] ont révélé une importante activité de ces huiles essentielles. Ils ont obtenu les résultats suivants : *E. coli* (24,30 mm), *S. aureus* (33,18 mm) respectivement.

Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats avec ceux de Piccaglia et al. [30], qui ont étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Satureja montana* à chimiotype carvacrol (41 %), sur plusieurs souches, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Citobacter frundii* et *Staphylococcus aureus*. Nous avons obtenu les mêmes résultats pour *Ps. Aeruginosa* (7,1 mm) et pour

Kl. Pneumoneae (18,9 mm) ; en revanche, ils ont enregistré une faible activité pour *Ci. Frundii* (11,2 mm), *E. coli* (10,5 mm) et *S. aureus* (15,4 mm) par rapport à nos résultats, cela est dû au fait que leurs souches sont plus résistantes que les nôtres.

Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct et détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Nous rapportons dans le Tableau 2 les concentrations minimales inhibitrices de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* obtenues par la méthode de contact direct en milieu gélosé. Les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec la méthode de l'antibio-aromatogramme. Aligiannis et al. [1] ont proposé une classification des huiles essentielles du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 500 $\mu\text{g/ml}$;
- inhibition modérée : CMI varie de 600 $\mu\text{g/ml}$ à 1 500 $\mu\text{g/ml}$;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 $\mu\text{g/ml}$.

Par ailleurs, Teixeira Duarte et al. [42] avancent que toute huile essentielle qui présente des CMI inférieures à 2 000 $\mu\text{g/ml}$ est caractérisée par un pouvoir antimicrobien. Ainsi, l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* est sans réserve très active sur l'ensemble des souches testées, sauf les *Pseudomonas*, les *Klebsiellas* et les *Listerias* qui se révèlent très résistantes, et cela malgré l'utilisation du Tween 80 qui abaisse considérablement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles [16, 32]. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus résistantes, inhibées à des concentrations très élevées d'huile essentielle, soit supérieures à 15 980 $\mu\text{g/ml}$. Les souches de *Klebsiella* et de *Listeria* sont inhibées à partir d'un même seuil de concentrations d'huile essentielle, soit entre 2 180 et 2 350 $\mu\text{g/ml}$. Les entérobactéries suivantes : *Proteus mirabilis*, *E. coli* (E_1 , E_2 , E_3 et E_6), *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter frundii* sont inhibées à des CMI variables allant de 930 à 1 660 $\mu\text{g/ml}$. Enfin les bactéries les plus sensibles sont les staphylocoques *E. coli* de référence (E_4) et la salmonelle, inhibées à des CMI nettement inférieures à celles obtenues avec les autres souches, soit entre 480 et 660 $\mu\text{g/ml}$. On remarque également que l'appartenance des souches bactériennes à Gram (+) ou à Gram (-) n'influe pas sur leur sensibilité et cela a déjà été démontré par Ouattara et al. en 1997 [28].

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Morris et al., qui ont déterminé la CMI des huiles essentielles d'*Origanum* d'Espagne sur quatre souches microbiennes, notamment *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos souches, à savoir 500 ppm et cela pour les deux souches testées [26]. Nous avons également comparé nos résultats à ceux de Simeon de Bouchberg et al. [41], qui ont déterminé les CMB de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à chimiotype à carvacrol (80 %) sur plusieurs souches, notamment des *S. aureus* (250-1 000 $\mu\text{g/ml}$), des *E. coli* (500-1 000 $\mu\text{g/ml}$) des

Kl. Pneumoneae (1 000 µg/ml) et des *P. Aeruginosa* (4 000-8 000 µg/ml). Les souches *Kl. Pneumoneae* et *P. Aeruginosa* se sont montrées moins sensibles que les nôtres.

Évaluation de l'activité antibactérienne de la phase volatile des huiles essentielles et détermination des quantités minimales inhibitrices (QMI)

Les résultats obtenus par la technique de micro-atmosphère fondée sur l'activité des substances volatiles sont résumés dans le Tableau 2. On remarque que cette méthode ne confirme pas les résultats obtenus avec la méthode de contact direct en milieu gélosé et celle de l'antibio-aromatogramme. Cela est dû au fait qu'un composé volatil donné présent dans l'huile essentielle, responsable de l'inhibition d'un microorganisme par contact direct, ne réagit pas de la même manière que dans la phase vapeur [16]. Par la détermination des QMI, nous pouvons avancer que nos huiles essentielles affectent la croissance de toutes les bactéries, jusqu'à leur inhibition totale en présence de faibles quantités d'huile essentielle, sauf les souches de *Pseudomonas* qui sont très résistantes, même à des quantités très importantes de l'ordre de 800 µl. Par ailleurs, on note une efficacité variable des huiles essentielles sur le reste des souches bactériennes, indépendamment de leur appartenance à Gram – ou à Gram +.

On remarque également que les Klebsielles et les Listerias restent toujours les souches les plus résistantes après les *Pseudomonas*. Les souches d'*Enterobacter*, d'*E. coli* (E₂), de *S. aureus* (St₂), (St₃) se sont révélées plus résistantes à la phase vapeur. Elles sont inhibées à des quantités variables d'huile essentielle, soit entre 100 et 120 µl. En revanche, les espèces *E. coli* (E₄), *S. aureus* (St₁) et pour *Sl. typhi* restent les plus sensibles, inhibées à des QMI très faibles, soit entre 90 et 93 µl.

Conclusion

L'importante activité de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* est due à sa richesse en composés phénoliques (thymol). Les composés les plus antimicrobiens sont les phénols (carvacrol, thymol, eugénol), viennent ensuite les alcools (cinéole, linalol...) et dans une faible mesure les alcènes (*p*-cymène, pinène, terpinène...) [10, 45]. En effet, plusieurs travaux ont démontré que le pouvoir antimicrobien élevé des huiles essentielles de plusieurs espèces d'origan est attribué à leur richesse en composés phénoliques (carvacrol et thymol) [2, 13, 14, 18, 19, 27, 29].

La plupart des travaux qui ont eu pour objet l'étude du mécanisme d'action des composés phénoliques avancent que leur principal site d'action est la membrane plasmique bactérienne [39]. Ils sont aptes à désintégrer la membrane cellulaire des bactéries [44]. La membrane perd sa structure et devient plus perméable aux ions [25]. La lésion de la membrane cellulaire peut également permettre la dissipation du gradient pH et la diminution du potentiel

membranaire [44]. La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est liée à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières. Plusieurs auteurs rapportent la faible, voire l'absente activité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles de diverses espèces d'origan [19, 23, 35].

Remerciements

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance et ma gratitude à J. Casanova (directeur du laboratoire Systèmes Physiques de l'environnement, équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse) et à F. Tomi (professeur à l'université de Corse) pour leur aide, leur collaboration et leur accueil au sein de leur laboratoire afin de pouvoir réaliser l'analyse des huiles essentielles.

Bibliographie

1. Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168-70
2. Arras G, Usai M (2001) Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hoffing Oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J Food Prot* 64: 1025-9
3. Baba Aissa F (1999) Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie moderne-Rouiba, pp. 194-231
4. Baudoux D (2001) L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. 2^e éd., Atlantica, pp. 25-6
5. Belhattab R, Larous L, Figueiredo CA, et al. (2005) *Origanum glandulosum* Desf Grown Wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragr J* 20: 209-12
6. Belhattab R, Larous L, Kalantzakis Y, et al. (2004) Antifungal properties of *origanum glandulosum* Desf. Extracts *J of Food, Agriculture and Environment* 2: 69-73
7. Benjillali B, Tantaoui-Elaraki A, Ayadi, Ihlal M (1984) Method to study antimicrobial effect of essential oils: Application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *J Food Prot* 47: 748-52
8. Benjillali B, Tataoui-Elaraki A, Ayadi A (1986) Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie* 20: 155-67
9. Beylier-Maurel F (1976) Activités bactériostatiques des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana EPPS* 58: 283-6
10. Burt SA (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review *International. J Food Microbiol* 94: 223-53
11. Careaga M, Fernández E, Dorantes L, et al. (2003) Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat *International. J Food Microbiol* 83: 331-5
12. Chiej R (1984) *Macdonald encyclopedia of medicinal plants*. Ed Macdonald, London, pp. 212-7
13. Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aliqiannis N, et al. (2004) Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 52: 8261-7
14. Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem* 40: 809-16
15. Courvallin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J (1985) L'antibiogramme. Videom MPC, Paris, pp. 225-35

16. Delespaul Q, De Billerbeck VG, Roques CG, Michel G, et al. (2000) The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J Essential Oil Research* 12: 256-66
17. Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-16
18. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 65: 1545-60
19. Hersch-Martinez P, Leanos-Miranda BE, Solarzano-Santos F (2005) Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia* 76: 453-7
20. Ietswaart JH (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae) In chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Leiden Botanical series 4. Leiden University Press, la Haye
21. Jacob M, Pellecuer J, Tomei R (1979) Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana EPPOS* 11: 26-30
22. Joffin JN, Leyral G (2001) Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. 3^e éd. Biologie technique, p. 58
23. Janssen AM, Chin NLJ, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A (1986) Screening for antimicrobial activity of some essential oil by the agar overlay technique. *Pharm Weekbl Sci* 8: 289-92
24. Kellner W, Kober W (1955) Möglichkeit der Verwertung atersher le zurraundesinfektion. *Arzneimittelforschung* 5: 224
25. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91: 453-62
26. Morris A, Khettry A, Seitz EW (1979) Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Soc* 56: 595-603
27. Nevas M, Korhonen AR, Lindstrom M, Turkki P, Korkela H (2004) Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot* 67: 199-202
28. Ouattara B, Sinard RE, Holley AR, et al. (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol* 37: 155-62
29. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2007) Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* *Food Control* 18: 414-20
30. Piccaglia R, Marotti M, Giovanelli E, et al. (1993) Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial crops and Products* 2: 47-50
31. Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II, CNRS, Paris, p. 819
32. Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour, Ettaybi M (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils agar medium. *J essent Oil Research* 5: 179-84
33. Richard H (1974) Quelques espèces et aromates et leurs huiles essentielles. Série synthèses bibliographiques, CDUPA 2
34. Rossi PG (2003) Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles. Université de Corse, p. 2
35. Ruberto G, Baratta MT (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipids model systems. *Food Chem* 69: 167-74
36. Ruberto G, Barratta MT, Sari M, Kaabeche M (2002) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance J* 17: 251-4
37. Sağdaç O (2003) Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm-Wiss U-Technol* 36: 467-73
38. Sari M, Biondi MD, Kaabeche M, et al. (2006) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance J* 21: 890-8
39. Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, et al. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J Ethnopharmacol* 96: 151-8
40. Sijelmassi A (1991) Les plantes médicinales du Maroc. 2^e éd., Le Fenec, p. 199
41. Simeon de Bouchberg M, Allegrini J, Beissière C, et al. (1976) Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. *Rivista Italiana* 58: 527-36
42. Teixeira Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A, et al. (2005) Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 97: 305-11
43. Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J (1995) Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J of Magnetic Resonance Analysis* 1: 25-34
44. Ultee A, Kets EPW, Smid E, et al. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the Food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65: 4606-10
45. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1561-8

apportez des
ANTIOXYDANTS DIVERSIFIES
pour vous
PROTEGER DU VIEILLISSEMENT

NUTRISELENIUM est un complément alimentaire qui associe les propriétés antiradicalaires :

- d'**actifs végétaux** : polyphénols de thé, OPC de pépins de raisins, lycopène de tomate.
- de la levure riche en **sélénium**
- de **vitamines** A, C et E.

Vente en pharmacie : ACL 792 441-1

Laboratoires NUTRICLEM
8, rue Joffre, 57100 THIONVILLE
Tél. : 03 82 82 07 97
www.nutriclem.com



Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen, nous nous sommes proposés de déterminer la composition chimique et le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de six espèces végétales : *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoides verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* (L.) et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq., qui font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique traditionnel de la population locale.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques (CPG-Ir, CC, CPG-SM et RMN ¹³C, méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse).

L'étude détaillée des huiles essentielles de *Ziziphora hispanica*, est caractérisée par une prédominance de mono terpènes oxygénés possédant un squelette du type *p*-menthane en position C-3, à savoir la pulégone (77,6 – 79,5%) qui est le composé majoritaire. Les cinq échantillons de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, présentent une composition chimique homogène et stable dominée par le carvacrol (66,7 – 69,5%). Ces huiles essentielles sont très riches en mono terpènes, soit 24 sur 28 composés identifiés. Les cinq échantillons d'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* analysés, sont quantitativement et qualitativement très proches. Douze composés ont été identifiés dans ces huiles essentielles avec du thymol comme composé majoritaire (41,0 et 48,8%). Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, de *Mentha pulegium* et de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* sont caractérisées par une abondance de mono terpènes oxygénés. Le thymol (48,7 à 51,6%) est le composé majoritaire dans l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*. Celle de *Mentha pulegium* est riche en pulégone et en menthone. Ces derniers représentent respectivement 62,7 à 78,0% et 7,7 à 23,1%, soit environ 85,7 à 86,7%. Au total 17 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, dominés par la pulégone (33,3 – 35,5%), suivi de l'isomenthone (17,2 – 24,1%).

Concernant le pouvoir antibactérien des produits naturels de ces plantes sur des souches de référence et celle d'origine hospitalière, l'huile essentielle de *Satureja calamintha* s'est révélée plus active sur la majorité des bactéries par rapport à celles de *Mentha pulegium* et de *Ziziphora hispanica* qui possèdent une action contre seulement les Staphylocoques, l'*E. coli* de référence et la Salmonelle. Pour les autres huiles essentielles à activité antibactérienne considérable, nous avons déterminé trois paramètres : CMI, CMB et QMI. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* reste la plus efficace. Néanmoins, on peut qualifier les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et d'*Ammoides verticillata*, d'être active sur la quasi-totalité des bactéries testées. Les souches *Staphylococcus aureus*, *E. coli* de référence et la *Salmonella typhi* sont les plus sensibles vis-à-vis de ces produits. Par contre les souches *Pseudomonas aeruginosa* se sont révélées très résistantes. Les CMBs obtenues en présence du Tween 80 sont nettement supérieures à celles obtenues en présence de l'agar ou de l'éthanol.

Mots clés : Huiles essentielles, RMN ¹³C, CPG-Ir, CPG-SM, Pouvoir antibactérien, CMI, CMB, QMI, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoides verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* (L.) et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.

Abstract

As part of the recovery of aromatic plants growing wild in Tlemcen region, we proposed to determine the chemical composition and the antibacterial activity of essential oils of six plant species: *Thymus fontanesii* Boiss. and Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoides verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* L. and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* L. Briq. which are an integral part of the traditional therapeutic arsenal of the local population.

The determination of the chemical composition of essential oils has been carried by combination of several chromatographic and spectroscopic methods (GC-RI, CC, GC-MS and ¹³C NMR, a method established and developed by the team « Chimie et Biomasse » of the University of Corsica.

The detailed study of the essential oils of *Ziziphora hispanica*, is characterized by a predominance of C-3 oxygenated *p*-menthane derivatives, namely pulégone (77.6-79.5%) by far the major component. The five samples of the essential oil of *Thymus fontanesii*, present a uniform and stable chemical composition dominated by the carvacrol (66.7-69.5%). These essential oils are very rich in mono terpenes. The five samples of essential oil of *Origanum glandulosum* analyzed are quantitatively and qualitatively very similar. Twelve compounds were identified in these essential oils with thymol as major component (41.0 and 48.8%). The essential oils of *Ammoides verticillata*, *Mentha pulegium* and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* were characterized by abundance of oxygenate mono terpenes. The thymol (48.7 to 51.6%) is the major component of essential oil of *Ammoides verticillata*. The one of *Mentha pulegium* is rich on pulégone and menthone. Those latter's represented respectively 62.7 to 78.0% and 7.7 to 23.1%, so about 85.7 to 86.7%. In total, 21 components were identified on essential oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*, dominated by pulégone (33.3 – 35.5%), followed by isomenthone (17.2 – 24.1%).

Concerning antibacterial activity of natural products of these plants against on reference strains and bacterial strains isolated from clinical, the essential oil of *Satureja calamintha* has been more active on the majority of bacteria compared to the oil of *Mentha pulegium* and *Ziziphora hispanica* who have only activity against the staphylococcus, the reference *E. coli* and Salmonella. For other essential oils which have a considerable antibacterial activity, we have determined three parameters: CMI, CMB and QMI. The essential oil of *Thymus fontanesii* remains the most effective. Nevertheless, we can describe the essential oils of *Origanum glandulosum* and *Ammoides verticillata*, to be active in almost all bacteria tested. The strains *Staphylococcus aureus*, reference *E. coli* and *Salmonella typhi* are more susceptible to the action of these products. However *Pseudomonas aeruginosa* strains have proved to be very resistant. The MLC for different bacterial species in presence of Tween 80 were significantly higher than those observed in presence of agar or ethanol.

Keywords: Essential oils, ¹³C NMR, GC-RI, GC-MS, Antibacterial activity, MIC, MLC, MIQ, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut., *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoides verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Mentha pulegium* L. and *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.

ملخص

في إطار تقييم النباتات العطرية البرية لمنطقة تلمسان، اقترح تحديد التركيب الكيميائي ودراسة القدرة المضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية لسنة أصناف من النباتات *Thymus fontanesii* Boiss.&Reut, *Origanum glandulosum* Desf., *Ammoides verticillata* Desf., *Ziziphora hispanica* L., *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. et *Mentha pulegium* (L.) اللذين يعتبرون جزء لا يتجزأ من الترسانة العلاجية التقليدية لسكان المنطقة.

لقد تم تحديد البنية الكيميائية للزيوت الأساسية، عن طريق التطبيق المشترك لعدة طرق كروماتوغرافية وطيفية (CPG-Ir، CPG-SM، CC، CPG-SM و RMN ¹³C التي هي طريقة وضعت وطورت من فريق الكيمياء والكتلة الحيوية" لجامعة كورسيكا).

الدراسة التفصيلية للزيوت الأساسية لنبات *Ziziphora hispanica*، تميزت بسيادة أحاديات التربان المؤكسجة التي تحتوي على هيكل من نوع *p*-menthane في الوضعية C-3، حيث أن البلقون (77.6-79.5%) كان المركب السائد. أظهرت الخمس العينات من الزيوت الأساسية لنبات *Thymus fontanesii* تركيبة كيميائية متجانسة وثابتة مع سيادة الكرفكول (66.7 – 69.5%). هذه الزيوت الأساسية جد غنية بأحاديات التربان، حوالي 24 من 28 مركب الذي تم التعرف عليها. كانت الخمس العينات المحللة للزيوت الطيارة لنبات *Origanum glandulosum* جد متقاربة نوعيا وكيميا. تم التعرف على اثنا عشر مركبا في هذه الزيوت مع سيادة التمول (41.0 – 48.8%). الزيوت الأساسية للنباتات *Ammoides verticillata*، *Mentha pulegium* و *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* هي جد غنية بأحاديات التربان. التمول (48.7 – 51.6%) هو المركب السائد للزيوت الأساسية لـ *Ammoides verticillata*. الزيوت الطيارة لـ *Mentha pulegium* هي غنية بالبلقون والمنظون. هذا الأخيران يمثلان (7.7 – 23.1%) و (62.7 – 78.0%) على الترتيب، أي حوالي 85.7 إلى 86.7% من التركيبة الكيميائية الإجمالية. في المجموع 21 مركبا تم التعرف عليها في زيت *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* مع وفرة البلقون (33.3 – 35.5%)، متبوع بمركب الإزمون (17.2 – 24.1%).

فيما يخص القدرة المضادة للبكتيريا للمواد الطبيعية لهذه النباتات على السلالات المرجعية وأخرى ذات مصدر استشفائي، أتضح أن الزيت الأساسي لـ *Satureja calamintha* أكثر نشاطا على أغلبية البكتيريا مقارنة بزيوت *Mentha pulegium* و *Ziziphora hispanica* اللذان يمتلكان نشاطا محصورا إلا على Staphylocoques، Salmonelle، و العينة المرجعية لـ *E. coli*. فيما يخص الزيوت الأخرى والتي لها نشاطا مضادا للبكتيريا، لقد قمنا بتحديد ثلاثة عوامل: CMI، CMB، و QMI. الزيت الأساسي لـ *Thymus fontanesii* يبقى الأكثر فعالية. ومع ذلك يمكننا وصف الزيوت الطيارة لـ *Origanum glandulosum* و *Ammoides verticillata* بأنها نشيطة على جميع البكتيريا المرجعية. السلالات *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* و المرجعية لـ *E. coli* هم الأكثر حساسية لهذه المواد. بالعكس إن السلالات *Pseudomonas aeruginosa* أثبتت أنها جد مقاومة لهذه الزيوت الأساسية. إن CMBs المحصل عليها بوجود التوين 80 هم أعلى و بوضوح من CMBs المحصل عليها بوجود الأغار أو الإيثانول.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية، RMN ¹³C، CPG-Ir، CPG-SM، القدرة المضادة للبكتيريا، CMI، CMB، QMI، *Ziziphora hispanica* L.، *Origanum glandulosum* Desf.، *Ammoides verticillata* Desf.، *Mentha pulegium* (L.) و *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.