

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-
-
-UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA-



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En **BIOCHIMIE**
Option : Biochimie appliquée

THEME

Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide.

Présentée par : **LABIOD Ryma**

Directeur de thèse : M^r **AOUADI Saoudi**

MCA, Université d' Annaba

Membres de Jury:

Président : M^r **BOUTEBBA Aissa**

Professeur, Université d'Annaba

Examineur : M^r **KAHOUL Mohamed**

Professeur, Université d'Annaba

Examinatrice : M^{me} **SOUIKI Lynda**

MCA, Université de Guelma

Année universitaire : 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Le présent travail a été réalisé dans le laboratoire pédagogique N° 18, et le Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées (LBMA) dirigé par le professeur LADJAMA Ali.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer mes sincères remerciements et toute ma gratitude à monsieur le professeur **Ladjama Ali**, pour son aide et son soutien à tout les moments. Sa gentillesse et ses grandes qualités humaines ont fait de lui un responsable très spécial.

Cette recherche à été réalisée sous la direction de Monsieur **AOUADI Saoudi**, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité, sa grande simplicité, et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. Je tiens à vous exprimer également infiniment toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Au Professeur **BOUTEBBA Aissa**, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de cette période, surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions. Merci d'avoir cru en moi.

A madame **SOUIKI Linda**, Maitre de conférences à l'université de Guelma, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse.

Au professeur **KAHOUL Mohamed**, C'est un privilège pour nous que vous siégez dans ce Jury malgré vos multiples occupations. Recevez ici cher professeur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'exprime mes remerciements les plus vifs et ma profonde reconnaissance à Mr. **SEBTI Mohamed**, Maître de Conférences à l'Université de Jijel pour toute l'aide qu'il m'a fourni afin de réaliser les analyses chromatographiques de mes huiles essentielles.

Je remercie également toute l'équipe du parc National *TAZA* (Jijel), en particulier Mesdames **RAMDANE Nadia** et **KHELIFI Dounia** et Monsieur **GHERIBI Azzedine** pour leur collaboration, leur disponibilité et leur générosité.

Mes remerciements vont aussi à Madame **MANSOURI** qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que toute son équipe et plus spécialement M^{lle} **GOURI Awatef** qui m'a fait découvrir le monde de bactériologie.

J'oublierai jamais à remercier chaleureusement **Lhadj KASMI Ammar** et **lhadja Baya** qui m'ont proposé de travailler sur cette plante et qui m'ont aidé à la récolter. Merci pour leur orientation et leur disponibilité.

Mes remerciements vont également à nos chers techniciens surtout **ZAIM Mouna**, **TICHATI Lazher**, et Mme **Sakina** pour leurs aides, leurs efficacités et leurs disponibilités.

Merci à tous les professionnels qui m'ont aidé tout au long de ce travail.

« La vie a une fin comme une lumière de bougie s'éteint, mais dans le cœur les souvenirs sont à jamais ancrés »

*A la mémoire de mon cher frère ***HAKIM*** que la douleur de son absence est toujours présente.*

Qu'Allah repose son âme en paix.

Il y a tant de chose que j'aurai aimé te dire ...

Voilà je suis enfin arrivée.. C'est le jour de ma soutenance.. Sans ta présence, mon âme est triste et mon cœur est lourd..

DEDICACE

A mes chers parents,

Qui m'ont tout donné sans rien en retour

Qui ont toujours cru en moi

Je vous aime énormément.

A mes uniques : ma soeur et mon frère,

Mounira et **Hamza** vous êtes la lumière de ma vie sans votre présence je pourrai jamais avancer.

A Hacen, de ta présence et ta gentillesse.

A mon lyad : l'ange de ma vie

A toutes mes tatas : qui n'ont jamais arrêté à m'encourager

A tous mes amis :

- **A Hanene « Hapépé »**, de tous nos moments fantastiques, de toujours me comprendre, et à toutes nos longues discussions.
- **A Nabila**, de tous les moments passés ensemble au laboratoire, de tes heures d'écoute, d'avoir supporté mes humours.
- **A Mehdi**, de ta gentillesse et ton ouverture d'esprit.
- **A Ahmed**, de ta patience, de ta gentillesse, et de ton aide à imprimer tout ces papiers.

A toute l'équipe du Laboratoire 18, j'ai passé avec vous les moments les plus agréables de ma vie.

A tous ceux que j'ai oublié, je m'en excuse et je vous remercie aussi.

A tous qui ont donné sens et importance à ma vie, je vous aime..

MERCI

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
------------------------------------	---

Etude bibliographique

Chapitre I : Caractéristiques botaniques des plantes étudiées

1. Présentation de la famille des lamiacées.....	3
1.1. Place dans la systématique.....	3
2. Le genre <i>Satureja</i>	4
2.1. <i>Satureja calamintha nepeta</i>	4
2.2. Position systématique.....	5
2.3. Description botanique.....	6
2.4. Habitat et culture.....	6
2.5. Utilisation et effet thérapeutique de la plante.....	6
2.6. Propriété de l'huile essentielle.....	6
2.7. Précautions d'emploi.....	7

Chapitre II : Généralités sur les Huiles essentielles

1. Définition.....	8
2. Origine des huiles essentielles.....	8
3. Propriétés physiques.....	9
4. Propriétés chimiques.....	9
5. Composition chimique.....	9
6. Les techniques d'extractions des huiles essentielles.....	13
6.1. Extraction par Hydrodistillation.....	13
6.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	13
6.3. L'expression à froid.....	14
6.4. Extraction au CO ₂ supercritique.....	14
6.5. Extraction aux solvants organiques.....	14

Sommaire

6.6. Hydodistillation par micro- ondes sous vide.....	15
6.7. L'enfleurage.....	16
6.7.1. L'enfleurage à froid.....	16
6.7.2. L'enfleurage à chaud.....	16
7. Facteurs influençant la composition.....	17
8. Méthodes d'identification des huiles essentielles.....	17
8.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	17
8.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)...	18
9. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	18
10. Activités biologique des huiles essentielles.....	19
10.1. Propriétés antibactériennes.....	19
10.2. Propriétés antioxydantes.....	19
10.3. Propriétés antifongiques.....	20
11. Mode d'action des huiles essentielles.....	20
12. Critère de qualité.....	21
13. Toxicité des huiles essentielles.....	22
14. Le marché mondial des huiles essentielles.....	22

Chapitre III : Les composés phénoliques

1. Généralités.....	23
2. Structure et catégories des composés phénoliques.....	23
3. Rôle et intérêt des composés phénoliques.....	25

Chapitre IV : Généralités sur les activités étudiées

1. Activité antimicrobienne.....	26
1.1. Généralités.....	26
1.2. Culture des bactéries.....	26

Sommaire

1.3. Les antibiotiques.....	27
1.4. Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	27
1.5. Notion du bactériostatique et du bactéricide.....	27
2. Activité antioxydante.....	28
2.1. Introduction.....	28
2.2. Le stress oxydant.....	28
2.3. Les radicaux libres.....	28
2.4. Les antioxydants.....	29
2.4.1. Les antioxydants endogènes.....	29
2.4.2. Les antioxydants exogènes.....	30
2.5. Mécanismes d'action des antioxydants.....	31

Partie Expérimentale

1. Matériel végétal.....	32
1.2. Critères de choix de la plante.....	32
1.3. Origine géographique et période de récolte des plantes.....	32
1.3.1. Situation géographique.....	32
1.3.2. Climat de régions de collecte des échantillons.....	33
1.4. Séchage et conservation.....	34
1.5. Détermination de la teneur en eau.....	34
1.6. Tests qualitatifs de la composition chimique.....	35
1.7. Mode d'obtention des principes actifs.....	36
1.7.1. Extraction des huiles essentielles.....	36
1.7.1.2. Description du dispositif d'extraction.....	36
1.7.1.3. Méthode d'extraction.....	36
1.7.1.4. Calcul de rendement.....	36

Sommaire

1.7.1.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/SM.....	37
1.7.2. Préparation des extraits méthanolique.....	38
1.7.2.1. Calcul du rendement.....	38
2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	38
3. Etude thérapeutique.....	39
3.1. Evaluation d'activité antibactérienne.....	39
3.1.1. Souches bactériennes testées.....	39
3.1.2. Vérification de la pureté des souches.....	40
3.1.3. Examens microscopiques.....	40
3.1.3.1. Examen à l'état frais.....	40
3.1.3.2. Coloration de Gram.....	41
3.1.4. Identification biochimique.....	42
3.1.4.1. Recherche de l'enzyme respiratoire : catalase.....	42
3.1.4.2. Identification biochimique par le système API.....	43
3.1.5. Conservation des souches.....	44
3.1.6. Etude de comportement des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques.....	44
3.1.6.1. Antibiogramme.....	44
3.1.6.2. Choix des antibiotiques utilisés.....	45
3.1.7. Etude de comportement des souches isolées vis-à-vis des principes actifs.....	47
3.1.7.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme.....	47
3.1.7.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne par la méthode des microdilutions en milieu liquide.....	48
3.1.7.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	49
3.1.7.4. Caractère bactéricide et bactériostatique.....	50
3.2. Test d'activité antioxydante.....	50

Sommaire

3.2.1. Essai de caractérisation sur plaques CCM.....	50
3.2.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	50
3.3. Evaluation d'activité antifongique.....	52
3.3.1. Provenance des souches.....	52
3.3.2. Activité anti- candida des huiles essentielles et des extraits.....	53
3.3.2.1. Méthode de diffusion sur disque.....	53
3.3.2.2. Méthode de microdilution en milieu liquide.....	53
3.3.3. Effet des huiles essentielles sur les champignons phytopathogènes.....	54
3.3.3.1. Technique de contact direct.....	54
3.3.3.2. Activité antifongique des fongicides du commerce.....	55

Résultats et discussion

1. Tests qualitatifs de la composition chimique.....	56
2. Huiles essentielles.....	57
2.1. Propriétés organoleptiques.....	57
2.2. Rendement.....	57
2.3. Cinétique de l'extraction d'huiles essentielles par hydrodistillation.....	58
2.4. Détermination de la teneur en eau.....	59
2.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/ SM.....	60
3. Rendement en extrait méthanolique.....	67
3.1. Teneur en polyphénols totaux.....	68
4. Activités biologiques.....	71
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	71
4.1.1. Caractères cultureux.....	71
4.1.2. Observation microscopique.....	71
4.1.3. Identification biochimique.....	72

Sommaire

4.1.3.1. Recherche de la catalase.....	72
4.1.3.2. Identification par le système API.....	72
4.1.4. Antibiogramme.....	74
4.1.5. Test de sensibilité aux principes actifs.....	75
4.1.5.1. Technique de l'aromatogramme.....	77
4.1.5.2. Méthode de microdilution en milieux liquide.....	79
4.2. Test d'activité antioxydante.....	81
4.2.1. Essai de caractérisation sur plaques CCM.....	81
4.2.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	81
4.3. Activité antifongique.....	86
4.3.1. Effet anti-candida.....	86
4.3.2. Effet sur des champignons phytopathogènes.....	87
<i>Conclusion et perspectives</i>	94
<i>Références bibliographiques</i>	96
<i>Annexes</i>	115

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

AFNOR : association française de normalisation

BMH: Bouillon Muller Hinton

BN : bouillon nutritif

CCM: Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB: concentration minimale bactéricide

DMSO: dimethyl sulfoxid

DPPH: 2, 2-diphényl -1- picrylhydrazyl.

Extrait MeOH : Extrait Methanolique

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

GN : gélose nutritive

HE: huile essentielle

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu

IR: Infra rouge

MeOH : Methanol

MgSO₄: sulfate de magnesium

MH: Muller Hinton

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

Na₂CO₃: Solution de Bicarbonate de Sodium

PDA: Potato dextrose agar

R : Rendement.

RMN : spectrométrie Résonance Magnétique Nucléaire

S_A: Satureja calamintha nepta collectée de la zone d'Annaba

S_J: Satureja calamintha nepta collectée de la zone de Jijel

Liste des figures

Figure 1 : Photo des parties aériennes de *Satureja calamintha nepeta*.

Figure 2 : Quelques Composés terpéniques des huiles essentielles.

Figure 3: Exemples de composé à radical hydroxybenzoïques.

Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.

Figure 5 : Régions de prélèvement des plantes.

Figure 6 : Réduction du radical libre DPPH.

Figure 7 : Rendement en huile essentielle des deux échantillons SA et SJ.

Figure 8: Cinétique de l'extraction par hydrodistillation d'huiles essentielles des deux plantes : *C.nepeta*.

Figure 9: Teneur en eau de SA et SJ.

Figure 10 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba.

Figure 11 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel.

Figure 12 : Pourcentage des produits majoritaires des huiles essentielles de SA et SJ.

Figure 13: Distribution de la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba.

Figure 14 : Distribution de la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel.

Figure 15 : Rendement en extrait méthanolique des deux échantillons de *S. calamintha nepeta*

Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Figure 17: Taux de phénols totaux des extraits méthanoliques ($\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$).

Liste des figures

Figure 18: Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.

Figure 19: Pourcentage d'inhibition de la Vitamine C.

Figure 20 : Représentation des extraits méthanolique et des huiles essentielles des deux plantes selon leurs IC₅₀.

Figure 21: Effet de l'huile essentielle de SJ sur la croissance de *Fusarium. sp*

Figure 22 : Effet de l'huile essentielle de SJ sur la croissance d'*Aspergillus. sp*

Figure 23 : Effet de l'huile essentielle de SA sur la croissance de *Fusarium. sp*

Figure 24 : Effet de l'huile essentielle de SA sur la croissance d'*Aspergillus. sp*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.

Tableau 2 : Caractéristiques des zones de prélèvements

Tableau 3: Réactifs spécifiques et réactions du criblage phytochimique

Tableau 4: Liste des microorganismes testés

Tableau 5: Valeurs des diamètres critiques des antibiotiques testés

Tableau 6: Résultats de screening phytochimique des parties aériennes de S_A et S_J.

Tableau 7: Résultats d'analyses chromatographiques (CPG/SM) des fractions volatiles de SA et SJ

Tableau 8 : Résultats d'IC₅₀ des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de SA et SJ

Tableau 9: Caractères cultureux des souches bactériennes sur la gélose nutritive

Tableau 10 : Résultats des examens microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram

Tableau 11 : Résultats du test catalase

Tableau 12 : Résultats des tests d'identification par la galerie miniaturisée API 20E

Tableau 13: Résultats d'identification par l'API 20 staph

Tableau 14 : Résultats d'un antibiogramme

Tableau 15: Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de disque et la méthode de microdilution

Tableau 16: Résultat de l'effet anti-candida par la méthode du disque et de la microdilution.

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition mycélienne des deux fongicides

Tableau 18: Pourcentage d'inhibition mycélienne des huiles essentielles de SJ et SA.

Introduction générale

L'utilisation des plantes pour leurs vertus médicinales est une pratique très ancienne. Elle trouve ses origines dans les plus grandes civilisations de l'orient et de l'occident. Comme en témoignent les textes rédigés plusieurs millénaires avant notre époque, les sumériens, les égyptiens, les chinois et les indous, possédaient toute une panoplie de remèdes à base de plantes (**Mazars, 2003 ; Clement ,2005**).

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique, carminative, hépatoprotecteur, antiviraux, anticancéreux (**Bowles, 2004; Lahlou, 2004**) et antioxydants (**Viuda-Martos et al., 2011**).

La composition chimique en huile essentielle est fortement influencée par des facteurs biotiques et abiotiques. Elle dépend des conditions climatiques, saisonnières et géographiques ainsi que de la période de récolte de la plante voire de la technique d'extraction (**Kapoor et al., 2002 ; Baydar et al., 2004 ; Colombo et al, 2013**). En outre, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est en relation directe avec la composition et la concentration en composés volatils, le type de microorganismes cibles, les conditions et les méthodes de traitement (**Baydar et al., 2004**).

Les espèces réactives oxygénées et azotées ROS / RNS sont produites en continu dans le corps humain et elles sont contrôlées par les enzymes endogènes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, la catalase). Quand il y'a une surproduction de ces espèces, suite à une exposition à des substances oxydantes externes ou un déséquilibre dans les mécanismes de défense, les dommages aux biomolécules majeures (ADN, acides aminés, lipides, protéines) peuvent survenir, ce qui donne lieu au stress oxydatif qui est impliqué dans diverses pathologie à savoir le cancer, le diabète, le vieillissement et plusieurs autres maladies (**Aruoma,1998**).

Au fil du temps, la résistance des microorganismes aux antibiotiques se manifester de plus en plus, et l'utilisation de produits chimiques comme agents antimicrobiens a donné naissance à des maladies infectieuses graves (**Davis, 1994; Service, 1995**).

Introduction générale

Par ailleurs, l'application des fongicides dans la lutte contre les champignons phytopathogènes a conduit à l'apparition d'un grand nombre de problèmes environnementaux et de santé, du fait qu'ils sont eux-mêmes cancérigènes, tératogènes, et hautement toxiques avec des périodes de dégradation assez longues (Lingk, 1991, Tian *et al.*, 2011).

Au cours de ces dernières années, la recherche de nouveaux procédés basés principalement sur l'utilisation de molécules extraites de façon naturelle a connu un regain d'intérêt dans la plupart des recherches scientifiques. De ce fait nous nous sommes intéressés à étudier une plante de l'est algérien dont le but est d'exploiter de nouveaux composés comme alternatives aux produits chimiques.

La présente étude, vise à évaluer les activités antibactérienne, antioxydante et antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques issus des parties aériennes de *Satureja calamintha nepeta* récoltée à Annaba (Berrahel) et à Jijel (Tahir).

Dans une première partie de ce travail, nous présenterons un rappel bibliographique sur les huiles essentielles, les polyphénols et leurs relations avec certaines activités biologiques.

Dans une deuxième partie nous donnerons :

- Le rendement en huiles essentielles et extraits méthanoliques de *Satureja calamintha nepeta* récoltée à Annaba et aussi à Jijel.
- Une analyse de la composition chimique de ces huiles par CPG/SM, et un dosage des polyphénols des extraits méthanoliques .
- Une évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits par le test de DPPH.
- L'étude des activités antibactérienne et antifongique.

Dans une dernière partie nous discuterons les résultats obtenus au cours de cette étude.

Aperçu
Bibliographique

1. Présentation de la famille des lamiacées

La famille des lamiacées ou labiées aussi nommée labiacées (**Guignard, 1998**), est considérée comme l'une des principales familles méditerranéennes à essences (**Guignard, 1996**). Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones comprend environ 258 genres et 6970 espèces (**Botineau, 2010**).

La famille des lamiacées est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques. Leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portant des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses. Le calice est synsépale, bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle à tube très développé, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant une lèvre inférieure (**Guignard 2001 ; Carr, 2004**). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine (**Guignard, 1998**).

1.1. Place dans la systématique

La place des lamiacées dans la classification systématique botanique est la suivante (**Quezel et santa, 1963 ; Guignard, 2001, Bray, 2005**):

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Série : Superovariées tétracycliques

Super ordre : Tubiflorales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Synthèse bibliographique

Sous-famille : Népétoïdées

2. Le genre *Satureja*

Le genre *Satureja* constitue environ 200 espèces d'herbes et d'arbustes, souvent aromatiques. Il est largement distribué dans la région de la Méditerranée, l'Asie et l'Amérique boréale (Cantino et al., 1992 ; Skocibusic et al., 2006).

Cette herbacée est annuelle sous des climats tempérés mais vivaces dans les régions arides, ensoleillées, pierreuses et rocheuses. Beaucoup de ce genre sont bien connus pour leur caractère aromatique et médicinal. Ce genre est caractérisé par des parties aériennes ayant un goût distinctifs et peuvent être ajoutées à plusieurs préparations culinaires ou utilisées en médecine traditionnelle, pour traiter diverses affections (Gulluce et al., 2003).

2.1. *Satureja calamintha nepeta*

L'espèce *calamintha nepeta* appartient à la famille de Labiatea bien représentée et répandue dans toute la région méditerranéenne. Cette plante est connue pour ses utilisations médicinales comme stimulante, tonique, antiseptique et antispasmodique. Elle est odorante et de ce fait elle est utilisée dans diverses recettes culinaires (Simonpoli, 1993) ainsi comme infusion (Ordóñez et al., 2006).

- **Nomenclature**

Le nom *Satureja* dérive du latin « saturare » qui indique nourrir ou « satura » qui indique pot à fleur (Vârban et al., 2009).

Nom botanique : *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.

Nom français : Sarriette, baume sauvage, pouliot de montagne.

Nom italien : la nepitella.

Nom vernaculaire : Nabta, tourte, menta.

- **Synonymes**

Melissa nepeta L.

Calamintha nepeta (L.) Savi

Synthèse bibliographique

Calamintha officinalis var. *nepeta* (L.)

Satureja calamintha var. *nepeta*

Satureja nepeta (L.) Sheele

Thymus nepeta (L.) Sm

2.2. Position systématique (Quezel et Santa, 1963)

Domaine : Eucaryote

Règne : plante

Classe : Magnolio

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Satureja*

Espèce : *calamintha nepeta*

Sous espèce : *calamintha nepeta* subsp. *nepeta*



Sans grossissement



Avec grossissement (×3)

Figure1: Photo des parties aériennes de *Satureja calamintha nepeta* (Labioud, 2012)

Synthèse bibliographique

2.3. Description botanique

La sarriette regroupe des plantes annuelles ainsi que des plantes herbacées et sous-arbrisseaux vivaces. La sarriette des montagnes.

La sarriette annuelle atteint une taille de 30–40 cm et est très ramifiée depuis la base. Elle a des feuilles lancéolées et pointues à leur extrémité. Les tiges sont plus ou moins velues. Les fleurs, de couleur blanche à mauve, insérées à l'aisselle des feuilles, fleurissent de juillet à septembre (**Speck et al, 2008**).

2.4. Habitat et culture

Originaire d'Europe du Sud, la sarriette vivace pousse dans les lieux ensoleillés et bien drainés. Elle est souvent cultivée comme plante d'agrément. Les fleurs sont récoltées en été (**Iserin, 2001**). On la rencontre dans les sous-bois mais aussi sur les terrains incultes, le bord des routes et dans le tell, surtout en montagne, jusqu'à 1500 mètres d'altitude (**Quezel et Santa, 1963**).

2.5. Utilisation et effet thérapeutique de la plante

La sarriette possède des vertus médicinales. Elle combat les flatulences, stimule la digestion, et traite les coliques. Elle a un effet «réchauffant» et on la préconise en cas d'infections des voies respiratoires (bronchite) (**Iserin, 2001**).

La plante est ainsi préconisée pour traiter les troubles digestifs, fatigue psychique, asthénie, infections intestinales, manque de concentration, parasites, diarrhée, arthrite, douleurs, problèmes de la libido, rhumatismes, maladies infectieuses, cystite, et stress (**Buronzo, 2008**).

2.6. Propriété de l'huile essentielle

L'huile essentielle possède des propriétés antibactériennes très importantes : elle est utile pour lutter contre les infections respiratoires et urinaires. En gargarismes, elle prévient et soigne les infections de la gorge.

- Elle favorise la digestion, stimule la production de bile, évite les fermentations intestinales, calme les douleurs gastriques d'origine nerveuse, les diarrhées et les crampes abdominales. Elle agit aussi contre les parasites intestinaux.

Synthèse bibliographique

- Avec son parfum frais, piquant et herbacé, elle stimule les glandes surrénales.
- Elle agit comme un tonique et stimulant sexuel (en particulier pour les hommes).
- Diluée et utilisée en massages ou en frictions, elle tonifie en cas de fatigue physique et intellectuelle, permet de lutter contre le stress et renforce le système immunitaire. En diffusion dans l'air ambiant, elle stimule les capacités intellectuelles (**Buronzo, 2008**).

L'huile essentielle est aussi connue pour son effet carminatif, expectorant, et astringent. Elle a été utilisée en traitement contre les troubles d'estomac, et en traitement de l'anorexie (**Vârban et al., 2009**).

2.7. Précautions d'emploi

Cette huile doit être utilisée sur une période courte, car elle peut irriter la peau, surtout si elle est utilisée pure. Elle est interdite aux enfants, et déconseillée aux femmes enceintes, à celles qui allaitent et aux personnes ayant la peau sensible. Il faut éviter de la mettre en contact avec les yeux et les muqueuses (**Buronzo, 2008**).

1. Définition

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celui-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) (**Rubiolo et al., 2010**). Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (**Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008**). Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lequel les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (**Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007**).

2. Origine des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques, tous leurs organes végétaux, peuvent contenir de l'huile essentielle.

- les fleurs: oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang) ;
- les feuilles: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin ;
- les organes souterrains: racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore) ;
- les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- les graines : noix de muscade;
- le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores.

Synthèse bibliographique

La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%.

Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les labiateae (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic), les asteraceae (camomille, absinthe), les myrtaceae (eucalyptus, melaleuca, myrte, girofle), les lauraceae (cannelle, laurier).

Beaucoup de végétaux contiennent des huiles essentielles ou des substances voisines mais en pratique peu d'espèces sont utilisées (**Hurtel, 2006**).

3. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés de phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part (**Bruneton, 1993**).

4. Propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (on parle d'eau aromatique), (**Bruneton, 2008 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

5. Composition chimique

Sur le plan chimique, les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexes, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, -pinène, -terpinène) et les sesquiterpènes (-caryophyllène, -humulène, -bisabolène) (**Croteau et al., 2000**).

Synthèse bibliographique

5.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), **les sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), **les diterpènes**, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). **Les tetraterpènes** sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. **Les polyterpènes** ont pour formule générale : $(C_5H_8)_n$ ou n peut être de 9 à 30

Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (**Bakkali et al., 2008**).

- Les monoterpènes

Sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.E, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène, o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique :

- Alcools : géraniol, menthol.
- Aldéhydes : géraniol, citronellal, sinesal.
- Cétones : carvone, menthone, -vétinone.
- Esters : acétate de géranyle, acétate de linalyl, acétate de cédryle, acétate -terpinyle
- Peroxydes : ascaridol, allicine (**Bruneton, 2008**).

- **Les sesquiterpènes** il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : -caryophyllène, -bisabolène, -humulène, -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 1999**).

5.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes. La biosynthèse par voie phénylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine, Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins représentés dans l'HE que

Synthèse bibliographique

les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae : (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde) (Bruneton, 1999).

5.3. Composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés).

Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînaient par la vapeur d'eau (Bruneton, 1999).

5.4. Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle.

Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle. Cette variation chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Romarin officinalis*, et *l'eucalyptus* (Zhiri et baudoux, 2005).

Synthèse bibliographique

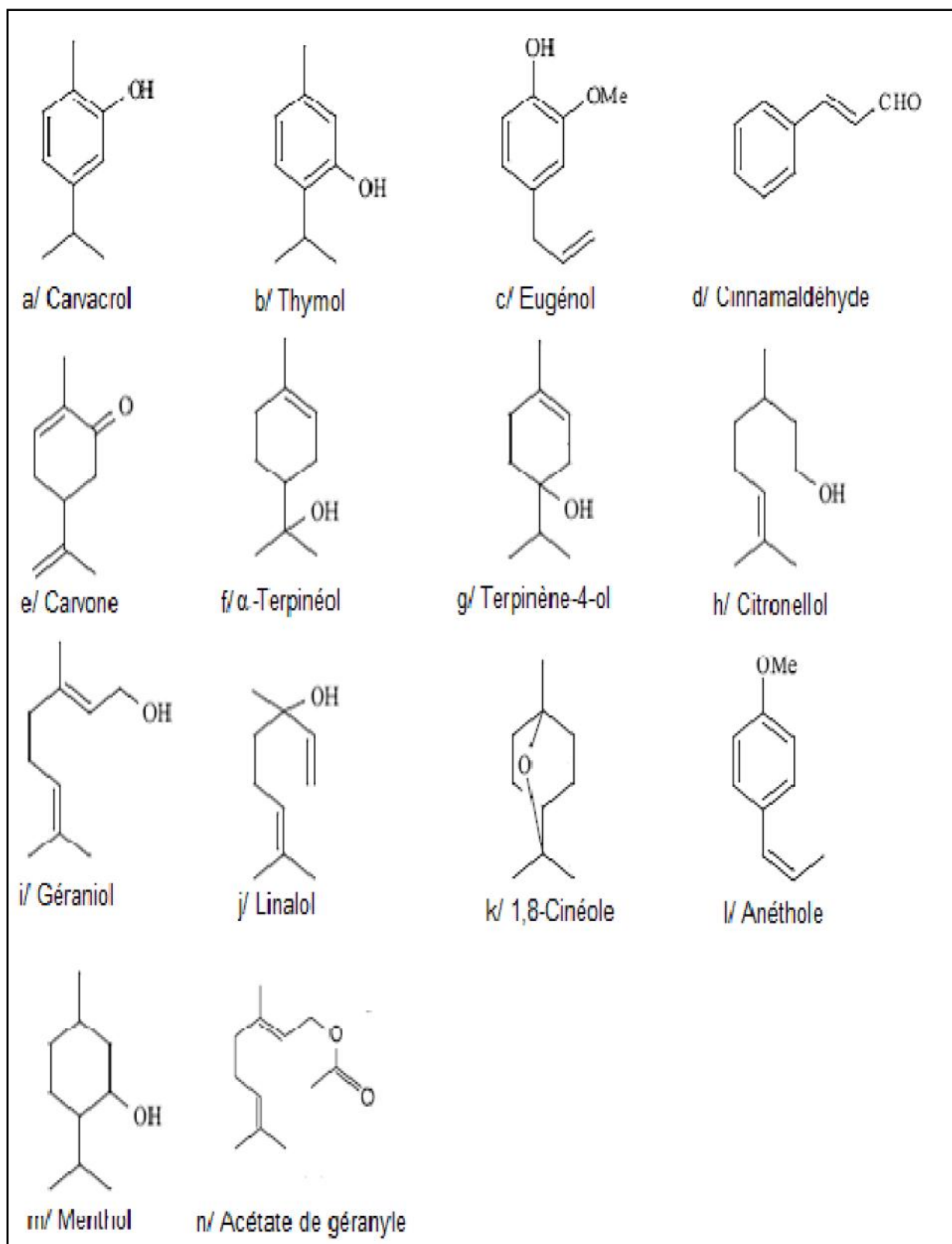


Figure 2 : Quelques composés terpéniques des huiles essentielles (Kalemba et Kunicka, 2003)

Synthèse bibliographique

6. Les techniques d'extractions des huiles essentielles

6.1. Extraction par Hydrodistillation

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme les HE sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles (**Fasty, 2007**).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevint donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation (**Franchomme, 1990**).

6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (**Dastmalchi et al., 2008**).

Synthèse bibliographique

6.3. L'expression à froid

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (**Chaintreau et al., 2003**).

6.4. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73,8 bars et T = 31,1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (**Pellerin, 2001**).

En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils.

Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (**Richard H, 1992**).

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (**Wenqtang et al., 2007**).

6.5. Extraction aux solvants organiques

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants et leur manque de sélectivité peuvent

Synthèse bibliographique

entraîner de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines.) dans le mélange pâteux et imposer par conséquent une purification ultérieure (**Shellie et al, 2004**).

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait (**Wan et al., 1995**).

6.6. Hydodistillation par micro- ondes sous vide

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction ou SFME) a été conçue pour des applications en laboratoire pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques (**Chemat et al., 2004**). Cette technologie est une combinaison de chauffage micro-ondes et d'une distillation à la pression atmosphérique. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes, sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par le végétal. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, le procédé SFME semble être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydro-distillation ou l'entraînement à la vapeur (**Lucchesi et al., 2004^a, Lucchesi et al., 2004^b**).

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (**Bendahou et al., 2007, Lucchesi et al., 2007**) Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Lucchesi et al., 2004^a**).

6.7. L'enfleurage

La procédure met à profit la liposolubilité des composés odorants des végétaux dans les corps gras et qui permet l'exploitation des organes fragiles.

Le matériel végétal est mis en contact avec des graisses, ces dernières ayant une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

6.7.1. L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction, n'est plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur.

L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (**Möller, 2008**).

6.7.2. L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (**Möller, 2008**).

7. Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svobda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2003).

8. Méthodes d'identification des huiles essentielles

8.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (Arpino et al., 1995).

La CPG est aussi une méthode d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (DSM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60%. En effet, le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantification réelle avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique (Bicchi et al., 2008).

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température programmé (indice de rétention) (Lawrencet, 2000).

Synthèse bibliographique

8.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

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). La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux de composés de référence, contenu dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales (**Adams, 2001**).

Dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (**Lianga et al., 2004; Senatore et al., 2004**).

Il existe d'autres méthodes d'analyse, qui ont pour objet l'identification qualitative et quantitative, des différents constituants d'une huile essentielle on cite : l'HPLC, l'RMN, l'IR.

9. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées pour :

- Leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums ;
- Des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche ;
- Dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires ;
- Des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques; et aussi des propriétés antioxydantes;
- Un effet anesthésiant pour soigner les douleurs rhumatismales;
- Action stimulante sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication ;
- Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif, relaxant et déstressant ;
- Effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales (**Daniel, 2006; Hüsnü et Buchbauer, 2010**).

Synthèse bibliographique

- Plusieurs études ont montrés que l'utilisation des huiles essentielles peut diminuer les troubles menstruels, le stress post-partum ainsi que les troubles ménopausiques (**Lardry, 2007**).

10. Activités biologique des huiles essentielles

10.1. Propriétés antibactériennes

Les H.E les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autre préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E-coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (**Pauli, 2001**).

10.2. Propriétés antioxydantes

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard F, 1992**).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes de propriétés selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne auto-catalytique de l'oxydation (**Multon, 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (**Madhavi et al., 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet et Lacroix, 2007**).

Synthèse bibliographique

10.3. Propriétés antifongiques

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge.

Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988).

Il a été démontré que l'activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique : Phénols Alcools Aldéhydes Cétones Ethers Hydrocarbures. Parmi les aldéhydes, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actifs (Yen et Chang, 2008).

11. Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004).

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

* 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.

Synthèse bibliographique

* destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Daferera et al., 2003**).

12. Critère de qualité

Selon les recommandations françaises (**2008**), pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, présentées des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon satisfaisante.

Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HE sont définies sur le plan français par des normes établies par l'AFNOR, élaborées par une commission spécifique. Ces normes sont établies en étroite collaboration avec les producteurs ainsi que les importateurs et sont le fruit d'un échange entre experts.

a. Dénomination botanique

L'origine végétale du produit doit être définie avec précision par la dénomination scientifique botanique selon les règles.

b. Conditions de production de la plante

Les matières premières végétales sont obtenues à partir de plantes de collecte ou de plantes cultivées, ces dernières pouvant être issues de semis ou de bouturage.

c. Partie de la plante utilisée

Les HE peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux les fleurs, les feuilles, bien que cela soit moins habituel, dans les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits secs, ou les graines.

d. Précision du chimiotype (ou chémotype)

Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimiotypes qui trouvent leur origine dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents.

e. Mode d'obtention de l'huile essentielle

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite.

Synthèse bibliographique

f. Identification et analyses chromatographiques

L'analyse des HE, l'identification des constituants, la recherche d'éventuelles falsifications peuvent se faire à l'aide de techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse sur phases stationnaires polaires, apolaires, couplée avec une détection par spectrométrie de masse.

13. Toxicité des huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles n'est pas à prendre à la légère. Les effets toxiques sont très variables d'une huile essentielle à l'autre et dépendent beaucoup de la sensibilité des consommateurs.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de molécules, dont on peut distinguer deux groupes : les terpènes et les aromatiques.

Les terpènes et leurs dérivés sont formés d'unités isopréniques (unités pentacarbonnées ramifiées). Pour cette gamme de composés, seules les molécules de poids faible, entre 10 et 20 atomes de carbones, sont présents dans les huiles essentielles. Par conséquent, elles peuvent plus facilement pénétrer notre peau et ainsi provoquer des allergies et des inflammations.

Cependant, ces effets sont provoqués majoritairement par d'autres composés comme les lactones sesquiterpéniques, l'aldéhyde cinnamique et les phénylpropanoïdes.

Les huiles essentielles contenant certains composés aromatiques, notamment les phénols et dérivés, comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol, sont à utiliser avec précautions. Ces molécules peuvent provoquer de sévères irritations sur les peaux sensibles ou les muqueuses. De plus, les cellules du foie peuvent se trouver altérées, lorsque les doses prises sont élevées et que la durée de la cure est longue.

D'autres familles de composés s'avèrent être également toxiques. Ceux sont les cétones, les aldéhydes et quelques esters. Les conséquences sur notre santé vont de la photosensibilisation et aux risques d'avortement, dans les cas les plus graves (**Cazzola et Doublet, 2015**).

14. Le marché mondial des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles peuvent, soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies), soit être utilisées en l'état. Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %) (**USAID, 2008**).

1. Généralités

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Havsteen, 2002). Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

2. Structure et catégories des composés phénoliques

2.1. Les acides phénoliques : Cette classe est divisée en deux sous-classes :

2.1.1. Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les hydroxybenzoïques incluent plusieurs molécules et les plus fréquentes sont ; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque

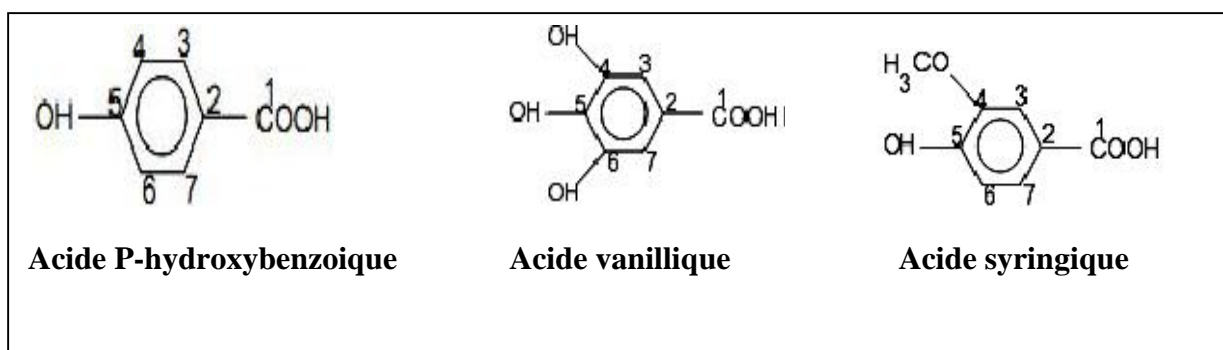


Figure 3 : Exemples de composé à radical hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Synthèse bibliographique

2.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, induisent une réactivité chimique importante de ces molécules, par exemple on cite l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, et l'acide sinapique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ce sont des substances naturelles très répandues dans la famille des Compositae (**Eberhard et al, 2005**).

Les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B formant généralement un hétérocycle oxygéné C. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C (**De Rijke et al., 2006**).

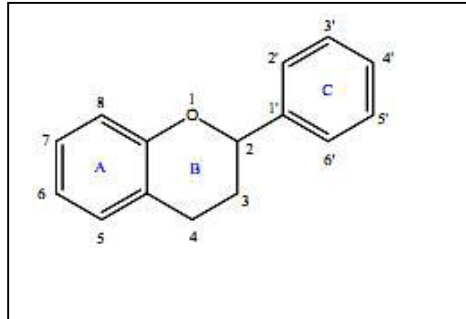


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes (**Krishna et al., 2001**)

2.3. Les tanins

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et à de nombreux éléments minéraux (**Alkurd, 2008**).

2.4. Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Iwueke, 2008**).

Synthèse bibliographique

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Madhavi, 1996**).

2.5. Les anthocyanidines

Sont des dérivés du flavylum ou 2-phényl- benzopyrylium, ils portent des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Jaakola, 2013**).

3. Rôle et intérêt des composés phénoliques

- **Chez les végétaux**

Les polyphénols ont un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance.

- Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).
- Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs.
- Représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes.
- Interviennent dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (**Stalikas, 2007**).
- Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexine permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries chez les plantes (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).

- **Chez les humains**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Fleuriet et al., 2005**).

- Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine.
- Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**).

1. Activité antimicrobienne

1.1. Généralités

Un microbe, ou micro-organisme, fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microbes sont indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments ainsi que des composants pharmaceutiques et industriels. D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Enfin les microbes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires (**Nicklin et al., 2000**).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Billing et Sherman, 1998**).

1.2. Culture des bactéries

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (**Nauciel et Vildé., 2005**).

Synthèse bibliographique

1.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**).

1.4. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (**Singh et Barrett, 2006**).

1.5. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Quand l'ATB inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'ATB provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide (**Haddouchi et al., 1999**).

- **L'effet bactériostatique**

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'y a plus des germes microbiens visibles (**Muanda, 2010**).

- **L'effet bactéricide**

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'ATB utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture (**Muanda, 2010**).

2. Activité antioxydante

2.1. Introduction

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (**Tarnawski et al., 2005**).

L'appellation ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$, radical hydroxyl OH^{\cdot} , monoxyde d'azote NO^{\cdot} , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite $ONOO^-$ (**Favier, 2003**).

Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélèrent le processus de vieillissement (**Dasgupta et De, 2007**).

2.2. Le stress oxydant

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (**Smirnoff, 2005**).

2.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

Synthèse bibliographique

Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant la phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres (**Hubert, 1998**).

2.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes (**White, 1994**).

Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (**Poknory, 2001**).

Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (**White, 1994**).

2.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

- **La superoxyde dismutase (SOD)** : accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)] (**Piquet et Hebuterne, 2007**).

Synthèse bibliographique

- **La catalase**: présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Piquet et Hebuterne, 2007**).

- **La glutathion peroxydase (GPx)** : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (**Piquet et Hebuterne, 2007**).

2.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Wang et al., 2003**).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, la β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Les sources alimentaires de ces antioxydants naturelles sont présentées dans le **tableau 1**.

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande

2.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- Système de défense primaire : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- Système de défense secondaire : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (Buettner, 1993).

Etude Expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériel végétal

La plante qui a fait objet dans notre étude est *Satureja calamintha nepeta*.

1.2. Critères de choix de la plante

Le choix de notre plante est basé sur une recherche approfondie dans la littérature et une enquête ethnobotanique, au cours de laquelle plusieurs personnes ayant une vaste connaissance de la façon d'utiliser cette plante ont été interrogées. Cette plante est largement utilisée dans la région de Jijel pour son pouvoir curatif et guérisseur.

Les critères de choix dans notre études sont par rapport à :

- Valorisation de la flore algérienne ;
- Disponibilité de la plante;
- Son utilisation dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies d'origine microbienne;
- La présence de substances aromatiques (huiles essentielles) avec un rendement satisfaisant ;
- La recherche de nouvelles molécules bioactives.

1.3. Origine géographique et période de récolte des plantes

Les parties aériennes de *Satureja calamintha nepeta* ont été récoltées de deux régions du nord est Algérien : Annaba et Jijel. La récolte était entreprise manuellement au mois de septembre 2012 durant laquelle la plante était en pleine floraison.

1.3.1. Situation géographique

Notre zone de récolte se situe aux nord-est de l'Algérie et englobant deux wilayas : Annaba et Jijel. La wilaya d'Annaba est d'une superficie de 1439 Km², située à 246 Km à l'est de Jijel et à environ 80 Km à l'ouest de la frontière tunisienne. La wilaya de Jijel qui fait partie du Sahel littoral de l'Algérie occupe une superficie de 2396 Km² (**Figure 5**). Les caractéristiques des zones de prélèvements sont illustrées dans le **Tableau 2**.

Partie expérimentale

Tableau 2 : Caractéristiques des zones de prélèvements

Caractéristiques	Altitude	Longitude	Latitude
Régions			
Berrahel (Annaba)	30 m	7°27 11" Est	36°50 7" Nord
Tahir (Jijel)	47 m	5° 53 54 Est	36° 46 19 Nord



Figure 5 : Régions de prélèvement de la plante (Google Maps)

1.3.2. Climat des régions de collecte des échantillons

La plante utilisée dans notre étude a été collectée d'Annaba et de Jijel. La ville d'Annaba est caractérisée par un climat sec et tempéré en été et pluvieux et froid en hiver. La neige est rare mais présente sur les hauteurs de Séraïdi. Les moyennes de température et de pluie par an sont 18.4° et 712 mm respectivement.

Partie expérimentale

La ville de Jijel bénéficie d'un climat tempéré et humide avec un hiver doux caractéristique des zones méditerranéennes et une pluviométrie importante, comme toutes les villes de la moitié Est du littoral algérien. Les moyennes de température et de pluie par an sont 18.2 °C et 814 mm respectivement.

1.4. Séchage et conservation

La plante, fraîchement récoltée, est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant dix jours, puis broyée au mortier. Les poudres obtenues sont ensuite conservées dans des flacons en verre hermétiquement fermés jusqu'à l'utilisation ultérieure pour les différentes extractions des principes actifs. Notant qu'une quantité de plante fraîche est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

1.5. Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est connue sous le nom de dessiccation par évaporation ou méthode gravimétrique ou pondérale. Le procédé de dessiccation est réalisé à une température de 105°C ± 5°C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Twidwell et al., 2002**).

- Mode opératoire

- Sécher des cupules vides à l'étuve durant 15 minutes à 105±5°C ;
- Laisser refroidir dans un dessiccateur ;
- Peser dans chaque cupule préalablement tarée 2g d'échantillon et les placer dans l'étuve réglée à 105±5°C pendant 3 heures ;
- Retirer les cupules de l'étuve, et les placer dans le dessiccateur ;
- Peser les cupules après refroidissement. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 min).

- Expression des résultats

Le taux d'humidité est exprimé en (%) selon la formule suivante:

$$H\% = (P_1 - P_2 / P_1) \times 100$$

H%: Taux d'humidité exprimé en pourcentage

P₁: Poids de la plante fraîche (g)

Partie expérimentale

P₂: Poids de la plante après séchage (g)

1.6. Tests qualitatifs de la composition chimique

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante.

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation de quelques grands groupes chimiques ou métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, sucres réducteurs, tanins, coumarines, polyphénols, anthocyanes, saponosides, terpènes). Ces métabolites sont des substances douées des différentes propriétés thérapeutiques exploités dans les traitements des différentes pathologies. Cette analyse est effectuée sur des drogues végétales sèches et/ou fraîches selon la méthodologie décrite par chaque auteur.

Le **tableau 3** représente les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau 3 : Réactifs spécifiques et résultats d'un criblage phytochimique

Groupes chimiques	Réactifs	Indicateur de résultat positif	Référence
Alcaloïdes	Mayer	solution trouble	Bouquet , 1972
Flavonoïdes	Acide chlorhydrique- Ammoniaque	coloration jaune clair	Okmu, .,2005
Saponosides	Indice mousse	Apparition d'une mousse	Rizk, 1982
Tanins galliques	chlorure ferrique	coloration bleue noire	Rizk, 1982
Tanins catéchiques	chlorure ferrique	coloration brune verdâtre	Rizk, 1982
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	précipité rouge brique	Trease et Evans, 1987
Stérols et terpènes	anhydride acétique- CHCl ₃ -H ₂ SO ₄	cercle violet ou marron	Dohou et al., 2003
Coumarines	NaOH dilué- lumière UV	fluorescence jaune	Rizk, 1982

Partie expérimentale

1.7. Mode d'obtention des principes actifs

1.7.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. Les rendements sont déterminés par rapport à la matière sèche.

1.7.1.2. Description du dispositif d'extraction

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon. Celui-ci est en général en verre pyrex dans lequel on place le matériel végétal séché et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur qui reçoit les produits de la distillation.

1.7.1.3. Méthode d'extraction

Dans un ballon, 50 g des parties aériennes de la plante sont mises en contact avec 500 ml d'eau distillée dans le ballon. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2h. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile essentielle obtenue est ensuite placée sur un desséchant de type sulfate de magnésium ($MgSO_4$), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau. Elle est gardée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à analyse et utilisation (Willem, 2004).

1.7.1.4. Calcul de rendement

Le rendement en huile essentielle (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P) (Carré, 1953). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P'/P) \times 100$$

R% : Rendement de l'huile en (%)

P' : Poids de l'huile en (g)

Partie expérimentale

P : Poids de la plante en (g)

1.7.1.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/ SM

L'analyse chimique des huiles essentielles des deux échantillons de *Satureja calamintha nepeta* a été réalisée au laboratoire du département de biologie végétale et animale de l'université de Ouled Aissa à Jijel.

- Principe

Le profil chimique des huiles essentielles a été mis en évidence par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM). Le principe de cette technique repose sur la différence de répartition des constituants d'un mélange complexe entre la phase mobile (gaz vecteur) et la phase stationnaire de la colonne.

- Mise en œuvre pratique

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Shimadzu QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique (EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode SCAN. La colonne utilisée est de type DB-5 ms de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Les injections ont été faites en mode SPLIT. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 2ml/min. Le gradient de température utilisé est de 40 à 220°C à raison de 5°C min⁻¹ en mode SPLIT. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert sont de 250°C. La température du four a été programmée comme suit : la température initiale de la colonne est de 40°C maintenue en isotherme pendant 10 min puis augmentée à raison de 5°C/min pour atteindre 220°C. Le volume injecté de l'huile essentielle diluée à 10% dans l'hexane est de 0,1µl. Les composés des huiles correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés, par comparaison de leurs temps de rétention (Tr) avec ceux d'une série témoins d'alcane linéaires (C9-C28), par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une banque de données informatisées ESO 2000, de la bibliothèque NIST 05 (National Institute for Standard Technology) et par comparaison avec des données de la littérature (**Adams, 2001**).

Partie expérimentale

1.7.2. Préparation des extraits méthanoliques

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Calamintha nepeta* a été préparé à l'aide d'un Soxhlet selon la méthode décrite par (Sokmen *et al.*, 1999). Le matériel végétal broyé (10 g) est placé dans une cartouche qui sera mise en contact avec le solvant d'extraction qui est le méthanol absolu (100 ml) à 60°C pendant 6h. La cartouche est ensuite retirée et le solvant est filtré sur papier Whatman (n°3), puis concentré grâce à un évaporateur rotatif (BÜCHI) à une température de 45°C. L'extrait sec est conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

1.7.2.1. Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait méthanolique de la plante est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P/P_0) \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

P: Poids en gramme de l'extrait sec résultant

P₀: Masse en gramme du matériel végétal à traiter

2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La quantification de la teneur phénolique totale de l'extrait méthanolique a été déterminé en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, tel que décrite par Slinkard et Singleton (1977) et rapportée par Gulluce *et al.*, (2006). Pour une meilleure détermination du taux des phénols totaux de chaque extrait, trois répétitions ont été appliquées, dans ce cas, et l'écart type fut calculé.

- Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait (Boizot et Charpentier, 2006).

Partie expérimentale

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. En milieu alcalin, le réactif du Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daels-rakotoarison, 1999).

- Mise en œuvre pratique

Dans une fiole jaugée, 0.1 ml de l'extrait en solution contenant 1000µg d'extrait sec (1mg d'extrait dissout dans 100µL de méthanol), est ajouté à 46 ml d'eau distillée et 1 ml de la solution de Folin Ciocalteu. Après agitation intermittente de 3 minutes, 3mL de solution de Na₂CO₃ à 2% sont ajoutés.

Après 2 h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 760 nm.

Les mêmes démarches sont appliquées pour l'acide gallique avec des concentrations de 0 à 1000 µg / 0,1 ml.

Les mesures d'absorbance ont été faites contre un blanc.

Le taux de polyphénols totaux a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax+b$), dont l'acide gallique est utilisé comme standard de référence.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

3. Etude thérapeutique

3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le test de susceptibilité des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *Satureja calamintha nepeta* des deux régions est effectué selon deux méthodes différentes: la méthode de diffusion sur disque en milieu de Mueller-Hinton comme un test préliminaire et qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne et la méthode des microdilutions qui a pour but de déterminer la concentration inhibitrice minimale CMI à partir d'une gamme de concentrations dans des milieux de culture convenables.

3.1.1. Souches bactériennes testées

Pour mettre en évidence la capacité antibactérienne des fractions huileuses et des extraits de la sarriette, un total de dix souches microbiennes a été utilisé (3bactéries à Gram+ et 7 à Gram-) comme montré dans le **tableau 4**. Quatre souches sont des bactéries de référence de type ATCC (American Type Culture Collection) alors que les autres ont été isolées d'un milieu clinique à partir des prélèvements différents : urines, crachat et sperme.

Partie expérimentale

L'isolement et l'identification des souches cliniques ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée, et celles de référence ont été fournies par l'institut Pasteur d'Alger.

Tableau 4 : Liste des microorganismes testés

Type	Espèce	Famille
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	
	<i>Enterobacter cloacea</i>	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Serratia marcescens</i>	
	<i>Serratia odorifera</i>	
Bactéries à Gram positif	<i>Enterobacter feacalis</i> ATCC 29212	<i>Micrococaceae</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	

3.1.2. Vérification de la pureté des souches

Cette étape est très importante, puisqu'elle facilite la caractérisation des souches bactériennes. Pour la purification des souches il faut qu'après incubation et à partir de colonies isolées sur les différents milieux sélectifs utilisés, on vérifie immédiatement la pureté par la coloration de Gram et le test de la catalase.

3.1.3. Examens microscopiques

3.1.3.1. Examen à l'état frais

- Principe

Cet examen nous permet d'apprécier la forme, la mobilité, le mode de regroupement, et l'abondance des bactéries.

Partie expérimentale

- Mise en œuvre

- Déposer aseptiquement sur une lame porte objet, quelques gouttes d'eau physiologique.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une à deux colonies à partir du milieu contenant de la gélose nutritive.
- Emulsionner dans la goutte d'eau physiologique.
- Recouvrir d'une lamelle tout en évitant la formation des bulles d'air.
- Observer sous microscope optique grossissement ($\times 40$).

- Lecture

A l'issue de cet examen microscopique, on peut observer la forme, le mode de regroupement et la mobilité des souches (**Carbonelle *et al.*, 1987**).

3.1.3.2. Coloration de Gram

- Principe

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram+) ou la fuchsine (Gram-). Cette opération se déroule en sept étapes.

- Mise en œuvre pratique

- Réaliser un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne, agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.
- Etaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre.
- Procéder à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec bunsen.
- Plonger la lame pendant une minute dans le violet de gentiane, puis rincée à l'eau déminéralisée.
- Etaler le lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau. Cette étape a pour but de stabiliser la coloration violette.

Partie expérimentale

- Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la coloration (15 à 30 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer avec de l'eau.

Si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries donc sont de type Gram-, si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

- Réaliser une contre coloration avec de la fuchsine : laisser agir 30 secondes à une minute, laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard.

Enfin, observer à l'objectif à immersion ($\times 100$) après dépôt d'une goutte de l'huile de cèdre (Cavallo, 2007).

- Lecture

Les bactéries Gram+ apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram- sont colorées en rose.

3.1.4. Identification biochimique

3.1.4.1. Recherche de l'enzyme respiratoire : la catalase

- Principe

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle intervient dans la dégradation d'eau oxygénée (H_2O_2) produit au cours du métabolisme aérobie en empêchant son accumulation dans la cellule bactérienne.

- Mise en œuvre

- Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée (10V).
- Prélever à l'aide de l'effilure de pipette pasteur un fragment de colonies et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

- Lecture

La présence d'une catalase se traduit en quelque seconde par la formation de bulles d'oxygène (Freney *et al.*, 2007).

Partie expérimentale

3.1.4.2. Identification biochimique par le système API

La détermination des caractères biochimiques est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces bactériennes. Elle nécessite l'utilisation d'une galerie biochimique destinée à révéler un ensemble de caractères biochimiques, cette galerie doit être ensemencée à partir d'une seule colonie pure et bien isolée. Après incubation, l'exploitation des résultats conduit à l'identification des espèces bactériennes.

Deux types de galerie ont été utilisées dans notre travail : **la galerie API 20E** et **la galerie API 20 Staph (Bio-Mérieux)**.

- Identification par le système API 20E :

- **Principe**

La galerie API 20 E est une galerie d'identification biochimique miniaturisée, destinée à l'identification des bacilles à Gram négatif. Chaque microtube de la galerie permet de réaliser un test biochimique. Le profil biochimique ainsi établi, associé à l'étude morphologique et aux caractères cultureux de la souche, permet l'identification de la bactérie.

- Mise en œuvre

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratés. La préparation et l'ensemencement de la galerie se fait selon le protocole décrit par le fabricant. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- Lecture

La lecture des galeries s'effectue en se référant aux tableaux de lecture. L'identification quant à elle est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Hart et Shears., 1997**).

- Identification par le système API staph

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres Staphylococcus, Micrococcus et Kocuria comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. De même que l'API 20E, l'API staph comporte 20 microtubes contenant des

Partie expérimentale

substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Avril, 1991).

3.1.5. Conservation des souches

Le repiquage se fait sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos, on ensemence le tube avec une colonie bien isolée de la souche purifiée en utilisant une anse de platine préalablement flambée et en faisant des stries sur la surface inclinée, puis le tube est incubé à 37°C pendant 18-24 heures. Après récupération, le tube est conservé à une température de 4 à 6°C. Le repiquage doit se renouveler en continu chaque mois.

3.1.6. Etude du comportement des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques

3.1.6.1. Antibiogramme

- Principe

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise.

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à :

- La surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.
- L'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide par la méthode de disque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012). Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (François, 2000 ; Cavallo, 2007).

- Mise en œuvre pratique

➤ Milieu de culture

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Muller-Hinton. Ce milieu permet la croissance de nombreuses bactéries et ne contient pas d'inhibiteurs des antibiotiques.

Partie expérimentale

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune et pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement on prépare une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) de façon à obtenir un inoculum d'une opacité équivalente à une DO de 0.08 à 0.1, lue à 625 nm.

➤ Ensemencement

Après avoir introduit un écouvillon stérile dans l'inoculum ajusté au témoin d'opacité standard, rejeter l'excès de bouillon par pression sur les parois du tube. Ensemencer la gélose. L'écouvillon doit passer 2 à 3 fois sur toute la surface en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne répartition de l'inoculum. Laisser sécher les boîtes 10 minutes avant de déposer les disques.

➤ Dépôt des disques et incubation

Poser les disques en appuyant légèrement pour qu'ils adhèrent bien à la gélose.

Les disposer à 15 mm minimum de la périphérie de la boîte de manière à ce que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

- Lecture

Mesurer la zone d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle. Se rapporter aux tableaux d'interprétation des zones d'inhibition fournis par les fabricants de disques d'antibiotiques pour établir les corrélations entre la zone d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3.6.2. Choix des antibiotiques utilisés

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012), le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (Tableau 5).

Dans notre travail les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion sur disque, sont l'ampicilline (10µg), la gentamicine (15µg), la pénicilline (10µg), l'ofloxacine (5µg), et la tetracycline (30UI) (bio Mérieux), ils ont été sélectionnés selon leur disponibilité.

Partie expérimentale

Tableau 5 : Valeurs des diamètres critiques des antibiotiques testés (CASFM, 2012)

Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
		Sensible	Résistante
PENICILLINES			
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	29	< 18
Ampicilline	10 µg	21	< 16
Ampicilline/sulbactam	10/10 µg	21	< 16
Amoxicilline	25 µg	23	< 16
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	23	< 16
Ticarcilline	75 µg	24	< 22
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	24	< 22
Pipéracilline	75 µg	22	< 18
CARBAPENEMES			
Imipénème	10 µg	24	< 17
MONOBACTAME	30 µg	23	< 21
Aztréonam			
CEPHALOSPORINES			
Céfazoline	30 µg	18	< 12
Céfoxitine	30 µg	22	< 15
Céfotaxime	30 µg	26	< 23
Ceftazidime	30 µg	21	< 19
AMINOSIDES			
Streptomycine	10 UI	14	< 12
Gentamicine	15 µg	18	< 16
Amikacine	30 µg	17	< 15
PHENICOLES			
Chloramphénicol	30 µg	23	< 19
TETRACYCLINES			
Tétracycline	30 UI	19	< 17
MACROLIDES			
Erythromycine	15 UI	22	< 17
POLYPEPTIDES			
Colistine	50 µg	15	< 15
NITROFURANES			
QUINOLONES			
Acide nalidixique	30 µg	20	< 15
FLUOROQUINOLONES			
Ciprofloxacine	5 µg	25	< 22
Ofloxacine	5 µg	25	< 22
DIVERS			
Acide fusidique	10 µg	22	< 15
Rifampicine	30 µg	19	< 14

Partie expérimentale

3.1.7. Etude du comportement des souches isolées vis-à-vis des principes actifs

3.1.7.1 Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle (**Vincent, 1991**).

- Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (**Cavallo, 2007**).

- Mise en œuvre pratique

➤ Milieux de culture

Le bouillon nutritif est utilisé pour la vérification de la vitalité des bactéries.

La gélose nutritive est utilisée pour l'isolement et la conservation des souches, c'est un milieu adéquat pour la majorité des bactéries.

La gélose Mueller Hinton est utilisée dans les tests de sensibilité des bactéries aux différents extraits de plantes.

➤ Préparation des disques

Des disques de papier Whatman n°3 de 6 mm de diamètre, sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, puis conservés dans des tubes en verre stériles fermés hermétiquement jusqu'à utilisation.

➤ Préparation des précultures

Les souches à tester ont été suspendues dans du bouillon nutritif puis incubées à 37°C afin de vérifier leur viabilité. Après 24h, des gouttelettes de la suspension ont été ensemencées sur gélose nutritive puis incubées pendant 18 à 24h à 37°C.

Partie expérimentale

➤ Préparation de l'inoculum

Après incubation, des colonies bien isolées sont mises en suspension dans l'eau physiologique jusqu'à une densité optique de 0,08 à 0,1 à 625nm soit environ 10^8 CFU/ml (**Gulluce et al., 2006**).

- Mode opératoire

Les extraits méthanoliques de la plante ont été solubilisés dans le même solvant (Méthanol) à une concentration finale de 30 mg/ml.

15 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion sont coulés dans les boites de Petri, après refroidissement et solidification sur la paillasse 100 µl de chaque suspension bactérienne de concentration d'environ 10^8 CFU/ml préparée à partir de culture jeune sont étalés à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un râteau.

Puis avec une pince stérile, des disques de 6mm environ sont prélevés puis imprégnés avec 10 µl de l'huile essentielle pure et 10 µl de l'extrait en solution (30mg/ml), et sont ensuite déposés sur la gélose (**Murray et al., 1995, Gulluce et al., 2006**).

Les boites sont fermées avec du parafilm et conservées à 4°C pendant 2h (**Karaman et al., 2001**). Elles sont mises à l'étuve à température de 37°C pendant 24 heures. Dans les boites de contrôle négatif, les disques sont trempés dans le méthanol. Chaque essai est réalisé en triplicata (**Murray et al., 1995, Gulluce et al., 2006**).

- Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu du disque. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche.

3.1.7.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne par la méthode des microdilutions en milieu liquide

- Principe

La méthode de microdilution est une méthode quantitative qui permet de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CMI). La méthode étudiée est celle de **Koneman et al., (1997)** et rapportée par **Oke et al., 2009** avec quelques modifications. La CMI est étudiée seulement pour les microorganismes sensibles aux extraits.

Partie expérimentale

- Mise en œuvre pratique

Une solution-mère de chaque extrait est préparée. Les HE sont solubilisées dans le DMSO à 10% et les extraits méthanoliques sont solubilisés dans le méthanol. Une série de dilutions de raison géométrique 2 est réalisée extemporanément dans le bouillon Mueller Hinton à partir de la solution mère de façon à avoir une gamme de concentration de 50 à 0,4 µl/ml.

La CMI est effectuée selon la méthode de microdilution dans des plaques de 96 puits. Chaque puits est inoculé avec 95 µl de BMH, 100 µl de l'HE ou de l'extrait (en solution dans le DMSO) et 5 µl de suspension bactérienne contenant 10^8 CFU/ml ajustée à 5.0 McFarland, le volume final dans chaque puits est donc 200 µl. Le contrôle positif est préparé de 195 µl MHB et 5 µl d'inoculum. Quant au négatif il est préparé de 100 µl de l'HE ou de l'extrait en solution et 100 µl BMH sans inoculum.

Les microplaques sont ensuite recouvertes de parafilm et incubées à 37°C pendant 24h.

Pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB), 10 µl sont prélevés des puits dont aucun changement de couleur n'est observé, ces 10 µl sont ensemencés sur milieu gélosé et incubés à 37°C pendant 24h.

- Expression des résultats

Pour visualiser la croissance bactérienne un indicateur coloré est utilisé : Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma Aldrich) à une concentration de 2mg/ml (la NBT est diluée dans de l'eau distillée). A la lecture, l'obtention d'une couleur bleue indique une multiplication bactérienne. La persistance de la couleur jaune initiale signifie l'absence de croissance des germes. La CMI est égale alors à la plus petite concentration qui n'a pas montré un changement de couleur (**Peskin et Winterbourn, 2000, Sharma *et al.*, 2012**).

3.1.7.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration minimale bactéricide est déterminée par ensemencement par strie de 10 µl de suspension dans des puits sans croissance visible. L'ensemencement s'effectue à la surface de la gélose GN coulée en boîte de Pétri.

Les cupules des rangées des témoins positif et négatif ont également été ensemencées sur la même gélose pour s'assurer de l'absence de croissance des bactéries dans les cupules de la rangée témoin négative et de présence de croissance dans les cupules de la rangée positive. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h. A la lecture, La CMB de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois (**CLSI, 2006 ; Licina *et al.*, 2013**).

Partie expérimentale

3.1.7.4. Caractère bactéricide et bactériostatique

Pour définir le caractère bactériostatique ou bactéricide il est possible de calculer le rapport CMB/ CMI. Si le rapport est inférieur à 4 l'huile est considérée bactéricide (**Guinoiseau, 2010**).

Pour d'autres auteurs si les valeurs de CMB sont équivalentes aux valeurs de CMI cela implique que l'effet est **bactéricide**, et si les valeurs de CMB sont plus élevées aux valeurs de CMI cela signifie que l'effet est **bactériostatique** (**Cosentino et Tuberoso, 1999 ; Randrianarivelo, 2010**).

3.2. Test d'activité antioxydante

3.2.1. Essai de caractérisation sur plaques CCM

Cette technique est utilisée pour l'ensemble des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux types d'échantillons.

la méthode mise au point par **Tepe et al., (2005)** est utilisée. Sur plaque de Silicagel 60 F (Merck), 5 µl de chaque solution d'extrait (1:10 dilué dans le méthanol) sont déposés. La plaque est placée dans une cuve à chromatographie contenant les systèmes de solvant suivant : Acétate d'éthyle : Méthanol (1 :1).

Après migration, les chromatogrammes sont séchés, puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH (2mg/ml dans le méthanol). Après 30 minutes à la température ambiante, les constituants de l'extrait présentant une activité antiradicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune-blanc sur fond violet.

3.2.2. Piégeage du radical libre DPPH

Pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits, nous avons retenu la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre, selon le protocole décrit par **Takao et al., (1994)** et **Licina et al., (2013)**.

Pour cette évaluation, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination du pourcentage d'inhibition et d'une autre part la détermination de la réduction relative du radical DPPH à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH

- Principe

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable : le 2,2 - Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

Partie expérimentale

La réduction du radical libre (DPPH) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence d'un donneur d'hydrogène (**Burit et Bucar, 2000**).

Le DPPH est initialement violet, il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (**Figure 6**). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques de nos extraits (**Molyneux, 2004**).

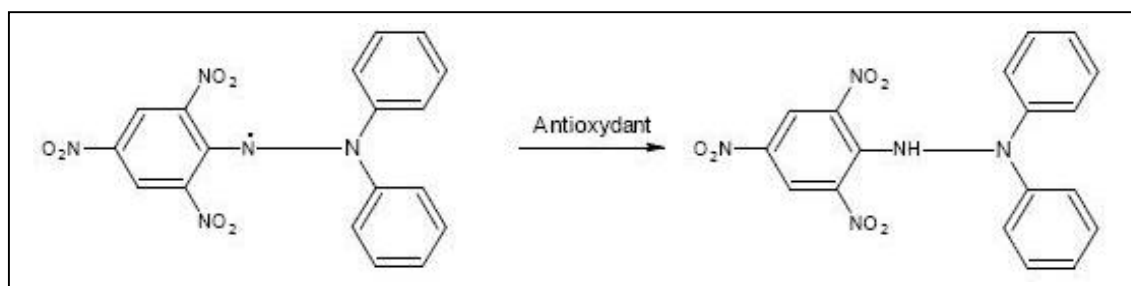


Figure 6: Réduction du radical libre DPPH (**Molyneux, 2004**).

- Mise en œuvre pratique

La solution mère de l'extrait est préparée dans le méthanol à une concentration de 2000 µg/ml. Des dilutions sont réalisées de façon à avoir des concentrations qui varient entre 1000 et 15.6 µg/ml. Deux ml de l'extrait en solution sont ajoutés à 2mL de DPPH (80 µg/ml).

La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 mn d'incubation dans l'obscurité. Un blanc constitué de 2 ml de méthanol et 2 ml de la solution de DPPH. La vitamine C (acide ascorbique) est utilisée comme control positif. La solution radicalaire de DPPH est préparée fraîchement et les essais sont repris trois fois.

L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) suivant cette relation :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Partie expérimentale

Abs_{control} : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai).

Abs_{échantillon} : Absorbance du composé d'essai.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence dans notre expérience c'est l'acide ascorbique (Vitamine C).

- Calcul des IC₅₀

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective CE₅₀ ou IC₅₀.

Ce paramètre IC₅₀ est défini comme étant la concentration d'extrait nécessaire qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. L'IC₅₀ est calculée graphiquement par la régression linéaire de graphe tracé ; pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées (**Molyneux, 2004**).

3.3. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation du pouvoir antifongique *in vitro* a été réalisée sur deux champignons phytopathogènes : *Fusarium sp*, *Aspergillus sp* et une levure *Candida albicans*.

Les deux moisissures ont été isolées du blé alors que la levure a été isolée de la cavité buccale.

Dans cette partie les HE et les extraits MeOH ont été testés pour leurs effets sur la levure, mais seule l'activité des HE a été testée sur les moisissures.

3.3.1. Provenance des souches

Les deux moisissures nous ont été aimablement fournies par le Laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, alors que la levure a été fournie par le Laboratoire d'analyses médicales.

➤ Milieux de culture

- Le milieu utilisé pour l'incubation, l'entretien et la réalisation de l'antifongigramme pour les moisissures est le PDA (Potato Dextrose Agar).

- Le milieu Sabouraud a été utilisé pour l'entretien et l'incubation de la levure.

Les champignons sont conservés dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile à 5°C.

Partie expérimentale

3.3.2. Activité anti- candida des huiles essentielles et des extraits

3.3.2.1. Méthode de diffusion sur disque

La technique retenue est celle de **Bauer *et al.* ; (1966)** et rapportée par **Vilas et Kamble, (2012)** avec quelques modifications. Les extraits méthanoliques de la plante ont été solubilisés dans le méthanol à une concentration finale de 30 mg/ml, alors que les huiles essentielles ont été utilisées à l'état brut.

A partir d'une culture pure fraîchement préparée, obtenue après 48h à 25°C, des colonies bien isolées ont été raclées puis déchargées dans de l'eau physiologique saline (0.9%). La suspension bactérienne devrait être bien homogène, on procède alors à une évaluation de la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm dans le but de standardiser la suspension de spores à 10^7 spores/ml. On estime qu'une DO de 0,04 correspond à une concentration de 10^7 spores/ml.

Après ensemencement, des disques stériles de 6 mm de diamètre chargés de 10 µl d'extrait ont été déposés au centre de chaque boîte. Ces boîtes sont abandonnées sur la paillasse pendant 30 minutes pour permettre une bonne diffusion de l'extrait dans l'agar, puis transférées à l'étuve à 25°C pendant 48h. L'Amphotéricine B (à 10%) a été utilisée comme antifongique standard.

- Lecture

L'activité est visualisée par apparition de la zone d'inhibition autour des disques. Cette zone d'inhibition est mesurée en mm.

3.3.2.2. Méthode de microdilution en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI), et la concentration minimale fongicide (CMF) ont été déterminées selon le protocole décrit par **Khan *et al.*, (2003)**.

- Mise en œuvre pratique

La suspension est préparée à partir d'une culture fraîchement réalisée, et ajustée à une turbidité de 0.5 McFarland. Le test a été réalisé dans une plaque de 96 cupules, Chaque puits a été inoculé avec 95 µl de bouillon Sabouraud, 5 µl de la suspension et 100 µl de l'HE ou l'extrait (la gamme de concentration est de 50 à 0,4 µl/ml, et les dilutions ont été les mêmes que celles réalisées pour les tests d'activité antibactérienne, sauf que le milieu utilisé pour la levure est le Bouillon Sabouraud). La dernière cupule a été utilisée en tant que control négatif

Partie expérimentale

(195 bouillon Sabouraud + 5µl d'inoculum). Les plaques sont par la suite incubées à 25°C pendant 48h.

La détermination de la CMF est réalisée selon le protocole utilisé aussi pour la détermination de la CMB.

- Expression des résultats

L'interprétation des résultats est effectuée en fonction de l'absence ou de la présence de turbidité dans chaque cupule. La CMI est donc la plus petite concentration où le fluide a été trop clair.

3.3.3. Effet des huiles essentielles sur les champignons phytopathogènes

3.3.3.1. Technique de contact direct

- Principe

Pour l'évaluation de l'activité antifongique, nous avons adopté la méthode du contact direct, décrite par **Singh et al., (2008)** où les diamètres de la zone de croissance du mycélium sont mesurés dont le but est de calculer les taux d'inhibition.

- Mise en œuvre pratique

L'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Annaba et celle de Jijel ont été testées avec des concentrations de 1, 2, 3, 4, et 5 µl/ml.

Les huiles essentielles ont été d'abord diluées dans 0.5 ml de tween 20 à 5%.

Les concentrations en HE ont été obtenues par addition de 10, 20, 30, 40, 50 µl d'huile/0.5 ml de Tween 20 dans 9.5 ml de milieu PDA en surfusion dans un tube à essai.

Les tubes ont été ensuite agités pour assurer une bonne dispersion de l'huile dans le milieu de culture. Les boîtes de pétri ainsi coulées ont été laissées sur la paille jusqu'à solidification.

L'inoculation a été effectuée par le dépôt au centre de la boîte d'un disque mycélien d'environ 9 mm de diamètre d'une pré-culture de 5 jours.

Une boîte de pétri contenant 9.5 ml du milieu PDA sans huile essentielle, inoculée d'un disque de mycélium a servi de témoin.

Les boîtes ont été fermées hermétiquement avec du parafilm et incubées à 28±2°C pendant 9 jours.

Partie expérimentale

- Lecture

L'efficacité du traitement est évaluée chaque jour par mesure de deux diamètres perpendiculaires autour de chaque colonie. Chaque essai est performé en triplicata.

Le diamètre de croissance mycélienne est mesuré au 9^{ème} jour et comparé à celui du témoin suivant la formule suivante :

$$I \% = [(Dc-Dt)/Dc] \times 100$$

I(%): inhibition de la croissance fongique en pourcentage

Dc: diamètre de la croissance mycélienne dans un milieu sans huile essentielle (témoin)

Dt: diamètre de la croissance mycélienne en présence d'huile essentielle

* Détermination de la CMI

La CMI correspond à la plus petite concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée.

3.3.3.2. Activité antifongique des fongicides du commerce

A titre comparatif, nous avons testé en parallèle l'activité de deux fongicides : Propinebe et Vapcotop.

Le choix de ces produits est dicté par à leur utilisation accrue dans le domaine de l'agriculture en Algérie. Ils sont utilisés à des concentrations de 1.59 mg/ boîte de Pétri (Pour Propinèbe) et de 2 mg/ml/ boîte de Pétri (Pour Vapcotop).

Ces concentrations sont calculées par rapport aux concentrations indiquées dans les sacs de chaque produit.

NB : le propinèbe s'utilise directement sous forme de poudre, alors que le Vapcotop doit être solubilisé.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

1. Tests qualitatifs de la composition chimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Calamintha nepeta* en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les tests préliminaires de la composition chimique réalisés sur la poudre provenant des parties aériennes de la plante ont permis de déterminer la présence de certains groupes et l'absence d'autres. Les résultats sont récapitulés dans **le Tableau 6**.

Le signe “+” traduit la présence du groupe de composés chimiques, les signes “++” et “+++” indiquent la présence du métabolite en quantité supérieure au seuil de détection, et le signe “-” l'absence du groupe de composés.

Il ressort de l'analyse de ce tableau que cinq grands groupes de composés chimiques sont présents. Il s'agit des flavonoïdes, des huiles volatiles, des tanins, des saponosides et des coumarines.

Tableau 6: Résultats de screening phytochimique des parties aériennes de S_A et S_J.

Groupes chimiques	S _A	S _J
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	++	++
Les coumarines	+	+
Les saponosides	+++	+++
Les tanins	+++	+++
Les composés réducteurs	-	-
Stéroïdes et terpènes	-	-
Huiles volatiles	+++	+++

(-) : Absence.

(+) : Présence en faible quantité.

(++) : Présence en quantité moyenne.

(+++): Présence en quantité importante.

Résultats et discussion

Les résultats des tests préliminaires de la composition phytochimique montrent qu'il n'y a pas de différences dans les groupes chimiques existants dans la plante traitée : S_A et S_J. Par comparaison avec l'étude réalisée par **Bougandoura (2011)**, on note que les mêmes classes sont retrouvées.

La présence en abondance des tanins et des saponosides confère à cette plante des propriétés biologiques très importantes :

Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides. Ils ont aussi la propriété de tanner la peau par création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène (**Smythies, 1998**). Ces tanins permettent aussi de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections (**Iserin, 2001**).

La présence des saponosides en quantité importante confère aux plantes des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse (**Roux et al., 2007**).

Quant aux flavonoïdes, ils constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, antivirale, antibactérienne, tinctoriale, les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques (**Pietta, 2000**).

Des travaux antérieurs sur les tests phytochimiques de *Calamintha nepeta* (**Bougandoura, 2011**) sont en accord avec nos résultats sauf en ce qui concerne les saponosides qui sont présents en abondance dans notre extrait, par rapport à l'équipe de **Bougandoura**. Les stérols qui sont absents dans notre plante cependant on les rencontre en quantité faible dans cette équipe de Tlemcen.

2. Huiles essentielles

2.1. Propriétés organoleptiques

Les parties aériennes de la plantes S_A et S_J sont soumises à une hydrodistillation pendant 2h, les extraits obtenus sont des substances hautement volatiles, d'une odeur aromatique, douce mentholée, et de couleur jaune pâle.

2.2. Rendement

Les rendements moyens en huile essentielle ont été calculés par rapport à la plante séchée. *Calamintha nepeta* de la zone de Annaba à donné un rendement de 2.54% et celle de la zone de Jijel un rendement de 1.48% (**Figure 7**).

Résultats et discussion

Panizzi et al., (1993) ont travaillé sur *Calamintha nepeta* de Molina di Quosa de l'Italie, récoltée durant le mois de juillet, d'un sol de nature rocheuse, sec et calcique situé à une hauteur de 300 m par rapport au niveau de la mer. *C.nepeta* de cette région a donné un rendement de 0.60%, nettement inférieur à notre résultat. Ceci montre que certains facteurs tels que : la nature du sol, le climat, la qualité de la matière végétale utilisée peuvent influencer la sécrétion d'huiles essentielles chez une plante.

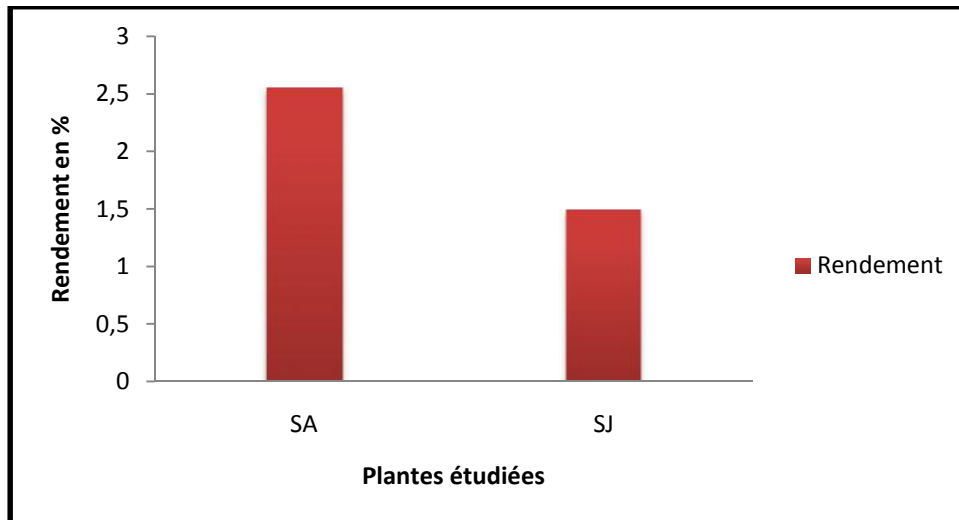


Figure 7 : Rendement en huile essentielle des deux échantillons SA et SJ

2.3. Cinétique de l'extraction d'huiles essentielles par hydrodistillation

Les huiles essentielles ainsi obtenues par hydrodistillation à l'aide de Clevenger ont donné un rendement de 2.54 g pour *C.nepeta* de la zone d'Annaba et un rendement de 1.48 g pour celle de la zone de Jijel.

Dans le but d'optimiser la durée d'extraction, nous avons étudié la cinétique du rendement en huiles essentielles par rapport à la quantité de matière sèche. **La figure 8** montre que le rendement d'extraction augmente progressivement jusqu'à 2 heures pour atteindre un plateau. Le temps optimum de cette hydrodistillation est d'environ 2h.

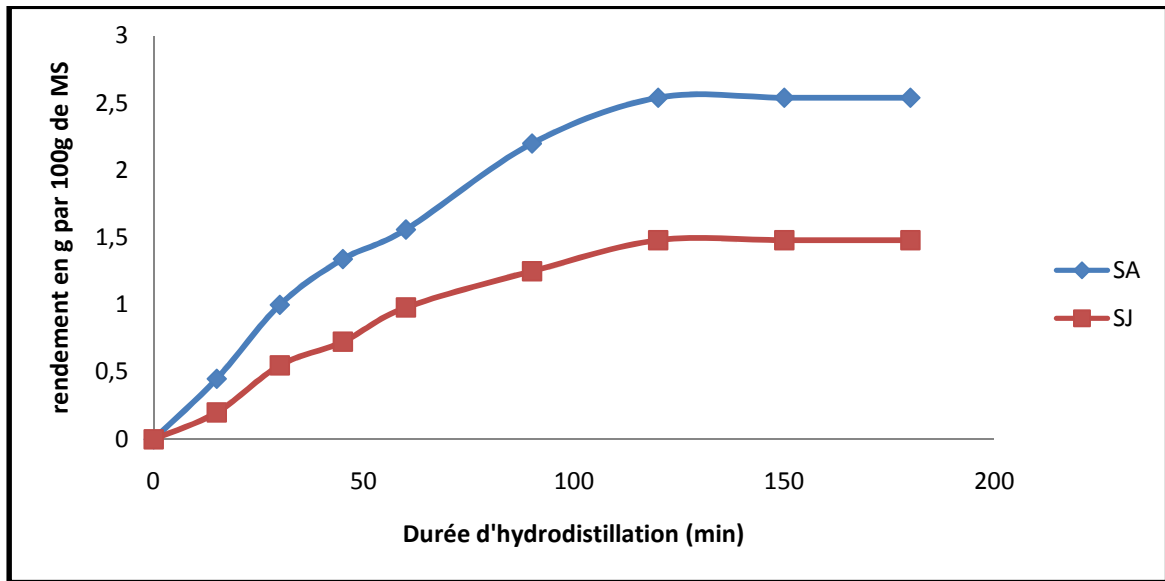


Figure 8: Cinétique de l'extraction par hydrodistillation d'huiles essentielles des deux plantes de *C.nepeta*

2.4. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau dans les deux échantillons SA et SJ a donné un taux d'humidité voisin de 25% de la masse de matière fraîche des parties aériennes (**Figure 9**). Il correspond à 79,33% pour SA et 74,66% pour SJ.

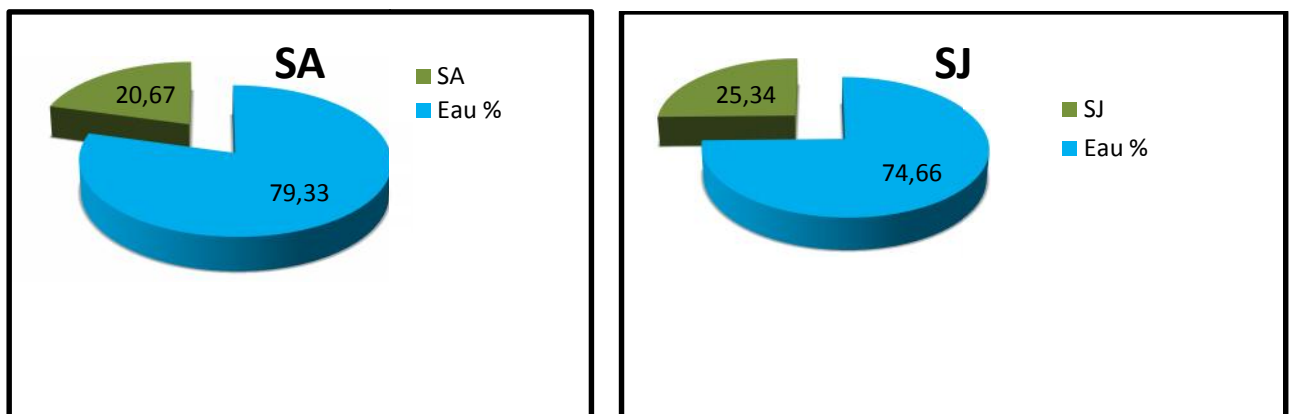


Figure 9 : Teneur en eau de SA et SJ

Résultats et discussion

2.5. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/ SM

L'analyse de la composition chimique du matériel végétal de *Calamintha nepeta* a été effectuée au niveau du laboratoire de l'université d'Ouled Aissa de Jijel.

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Les principaux composants et leurs pourcentages ont été déterminés ainsi que le temps et les indices de rétention. Les résultats d'analyse sont consignés dans le **tableau 7** et les profils chromatographiques sont illustrés dans les **figures 10** et **11**.

Tableau 7: Résultats d'analyses chromatographiques (CPG/SM) des fractions volatiles de SA et SJ

N°	Composés	TR	IR	Composition (%)	
				S _A	S _J
1	-Thujene	4.464	924	0.52	0.09
2	1R- -Pinene	4.602	932	0.66	0.7
3	1,2-diisopropenylcyclobutane	5.541	934	4.68	–
4	L- -Pinene	5.610	980	0.58	1.33
5	3-Octanol	6.163	988	2.32	0.96
6	-Terpinene	6.870	1014	–	0.27
7	(+)-4-Carene	6.968	1015	–	0.31
8	o-Cymene	7.190	1022	0.17	–
9	D-Limonene	7.227	1024	–	1.94
10	-Phellandrene	7.278	1025	0.23	0.26
11	-cis-Ocimene	7.662	1035	–	0.76
12	-Terpinene	8.298	1054	0.13	0.23
13	Cis-Sabinene hydrate	9.382	1065	–	0.14
14	Cyclohexanone,2-(1 methylethylidene)-	10.960	1099	20.32	9.37
15	Menthone	11.763	1111	5.97	26.46
16	3-Octanol-acetate	12.044	1120	–	0.35
17	Rose oxide	12.135	1148	0.89	–
18	Pulegone	14.787	1226	1.72	14.04
19	Piperitone oxide	15.532	1233	54.71	22.26

Résultats et discussion

20	Cis-Carveol	16.423	1253	–	0.16
21	Thymol	17.420	1289	1.92	0.26
22	Diosphenol	17.576	1309	0.32	0.43
23	Piperitenone	17.893	1340	–	0.2
24	Jasmatone	18.746	1378	0.33	0.25
25	-Cubebene	19.849	1387	1.47	5.51
26	-Elemen	19.980	1389	–	0.27
27	-Gurjenene	20.309	1409	0.61	–
28	-Muurolene	21.102	1419	-	0.16
29	Z- -Farnesene	22.226	1440	–	0.48
30	-Caryophellene	22.512	1455	–	0.73
31	Elixene	22.699	1456	–	1.93
32	<i>Allo</i> -aromadendrene	22.791	1458	–	0.6
33	Caryophyllene	22.909	1478	0.49	4.33
34	-Muurolene	23.197	1500	–	0.93
35	-cadinene	24.471	1513	–	0.77
36	(-)- -Panasinsen	23.668	1530	–	0.23
37	-Cadinene	24.189	1537	–	1.84
38	Palustrol	24.417	1567	0.79	–
39	3-Oxo- -ionone	29.327	1675	–	0.25
40	Phytol	39.928	1942	–	0.56
Monoterpènes Hydrocarbonés				6.97	4.09
Monoterpènes Oxygénés				88.5	76.68
Sesquiterpènes Hydrocarbonés				2.57	17.78
Sesquiterpènes Oxygénés				0.79	-
Autres				-	0.56
TOTAL				98,83	99,36

Résultats et discussion

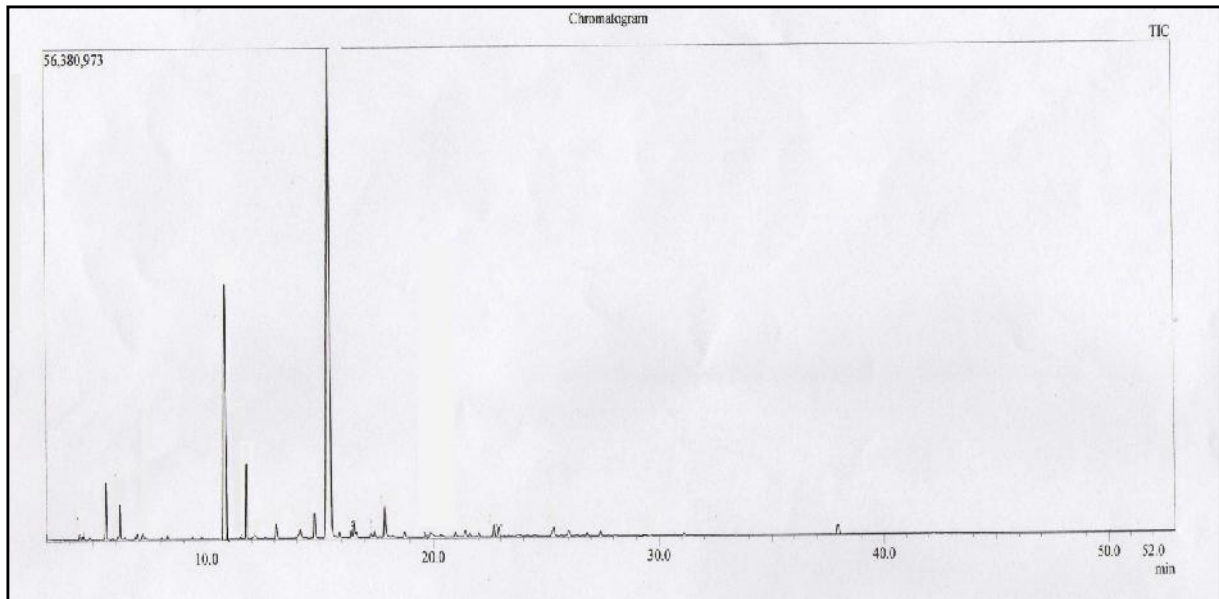


Figure 10 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba.

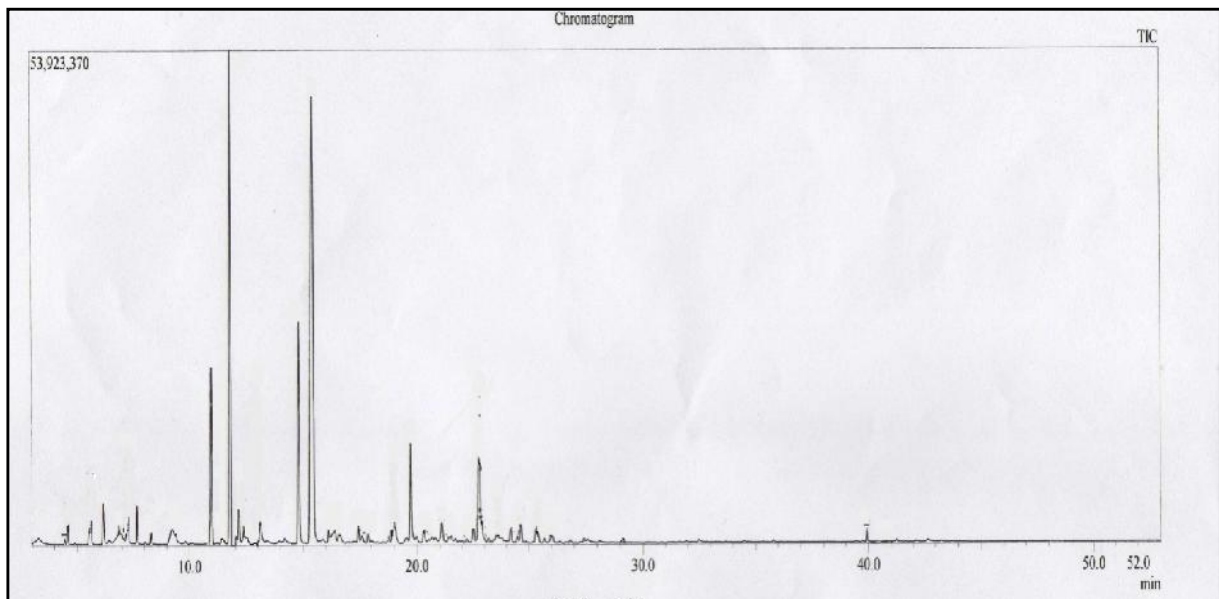


Figure 11: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel.

L'analyse préliminaire des huiles essentielles des parties aériennes de cette plante a montré des profils chromatographiques presque similaires d'un point de vue qualitatif mais avec une différence quantitative dans l'abondance de leurs composés majoritaires. Il est à noter d'après cette analyse qu'il y a en effet des produits majoritaires et des produits minoritaires.

Résultats et discussion

D'une part des composés de différentes familles chimiques sont abondants dans l'huile essentielle de la zone d'Annaba alors qu'ils sont absents dans celle de la zone de Jijel, et d'autre part certains composés sont absents dans l'HE d'Annaba mais présent dans celle de la région de Jijel.

L'analyse a pu mettre en évidence la présence de 20 composants représentant un pourcentage de 98, 83% du volume totale de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la station de Annaba et 34 constituants représentant 99.40 % du volume totale de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel.

Les échantillons de la sarriette provenant d'Annaba sont dominés par la présence de: Piperitone oxide (54.71%), Cyclohexanone,2-(1 methylethylidene)- (20.32%), et Menthone (5.97%). D'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles : 1,2-diisopropenylcyclobutane (4.68%), 3-Octanol (2.32%), Thymol (1.92%) et la pulegone (1.72%).

Les produits majoritaires des huiles essentielles de la zone de Jijel sont : Menthone (26.46%), Piperitone oxide (22.26%), Pulegone (14.04%) et Cyclohexanone,2-(1 methylethylidene)- (9.37%). Accompagnés également d'autres constituants avec des pourcentages moins importants : -Cubebene (5.51%), Caryophyllene (4.33%) et l'Elixene (1.93%) (**Figure 12**).

On note aussi que certains composés sont spécifique à l'HE de Jijel tels que : D-Limonene, - Caryophellene, -Muurolene, et -Cadinene. Inversement, d'autres composés comme o-Cymene, Rose Oxide, et -Gurjenene sont caractéristique de l'essence de la zone d'Annaba.

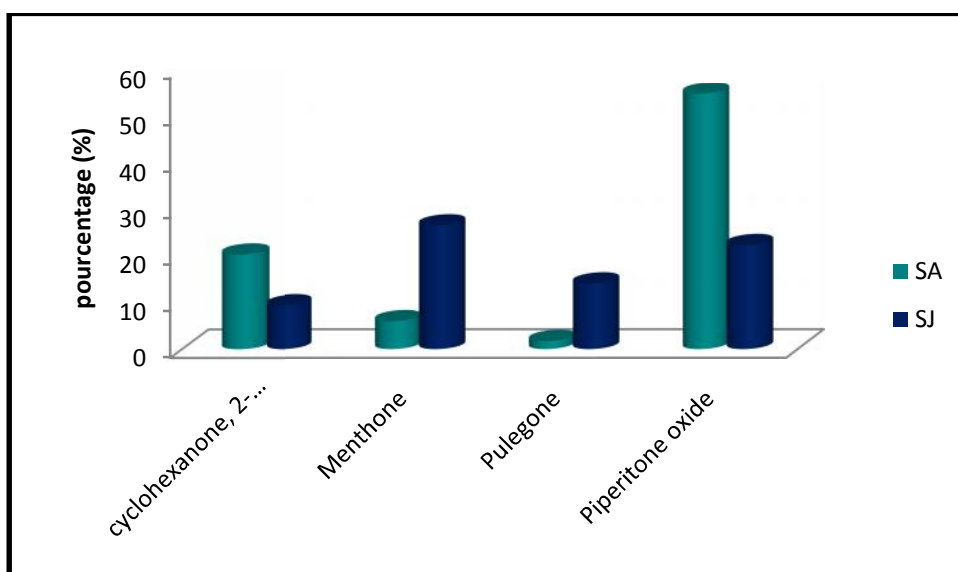


Figure 12 : Pourcentage des produits majoritaires des huiles essentielles de SA et SJ.

Résultats et discussion

La composition chimique des huiles essentielles de la sarriette d'Annaba et de Jijel révèle que celles-ci sont caractérisées par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (88.5% et 76.68 %) respectivement. Cependant, les monoterpènes hydrocarbonés sont présents en faibles quantités (6.97 et 4.09 %) (Figure13) et (Figure 14).

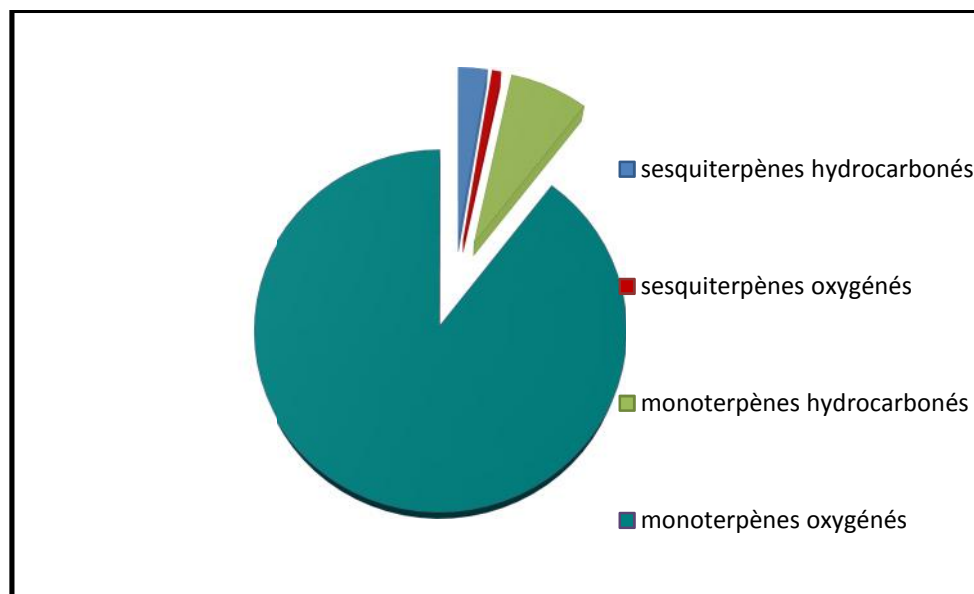


Figure 13: Distribution de la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba

Il faut noter que la fraction aromatique de la région de Jijel est caractérisée par la présence de sesquiterpènes hydrocarbonés avec une concentration non négligeable de l'ordre de 17.78%. Les sesquiterpènes oxygénés sont également présent mais avec de faibles concentrations.

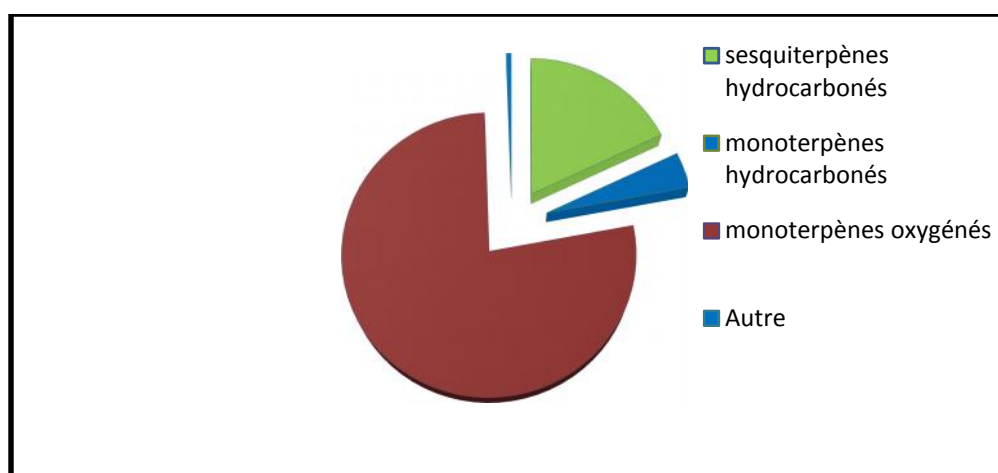


Figure 14 : Distribution de la composition chimique de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel

Résultats et discussion

La composition chimique des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* a été rapportée par quelques auteurs et le chémotype a été différent d'une région à une autre.

Des études réalisées sur des spécimens de *Calamintha nepeta* collectés du jardin de l'université de Gent en Belgique ont montré que les composés majoritaires sont:

Pulégone (11.5 to 33.2%), Piperitenone oxide (5.9 to 37.8%) et la Menthone (4.9 to 8.9%) (**De pooter et al., 1987**). Celle de Molina di Quosa de l'Italie avait la pulégone (46%), piperitenone oxide (2.53%), piperetone oxide (2.29%), et la piperitenone (2.00%) comme des constituants dominants (**Panizzi et al., 1993**).

Une autre étude réalisée en France (Corse) sur des spécimens de *Calamintha nepeta subsp. nepeta* et *Calamintha nepeta subsp. glandulosa* récoltés durant la période de floraison a montré que les huiles essentielles de ces dernières sont caractérisées par un chémotype pulégone-menthone (**Ristorcelli et al., 1995**).

Sarer et al., (1998), avaient identifié la pulégone comme composé majoritaire de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta ssp. glandulosa*.

Les travaux de **Baldovini et al., (2000)**, sur *Calamintha nepeta ssp. nepeta* font état d'une importante variabilité chimique. En Corse, l'existence de trois types chimiques a été démontrée. Certains échantillons présentent la pulégone (associée à divers autre monoterpènes menthaniques tels la menthone, l'isomenthone, le menthol ou la pipéritenone) ou la menthone, ou encore la carvone comme composés majoritaires de ces huiles essentielles. D'autres échantillons sont dominés par les oxydes de pipéritone et/ou de pipériténone.

l'huile essentielle d'une population de *Calamintha nepeta* originaire du Maroc réalisées par **Satrani et al., (2001)** contenait le -cymene (20.9%), -terpinene (18.7%), et le thymol (34.94%) comme produits majoritaires.

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce d'origine serbe (**Kitic et al., 2005**) contient majoritairement de la pulégone (75,5%), de l'oxyde de pipéritone (6,0%), de la menthone (5,3%) et du menthol (4,3%).

Des travaux en Algérie sur la même espèce ont montré que l'HE de cette plante est dominée par la pulegone (39.5 %), le neo-menthol (33 %) et l'isomenthone (19.6 %) (**Kerbouche et al., 2013**).

Toutes ces observations indiquent que la composition chimique de l'huile essentielle de la région de Jijel est presque en accordance avec les résultats rapportés ci-dessus. Alors que les résultats de la composition chimique d'huiles essentielles d'Annaba apparaissent relativement

Résultats et discussion

différents, ceci est remarquable au niveau des produits majeurs et du pourcentage des différents constituants identifiés.

Ces différences sont peut être attribuées à plusieurs facteurs, saisonniers, et environnementaux, la nature du sol, la zone géographique, la période de récolte, la méthode d'extraction (**Bertini et al., 2005; Colombo et al., 2013 ; Gende et al., 2014**).

La composition biochimique des essences des lamiacées dépend ainsi du lieu de récolte et déterminera donc le chémotype et par conséquent la spécificité de l'huile et les propriétés thérapeutiques. Tous ces paramètres sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturelles (**Gilly, 2005**).

Dans ce dernier chapitre, nous avons montré la richesse, en termes de diversité structurale, des molécules organiques entrant dans la composition de nos huiles essentielles.

Il devient alors envisageable d'isoler ces composés par une étape de distillation supplémentaire et de les utiliser comme matière première pour la chimie de synthèse qui s'intéresse à la production de molécules à haute valeur ajoutée et présentant un certain degré de complexité.

Nous envisageons dans les travaux à venir, d'isoler la pulégone présentant un pourcentage de 14% de l'huile essentielle de la sarriette de la zone de Jijel, cette molécule va servir comme un précurseur dans le procédé de bioconversion qu'on va adopter.

La pulégone ayant une formule brute $C_{10}H_{16}O$ présente un groupement carbonyle conjugué à une double liaison (**Aghnihotri et al., 2005**). La présence de ce motif carbonyle fait de la pulégone un bon accepteur et conduit à de nombreuses synthèses de produits d'intérêt en chimie des arômes, en parfumerie ou en chimie médicinale (**Kopp et al., 2009**).

Il serait aussi intéressant d'isoler le D-Limonène, ce composé est peut être considéré comme une source renouvelable rentable en raison de sa biodégradabilité. L'intérêt pour cette molécule est apparu lorsque ses propriétés et/ou qualités nettoyantes et dégraissantes ont été mises en évidence et prises en comptes (**Toplisek et Gustafon, 1995**).

Résultats et discussion

3. Rendement en extrait méthanolique

Les parties aériennes des deux plantes S_A et S_J sont soumises à une extraction à l'aide d'un Soxhlet. Après évaporation à sec sous pression réduite, on a obtenu un extrait verdâtre, d'un aspect pâteux et d'une odeur caractéristique.

Le rendement est déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec. Il est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont rapportés dans la **Figure 15**.

D'après les résultats, les deux plantes donnent des rendements légèrement différents. On remarque que S_A est probablement plus riche en molécules phénoliques (14.6%) par rapport à S_J (12%). Les masses en extrait sec méthanolique sont supérieures à 12g/100g de la matière sèche végétale pour les deux plantes.

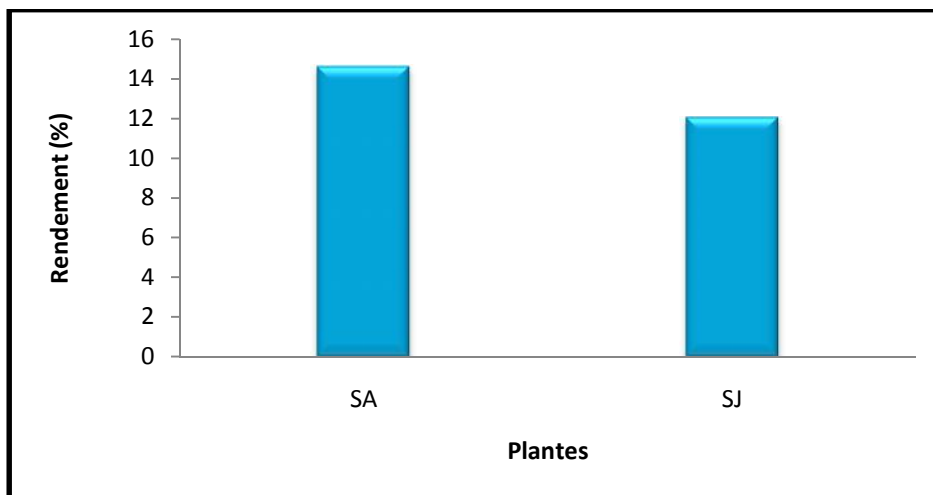


Figure 15 : Rendement en extrait méthanolique des deux échantillons de *S. calamintha nepeta*

Selon **Bougandoura (2011)**, le rendement en extrait méthanolique de *Calamintha* est de 8,58%. Ce rendement est évidemment inférieur à celui trouvé dans notre étude pour les deux plantes. Cela est peut être due à la différence des techniques d'extractions utilisées qui affectent ainsi le taux total en phénols et flavonoïdes (**Lee et al., 2003**).

D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure.

Résultats et discussion

3.2. Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols sont des composés fortement hydroxylés que l'on retrouve dans diverses fractions d'extraits végétaux. Ils ont la capacité d'absorber les radicaux libres dans les systèmes biologiques. Ce qui fait de ces composés de potentiels agents antioxydants (**Hagerman et al., 1998**).

L'analyse qualitative des extraits méthanoliques de *Calamintha nepeta* des deux zones a été effectuée par des méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV- visible par la méthode de Folin-Ciocalteu dont le but est l'estimation des quantités en polyphénols présentes dans chaque plante.

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour plusieurs raisons : c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, la grande longueur d'onde d'absorption du chromophore qui permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (**Huang et al., 2005**).

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et aussi très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés. De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les quantités de polyphénols totaux correspondantes sont rapportées en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$). La méthode est basée sur l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique (**Figure 16**). Les Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques sont illustrées dans la (**Figure 17**). Chaque essai a été répété 3 fois.

Résultats et discussion

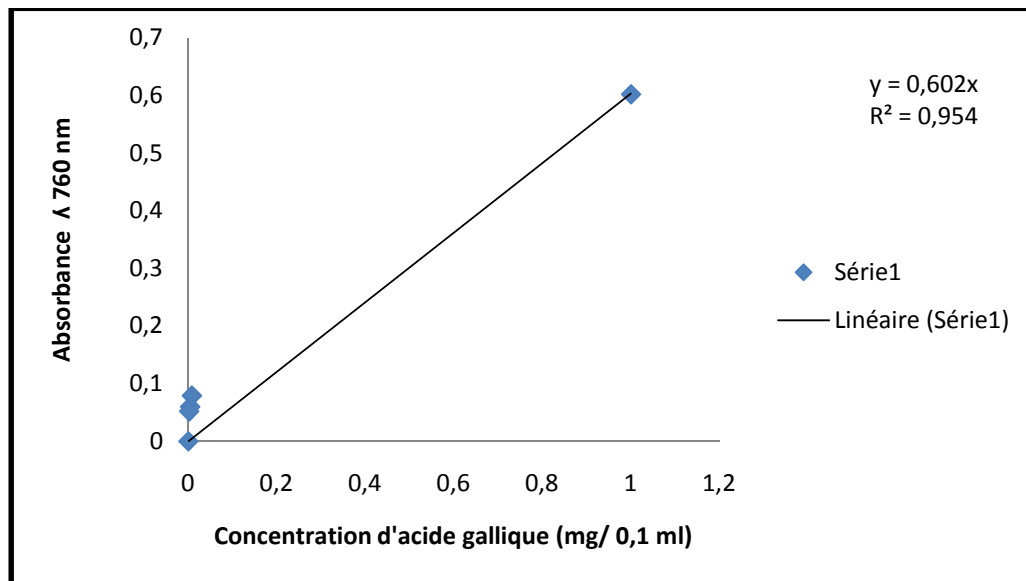


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

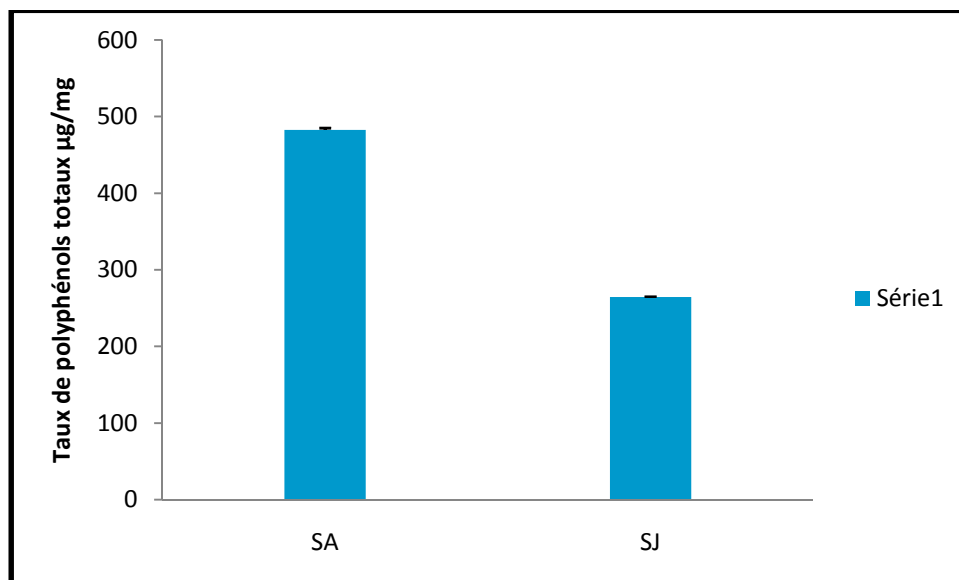


Figure 17: Taux de phénols totaux des extraits méthanoliques en µg EAG/ mg d'extrait

Sur la base des valeurs d'absorbance des solutions des extraits méthanoliques, qui réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu et par rapport aux solutions standards d'équivalents de l'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique de composés phénoliques totaux montrent que les plantes des deux régions sont riches en polyphénols et celui de Annaba fait presque le double de celui de Jijel.

Une teneur élevée en phénols a été trouvée chez la sarriette de la zone d'Annaba ($482,666 \pm 2,516 \mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$), tandis que celle de la zone de Jijel est considérée comme une source moins riche en phénols totaux ($264,666 \pm 0,577 \mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$) par rapport à

Résultats et discussion

l'autre. Il est à noter que la teneur en composés phénoliques des deux extraits varie dans le même sens que leurs rendements, autrement dit plus le rendement est important plus le taux en polyphénols totaux est élevé.

Jusqu'ici peu d'études ont été réalisées sur la quantification des polyphénols dans les extraits de *calamintha nepeta*. L'extrait méthanolique a fait l'objet d'étude par **Bougandoura et Bendimerad, (2012)** cependant, les résultats ne sont pas similaires aux nôtres. En effet l'extrait méthanolique de la zone de Tlemcen a donné un taux en polyphénols égale à 2,968 mg/g de matière sèche.

A la lumière de ces résultats, on peut en déduire que nos extraits sont très riches en polyphénols.

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturales, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Podsdek, 2007**).

Le taux de polyphénols présent dans nos fractions est très important ceci serait peut être utile pour envisager l'étude des activités biologiques. Un fractionnement de ces diverses molécules est nécessaire afin d'aborder l'étude des relations structure/ activité.

Résultats et discussion

4. Activités biologiques

4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour surmonter le problème de résistance des microorganismes vis-à-vis les antibiotiques, la plupart des travaux sont orientés actuellement vers d'autres agents antimicrobiens possédant un mode d'action tout à fait spécifique.

Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux échantillons: SA et SJ, des microorganismes causant pour la plupart des infections urinaires et des maladies nosocomiales ont été testés.

Après incubation de colonies isolées sur milieu GN, la pureté a été immédiatement vérifiée par l'examen à l'état frais puis la coloration de Gram, et le test de la catalase.

4.1.1. Caractères cultureux

Après 24h d'incubation à 37° C, l'examen macroscopique des colonies bactériennes sur gélose nutritive est consigné dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : Caractères cultureux des souches bactériennes sur la gélose nutritive

Bactéries	Caractères des colonies
<i>Escherichia coli</i>	jaunâtre, lisse, arrondie, et translucide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	jaunâtre immobiles, larges, luisantes, bombées, brillantes
<i>Serratia marcescens</i>	rose, lisses et arrondies
<i>Serratia odorifera</i>	jaunâtre, lisses et arrondies
<i>Enterobacter cloacea</i>	jaunâtres mobiles, brillantes, et opaques
<i>Staphylococcus aureus</i>	dorées, lisses, rondes, et bombées

4.1.2. Observation microscopique

Les résultats obtenus après observation à l'état frais et la coloration différentielle de Gram des souches testées sont démontrés dans le **tableau 10**.

Résultats et discussion

Tableau 10 : Résultats des examens microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram

Observation à l'état frais	Observation après coloration de Gram
3 souches se sont présentées sous une forme de cocci, immobile, disposées en amas, en diplocoques et en grappe de raisin, tandis que 7 autres souches sont apparues sous forme de bacille, mobile, regroupées en diplobacilles ou en courtes chainettes.	Les 3 souches sont des cocci colorées en violet : cocci à Gram positif. Les 7 autres souches sont des bacilles de couleur rose : bacilles à Gram négatif.

4.1.3. Identification biochimique

4.1.3.1. Recherche de la catalase

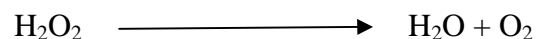
La recherche de l'enzyme catalase a été réalisée par la dissociation d'une colonie isolée dans des gouttes de l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit par la formation de bulles d'oxygène (Freney *et al.*, 2007).

Les résultats du test sur la catalase effectués sur les souches sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Résultats du test catalase

Souches	Catalase (+/-)
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
<i>Serratia marcescens</i>	+
<i>Serratia odorifera</i>	+
<i>Enterobacter cloacea</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+

L'apparition des bulles d'oxygène se traduit par la dégradation de l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et oxygène :



4.1.3.2. Identification par le système API

La détermination des caractères biochimiques est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces bactériennes. Dans notre travail nous avons utilisé deux API 20staph, et huit API 20E.

Résultats et discussion

Comme déjà mentionné, chaque galerie contient 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, au dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les souches ont été identifiées avec un logiciel d'identification. Les résultats des tests sont consignés dans **les tableaux 12 et 13**.

Tableau 12 : Résultats des tests d'identification par la galerie miniaturisée API 20E

Tests	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsielle pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Enterobacter cloacea</i>
ONPG	-	-	+	-	+
ADH	+	-	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+
ODC	+	-	+	+	+
CIT	-	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	+
URE	-	+	+	-	+
TDA	-	-	+	-	-
IND	+	-	-	-	-
VP	+	+	-	-	+
GEL	-	-	+	+	-
GLU	+	+	-	+	-
MAN	+	+	+	+	+
INO	-	+	-	+	-
SOR	+	+	-	+	+
RHA	+	+	-	+	+
SAC	-	+	-	+	+
MEL	-	+	-	+	+
AMY	-	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	-

Résultats et discussion

Tableau 13: Résultats d'identification par l'API 20staph

Tests	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+

4.1.4. Antibiogramme

Après l'identification précise des souches, on a effectué un antibiogramme afin de connaître les comportements des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons utilisé comme antibiotiques: l'ampicilline, la gentamicine (G), la pénicilline (P), l'ofloxacin (OFX), la tetracycline (TE).

Après lecture des résultats, on reporte ces mesures sur l'échelle de concordance correspondante. Les résultats de l'antibiogramme effectué sur les dix souches sont consignés dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Résultats d'un antibiogramme

	AMP	G	TE	P	OFX
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	17	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	7	12	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	20	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	7	20	-	-	-
<i>Serratia odorifera</i>	7	21	-	-	-
<i>Enterobacter cloacea</i>	7	14	-	-	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26	18	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22	12	-	-	-
<i>Enterobacter feacalis</i> ATCC 29212	-	-	-	25	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	26	20	-

Résultats et discussion

Toutes les souches se sont révélées sensibles à la gentamicine avec des diamètres variés. Le plus grand a été enregistré sur *E. faecalis* ATCC 29212 avec une zone de 25 mm, et le plus petit est de 12 mm enregistré sur *Escherichia coli*.

La pénicilline qui a été utilisée pour tester l'effet de *K.pneumoniae* ATCC 700603, a donné un diamètre d'inhibition autour de 20 mm, quant à la tetracycline, le diamètre est de 26 mm.

L'Ampicilline, n'a agi que sur deux souches qui sont *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922. Les diamètres ont été de 26 et 22 mm respectivement. D'après des travaux antérieurs sur le comportement des entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae*, montrent une résistance à l'AMP (Barhouchi, 2015), ce qui est en concordance avec nos résultats.

L'Ofloxacin a été testé sur trois souches, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212 a été la plus sensible avec un diamètre de 20 mm.

4.1.5. Test de sensibilité aux principes actifs

Lorsque des huiles sont soumises aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut être également critique même à l'état de traces, le solvant ne devrait pas empêcher la conduite du processus biologique (Yrjöen, 2004). Pour éviter toutes interactions possibles avec le solvant, les huiles ont été utilisées à l'état brut.

L'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur des huiles et des extraits a été qualitative par l'estimation du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. Elle est aussi quantitative par la détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI).

Les résultats de sensibilité des germes par la méthode de disque, ainsi par la méthode de microdilution sont représentés dans le **tableau 15**.

Suivant le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en (mm) autour de chaque disque, la lecture des résultats est faite comme suit (Djabou *et al.* 2013):

- Résistante (-) : diamètre 8mm
- Modérément sensible (+) : diamètre compris entre 8 et 14mm.
- Sensible (++) : diamètre compris entre 14 et 20mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre 20 mm.

Résultats et discussion

Tableau 15: Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de disque et la méthode de microdilution

Plante	Extraits		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter cloacea</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212
<u>SA</u>	HE	D	21±0	18±0	13±0	17±1	13±1.154	16±1.732	15±1.322	20±0.901	15±1.732	17±0
		CMI	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25
		CMB	6.25	6.25	12.5	6.25	25	25	12.5	12.5	6.25	12.5
		R/S	+++	++	+	++	+	++	++	++	++	++
	Extrait MeOH	D	18±1.5	-	20±0	19±1.732	-	20.5±0.866	-	-	-	-
		CMI	12.5	-	3.125	6.25	-	3.125	-	-	-	-
		CMB	25	-	3.125	6.25	-	3.125	-	-	-	-
		R/S	++		++	++	-	+++	-	-	-	-
<u>SJ</u>	HE	D	23±1.732	13±0	16±0.5	15±0	13±1	17±0	18.5±1.527	13.5±1.154	13.5±0.577	15.5±0.577
		CMI	3.125	50	6.25	25	12.5	3.125	1.562	12.5	6.25	3.125
		CMB	3.125	50	6.25	25	25	3.125	1.562	12.5	12.5	3.125
		R/S	+++	+	++	++	+	++	++	+	+	++

Résultats et discussion

D : diamètre de zone (mm) ;

CMI : Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{l/ml}$) pour les HE et ($\mu\text{g/ml}$) pour les extraits MeOH.

CMB : Concentration minimale bactéricide ($\mu\text{l/ml}$) pour les HE et ($\mu\text{g/ml}$) pour les extraits MeOH.

R/S : Résistante/sensible.

On note ici que les extraits méthanoliques sont solubilisés dans le même solvant (Méthanol) suivant le protocole utilisé. Chaque disque déposé à la surface de la gélose est chargé de $10\mu\text{l}$ du principe actif étudié.

4.1.5.1. Technique de l'aromatogramme

En milieu solide, l'action antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques testés se traduit par l'apparition ou l'absence d'un halo d'inhibition autour des disques.

Le screening des propriétés antibactériennes des deux échantillons d'huiles essentielles, révèle que ces huiles possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées avec une légère différence de sensibilité entre les bactéries gram+ et gram-.

L'essence des parties aériennes de *Calamintha* de la zone d'Annaba a montré un effet sur toutes les bactéries. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 13 et 21 mm.

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Serratia odorifera*, *Enterobacter cloacea*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, et *Enterobacte feacalis* ATCC29212 ont été les plus inhibées, *Serratia marcesence* et *Klebsiella pneumoniae* ont été les moins sensibles.

L'huile essentielle de la sarriette de la zone de Jijel exerce un effet puissant sur la majorité des souches étudiées avec un intervalle de diamètres des zones d'inhibition qui varie entre 13 et 23 mm. Les plus sensibles sont : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia odorifera*, *Enterobacter cloacea*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Enterobacte feacalis* ATCC29212, alors que les moins sensibles sont: *Escherichia coli*, *Serratia marcesence*, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603.

Staphylococcus aureus semble être l'espèce la plus sensible avec des zones d'inhibition de 21 et 23 mm. L'effet des deux échantillons est considéré parfois plus efficace que l'antibiotique de référence et ce pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*.

Le même effet est noté concernant la sarriette de la zone d'Annaba pour *Escherichia coli* ATCC25922 ainsi que l'huile de la zone de Jijel pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Résultats et discussion

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer probablement par la nature des parois des bactéries Gram (+) qui est dépourvue de membrane externe et qui semble être sensible aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels (**Balentine et al., 2006**).

Il est à noter aussi que les bactéries à Gram+ ont été un peu plus sensibles que les souches à Gram-, ceci est en accordance avec la majorité des travaux antérieurs. En effet, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques). En revanche chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et de lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'elles puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe. En revanche, de rares travaux rapportent l'inexistence de lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité inhibitrice des essences aromatiques et la nature de la paroi bactérienne (**Zaika, 1988, Boukhatem et al., 2014**).

L'évaluation du potentiel antibactérien des extraits a montré que seul l'extrait de la sarriette de la zone d'Annaba a pu réagir sur quelques germes. Quatre souches sont très sensibles avec des diamètres d'inhibition compris entre 18 et 20.5 mm. *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacea* sont les souches les plus sensibles sous l'effet de l'extrait avec une CMI de 3.125 µl/ml, et un diamètre d'inhibition de 20 et 20.5 mm respectivement, suivi par *Serratia odorifera* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres de 19 et 18 mm et une concentration inhibitrice de 6.25 et 12.5 µl/ml respectivement.

La variation de l'effet entre les deux extraits est peut être due à la teneur en polyphénols. Comme rapporté dans la littérature, le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées : l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration

Résultats et discussion

de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).

4.1.5.2. Méthode de microdilution en milieux liquide

La concentration inhibitrice minimale des HE des deux stations est en accord avec les résultats obtenus dans le test préliminaire par la méthode de l'aromatogramme autrement dit plus le diamètre autour du disque est important plus la CMI est intéressante et c'est le cas pour *Staphylococcus aureus* qui donne une CMI de 3.125 µl/ml. En général les valeurs de CMI sur les souches cliniques varient entre 6.25 et 12.5 µl/ml pour SA et entre 3.125 et 50 µl/ml pour SJ. *Escherichia coli* semble être la plus résistante avec une CMI de 50 µl/ml.

Les huiles essentielles exercent une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des souches de références, la plus petite concentration est de 1.562 µl/ml pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exercée par *Calamintha* de la zone de Jijel, suivi par *Enterobacte feacalis* ATCC29212 (3.125 µl/ml), puis *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 (6.25 µl/ml) et en dernière position *Escherichia coli* ATCC25922 (12.5 µl/ml). Alors que pour l'huile essentielle de la plante récoltée de la zone d'Annaba, la concentration inhibitrice est de l'ordre de 6.25 µl/ml pour *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, et *Enterobacte feacalis* ATCC29212 et de 12.5 µl/ml sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Des études réalisées sur la même espèce de *Satureja* et dans les mêmes conditions, par **Panizzi et al. (1993)**, sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E-coli* ATCC25922 ont donné des valeurs de CMI de 5 et 10 µg/ml respectivement et ceci est en accord avec nos résultats.

La concentration minimale bactéricide la plus importante est celle manifestée par SJ sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une CMB de 1.562 µl/ml puis sur *Staphylococcus aureus* et *Enterobacter cloacea* avec une CMB de 3.125 µl/ml. Les bactéries restantes ont donné un intervalle de CMB allant de 6.25 jusqu'à 25 µl/ml. Le plus faible effet est celui d'*Escherichia coli* avec une CMB supérieure à 50 µl/ml.

Résultats et discussion

Pour SA, l'effet bactéricide est compris entre 6.25 et 25 µl/ml.

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Serratia odorifera*, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 ont donné une CMB de 6.25 µl/ml, puis *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterobacte feacalis* ATCC29212 avec une CMB de 12.5 µl/ml et enfin *Serratia marcesence* et *Enterobacter cloacea* avec une CMB de 25 µl/ml.

Selon **Joubert et al.**, (1958), le rapport CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de pouvoir bactériostatique.

Les rapports CMB/CMI des deux huiles SA et SJ sont entre 1 et 2 ce qui confirme que les deux huiles exercent un effet bactéricide contre l'ensemble des microorganismes.

La bonne activité antibactérienne des deux huiles essentielles est peut être attribuée aux composants majoritaires menthone et pulégone ou à la pipéritone et la piperitenone avec leurs oxydes (**Panizzi et al**, 1993), ou alors aux composés mineurs, puisque l'efficacité d'un extrait ne peut pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée de différents composés (**Essawi et Srour**, 2000).

Il a été démontré qu'une huile essentielle entière exerce une activité antimicrobienne supérieure qu'un mélange de composants majeurs de la même huile essentielle, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique (**Wang et al.**, 2012).

Comme démontré dans ce chapitre l'activité de nos huiles sur l'ensemble des bactéries étudiées est très importante. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier l'espèce chimique ou les composés responsables de cette activité ainsi que la synergie d'action probable entre eux, ces études devront être confirmées par un suivi *in vivo*. Par la suite, le ou les mécanismes d'action seront recherchés et les éventuels effets secondaires seront évalués.

Résultats et discussion

4.1. Test d'activité antioxydante

4.1.1. Essai de caractérisation sur plaques CCM

Après développement dans le système solvant constitué d'Acétate d'éthyle : Méthanol (1 :1) et révélation des plaques de CCM par la solution de DPPH, le système chromatographique a permis de révéler des spots de couleur jaune sur un fond violet pour l'ensemble des extraits et des huiles essentielles.

L'apparition de ces spots en jaune signifie que ces molécules ont la capacité de réduire le DPPH. Ceci est synonyme d'une activité antiradicalaire et confirme que la capacité antioxydante est positive.

4.1.2. Piégeage du radical libre DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats le plus utilisé généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**).

La capacité antioxydante des huiles essentielles et d'extraits méthanoliques de la plante est mesurée en termes de capacité de piégeage des radicaux en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH qui s'accompagne par un passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (**Maisuthiasakul et al., 2007**). A des fins comparatives un antioxydant standard a été utilisé : la vitamine C.

Après mesures spectrophotométriques, Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de l'IC₅₀ (EC₅₀) pour chaque extrait. Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite, plus l'extrait possède une bonne activité antioxydante.

L'activité est considérée comme une diminution de l'absorbance de l'échantillon par rapport à la solution standard de DPPH.

Les résultats de mesure des pourcentages d'inhibition des huiles essentielles et des extraits de SA et SJ sont illustrés dans la (**Figure 18**) et ceux de l'acide ascorbique sont consignés dans la (**Figure 19**).

Résultats et discussion

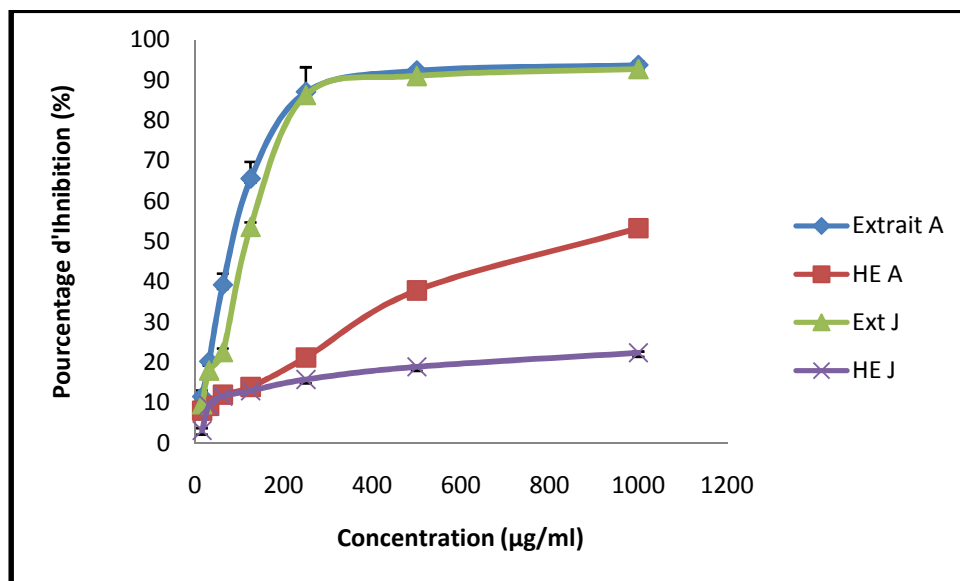


Figure 18: Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et des extraits méthanoliques (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

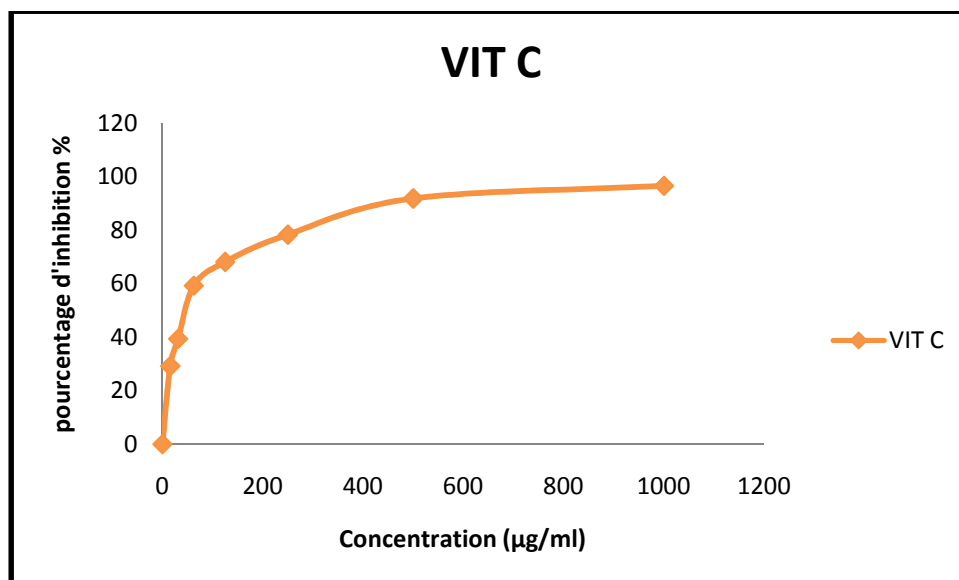


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de la Vitamine C (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

L'examen des figures montre que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en substrat, et ce pour les extraits, les huiles essentielles ainsi que la vitamine C. Plus précisément l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire.

Pour l'acide ascorbique, on assiste à une augmentation du pourcentage d'inhibition et cette augmentation est proportionnelle à la concentration de la solution jusqu'à la fin de

Résultats et discussion

l'expérimentation ou le pourcentage d'inhibition arrive à se stabiliser. L'IC₅₀ est très importante avec une valeur de $6,992 \pm 0,130 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs chercheurs pour exprimer leurs résultats. Les IC₅₀ de notre étude sont rapportées dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Résultats d'IC₅₀ des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de SA et SJ

Extraits	Plantes	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Huile Essentielle	SA	881.466 ± 4.954
	SJ	2724.511 ± 282
Extrait Méthanolique	SA	169.556 ± 0.436
	SJ	242.142 ± 0.452
Antioxydant standard	Vitamine C	6.992 ± 0.130

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèle que les extraits méthanoliques possèdent une activité antiradicalaire modérée avec des valeurs d'IC₅₀ plus au moins significative de l'ordre de $169,556 \pm 0,436$ et $242,142 \pm 0,452 \mu\text{g/ml}$ pour SA et SJ respectivement. Cependant, l'activité des huiles essentielles est moins efficace et insignifiante avec des valeurs d'IC₅₀ de $881\ 466 \pm 4,954$ pour SA et $2724,511 \pm 2,282 \mu\text{g/ml}$ pour SJ.

D'après le classement par ordre croissant schématisé dans la **figure 20**, on remarque que tous les extraits ont un pouvoir antioxydant inférieur à celui de l'antioxydant standard (Vit C). De même les extraits de la même plante présentent des valeurs d'IC₅₀ très distinctes.

On remarque aussi que le classement des extraits méthanoliques et des huiles essentielles varie dans le même sens pour les deux échantillons. Par ailleurs les extraits méthanoliques sont les plus puissants. Ce résultat peut être lié à la présence de composés ayant les mêmes structures chimiques dans les deux parties de chaque échantillon mais à forte abondance dans l'un par rapport à l'autre.

Résultats et discussion

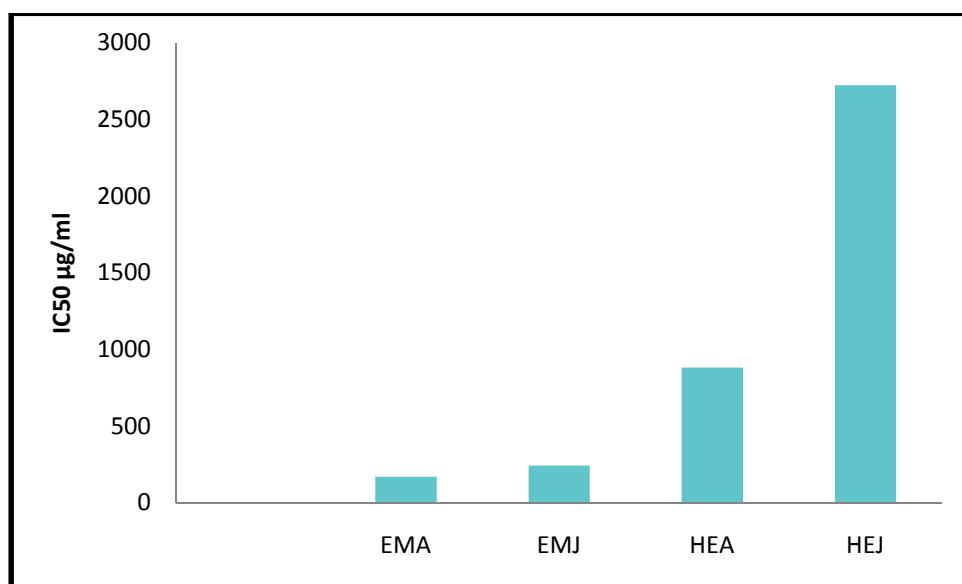


Figure 20 : Représentation des extraits méthanolique et des huiles essentielles des deux plantes selon leurs IC₅₀.

EMA : Extrait méthanolique de la zone d'Annaba

EMJ : Extrait méthanolique de la zone de Jijel

HEA : Huile essentielle de la zone d'Annaba

HEJ : Huile essentielle de la zone de Jijel

Cette réactivité plus importante des extraits méthanoliques par rapport à celle des huiles essentielles est probablement liée à la teneur en composés phénoliques dont la richesse est de 48,26% pour SA et 26,46% pour SJ par rapport à la masse totale de l'extrait. Il a été suggéré que la teneur en composés phénoliques de matières végétales est corrélée à leurs activités antioxydante et antibactérienne. Il est considéré que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur potentiel d'oxydo-réduction élevé, ce qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, et des désactivateurs d'oxygène singlet (Miguel, 2010).

De nombreuses tentatives ont été rapportées dans la littérature pour expliquer la relation structure-activité de certains composés antioxydants naturels (Es-Safi *et al.*, 2006). Il a été proposé que l'activité anti-oxydante est en relation avec le nombre de groupes hydroxyle sur le noyau des flavonoïdes (Cao *et al.*, 1997, Es-Safi *et al.*, 2006). Il est également proposé que l'activité antioxydante des flavonoïdes était dépendante de la présence de fonctions hydroxylées en ortho (Foti *et al.*, 1996).

Résultats et discussion

Des travaux réalisés sur les extraits méthanolique de satreja calamintha de la zone de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie) ont montré une faible activité antiradicalaire avec une valeur d'IC50 de 2075 µg/ml (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail sont meilleurs par rapport à ceux indiqués par l'équipe de Tlemcen (**Bougandoura, 2012**), nous constatons donc que nos échantillons sont plus efficaces, et cela est bien évidemment lié à la différence dans la composition chimique ou à des facteurs saisonniers.

Résultats et discussion

4.3. Activité antifongique

4.3.1. Effet anti-Candida

Candida albicans est un champignon inoffensif commensal qui peut infecter pratiquement tous les sites de l'organisme en raison de sa haute adaptabilité aux différentes niches d'accueil par l'activation d'un ensemble de gènes en réponse à des signaux environnementaux complexes (Vijaya *et al.* 2001). L'Amphotéricine B et le fluconazole, sont les deux antifongiques les plus communément utilisés pour le traitement des infections fongiques chez l'homme. Au cours de ces dernières années la résistance de *Candida* vis-à-vis de ces deux fongicides est en augmentation continue (Devkatte, 2005). Dans ce contexte, notre objectif a été d'évaluer le potentiel thérapeutique possible de l'huile essentielle de la sarriette contre cette levure.

L'évaluation *in vitro* des propriétés antifongiques sur *Candida albicans* des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux plantes avec un contrôle positif est récapitulée dans le **tableau 16**.

Tableau 16: Résultat de l'effet anti-*Candida* par la méthode du disque et de la microdilution.

Plantes	Extraits	Valeurs	<i>Candida albicans</i>
SA	HE	D CMI CMF	18 6.25 6.25
	Extrait MeOH	D CMI CMF	12 - -
SJ	HE	D CMI CMF	18.5 3.125 3.125
	Extrait MeOH	D CMI CMF	8 - -
ATF standard	Amphotericine B	D	17

Résultats et discussion

Les résultats révèlent que l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* de la zone de Jijel montre un effet anti-candida très significatif avec un diamètre d'inhibition de 18.5 mm et une CMI de 3.125 µl/ml. L'HE de *Calamintha* de la zone d'Annaba semble avoir le même effet antifongique que l'HE de Jijel puisque le diamètre autour du disque est de 18 mm et la valeur de CMI est significative. Elle est de l'ordre de 6.25 µl/ml.

L'antifongique standard : (Amphotéricine B), a donné un halo d'inhibition de 17 mm, soit un diamètre inférieur à celui de nos huiles.

Contrairement, la souche de *candida* est résistante vis-à-vis de l'extrait MeOH surtout celui de la zone de Jijel où le diamètre autour de l'halo est de 8 mm, alors que celui d'Annaba a montré un diamètre de l'ordre de 12 mm.

La légère supériorité de l'activité anti-candida de l'HE de la zone de Jijel est peut être en relation avec le taux de pulégone qui est de 14.04% cependant pour SA ce taux est de 1.75%. Cette molécule est très connue pour son effet antibactérien et anti-candida.

Dans une étude sur *Micromeria cilicica*, dont l'essence et son principe (la pulégone) ont fait l'objet de tests montrant leur activité antimicrobienne à l'égard de dix microorganismes parmi eux *Candida albicans*. L'essence dont la pulégone est le constituant majeur a présenté un pouvoir antimicrobien très important. Par ailleurs la pulégone s'est montrée deux fois plus active que la nystatine, antifongique standard utilisé vis-à-vis du *candida albicans* (**Duru et al., 2004**).

4.3.2. Effet sur des champignons phytopathogènes

La lutte contre les champignons phytopathogènes emploie généralement les fongicides synthétiques. Cependant, l'utilisation de ces derniers est de plus en plus restreinte en raison de leur effet nocif sur l'environnement et la santé humaine (**Harris, 2001**).

Parmi les pesticides les plus utilisés on peut citer le Propinèbe et le Vapcotop qui sont des substances actives (produits phytopharmaceutiques) pour la protection des plantes.

Le propinèbe est une substance active de produit phytosanitaire (ou produit phytopharmaceutique, ou pesticide), qui présente un effet fongicide. Il est d'origine allemande (Bayer), 1962), et appartient au groupe des dithiocarbamates. Il est assez persistant, de toxicité insignifiante (la LD 50 pour un rat par ingestion est de 8 500 mg•kg⁻¹), le propinèbe est utilisé, seul ou en association, pour la lutte contre le mildiou de la pomme de terre, le mildiou du tabac, les tavelures, le botrytis de l'ail et de l'oignon. Le premier nom de marque commercialisé est Antracol (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Propinèbe>)

Résultats et discussion

Quant au Vapcotop, c'est un fongicide appartenant à la famille des thiophanate-methyl (TM). La TM est généralement utilisée dans le traitement de plusieurs types d'arbres notamment les vignes, le canola, le blé et les racines de moisson. Il peut être appliqué en tant que traitement par immersion pour les fleurs coupées, bois de rose de bourgeon, ou de pépinière; et pour le traitement des semences pour l'arachide et les morceaux de pommes de terre.

La TM a été homologuée comme pesticide aux États-Unis en 1973 pour une utilisation comme fongicide.

Cette molécule est classifiée parmi les substances ayant une toxicité minimale : catégorie III/IV (soit par voie orale, contact avec la peau, ou par inhalation), toutefois, elle a été classée parmi les molécules pouvant avoir un effet cancérigène chez l'homme (**Anonyme, 2004**).

L'activité de ces deux fongicides sur les deux champignons est présentée dans le **tableau 17**. Ces deux fongicides sont utilisés dans notre travail dans le but de comparer leurs effets avec celui des huiles essentielles.

Comme mentionné ci-dessus Vapcotop et propinèbe sont utilisés à des concentrations de 2 mg/ml/ boîte de Petri et de 1.59 mg/boîte de Petri respectivement, ces concentrations sont utilisées par rapport aux concentrations mentionnées sur le sac de chaque produit.

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition mycélienne des deux fongicides

fongicides	Pourcentage d'inhibition mycélienne %	
	<i>Fusarium.sp</i>	<i>Aspergillus.sp</i>
Propinèbe	11.11±0.00	56.11±3.85
Vapcotop	55.55±0.00	67.22±7.69

L'interprétation des résultats est basée sur la mesure de la pousse fongique, et la cinétique de croissance. Cette lecture est effectuée par comparaison avec des boîtes témoins réalisées en même temps dans les mêmes conditions que les boîtes à tester.

Les valeurs moyennes des mesures journalières de diamètre de croissance des germes nous ont permis de réaliser les figures de la croissance mycélienne en fonction de la concentration en HE et du nombre de jours d'incubation pour chaque extrait. Elles nous permettent de voir rapidement l'influence de ces deux paramètres sur la croissance des moisissures en fonction de l'HE utilisée.

Résultats et discussion

L'analyse des figures, montre une augmentation de la croissance mycélienne avec l'augmentation du temps d'incubation. En revanche, la croissance mycélienne est réduite avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle. Il est à signaler aussi que les vitesses de croissance des deux souches sous l'effet des huiles apparaissent sous des formes différentes. La vitesse de croissance du *Fusarium* est plus accélérée que celle d'*Aspergillus*.

Pour mieux appréhender l'effet antifongique des deux huiles, un tableau des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction des concentrations a été réalisé (**Tableau 18**).

Tableau 18: Pourcentage d'inhibition mycélienne des huiles essentielles de SJ et SA

Plante étudiée	Concentrations (µl/ml)	Pourcentage d'inhibition mycélienne %	
		<i>Fusarium.sp</i>	<i>Aspergillus.sp</i>
SJ	0	0	0
	1	66,29±1,69	62,18±1,72
	2	100±0,00	100±0,00
	3	100±0,00	100±0,00
	4	100±0,00	100±0,00
	5	100±0,00	100±0,00
SA	1	16.66±0,00	28.853±4,557
	2	33.33±0,00	42,786±1,723
	3	61,48±0,64	52,735±0,654
	4	100±0,00	100±0,00
	5	100±0,00	100±0,00

D'après ce tableau, il ressort que les pourcentages d'inhibition des huiles testées augmentent avec l'augmentation de leurs concentrations. En effet, les huiles des deux zones semble exercées une bonne activité sur les deux champignons mais l'HE de la zone de Jijel présente les valeurs inhibitrices les plus élevées et se révèle être le fongicide le plus efficace contre les deux moisissures. La diminution de la croissance mycélienne en présence des huiles essentielles est peut être due à leurs teneurs élevés en molécules terpéniques à activité antifongique.

D'après les figures (**21** et **22**), La pousse mycélienne sous l'effet de S_J ne commence qu'après cinq jours pour *Fusarium*, et six jours pour *Aspergillus* pour une concentration en HE de 1 µl/ml. Les résultats de l'effet antifongique montrent que cette huile possède une activité très

Résultats et discussion

forte sur les deux souches et ce même à faibles concentrations. La CMI obtenue au 9^{ème} jour est de 2 µl/ml. A une concentration de 1µl/ml cette huile produit une réduction mycélienne significative avec un taux d'inhibition de 66,29% pour *Fusarium* et 62,18% pour *Aspergillus*. Alors que la croissance des deux moisissures est complètement inhibée à des concentrations de 2, 3, 4, 5 µl/ml.

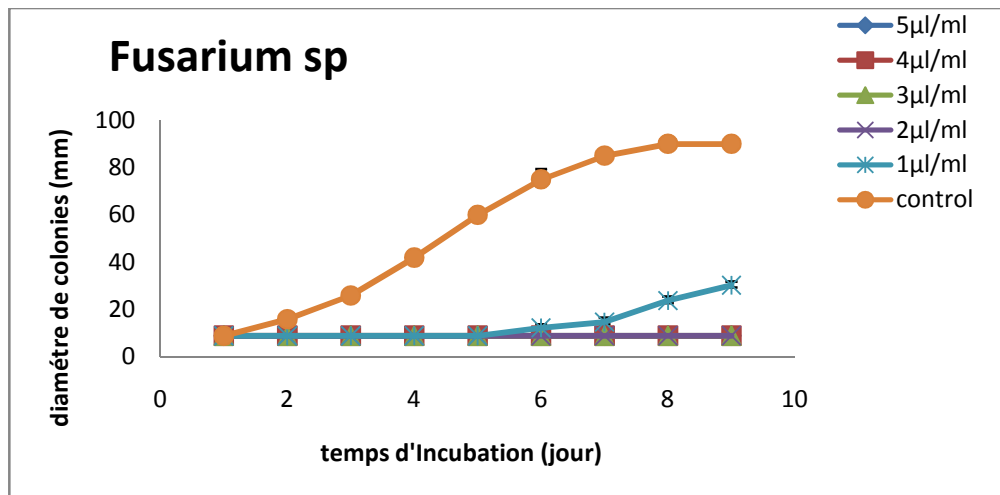


Figure 21 : Effet de l'huile essentielle de SJ sur la croissance de *Fusarium. sp*

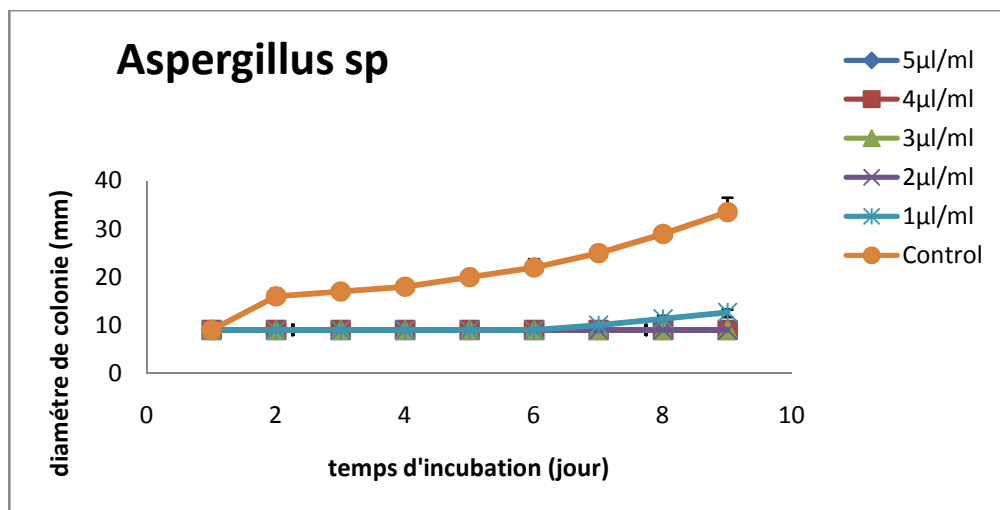


Figure 22 : Effet de l'huile essentielle de SJ sur la croissance d'*Aspergillus. sp*

Il est possible que l'activité antifongique de ces huiles essentielles peut être due à la présence de la menthone, et aussi la pulégone. Il a été démontré que la menthone, est l'une des molécules bioactives dont sa structure est en relation avec son effet antifongique.

Des travaux antérieurs menés sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'HE de *Mentha piperita* et ses produits majoritaires : Menthol, Carvone et Menthone ; ont montrés que ces

Résultats et discussion

substances sont caractérisées par des valeurs de MIC basses et d'une cytotoxicité négligeable. Ces substances contribuent à la production des enzymes hydrolytiques (Protéinase et phospholipase) secrétées par les cellules fongiques lors d'une interaction avec la substance active (Samber, 2014).

Dans une autre étude effectuée sur l'HE de *Mentha suaveolens*, il a été démontré que la pulegone est la molécule la plus active (plus active que la menthone) sur l'ensemble des microorganismes testés (Oumzil, 2002). Il a été prouvé aussi que cette molécule est douée d'activités antibactérienne et antifongique (Javidnia, 1996).

Cependant, l'HE de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba a été moins active que celle de Jijel avec une concentration inhibitrice minimale de 4µl/ml. La pousse mycélienne de *Fusarium* a débuté au 2^{ème} jour d'incubation et ce pour une concentration en HE d'1µl/ml, 3^{ème} jour pour une concentration de 2µl/ml. En revanche elle n'a commencé qu'au 5^{ème} jour à une concentration de 3µl/ml (Figure 23). Pour la souche d'*Aspergillus* la croissance a démarré à partir du 2^{ème} jour pour une concentration de 1µl/ml, alors qu'à des concentrations de 2 et 3 µl/ml la croissance mycélienne n'est observée qu'à partir du 7^{ème} jour (Figure 24).

Pour les pourcentages d'inhibitions, une variation significative a été notée entre les différentes doses quant à l'intensité et la rapidité de l'effet antifongique (Tableau 18). Pour des doses de 1, 2, 3 µl/ml le pouvoir inhibiteur sur *Fusarium* a été de 16,66, 33,33 et 61,48% respectivement. Pour les mêmes doses l'effet inhibiteur sur *Aspergillus* a été de 28,853, 42,786 et 52,735% respectivement.

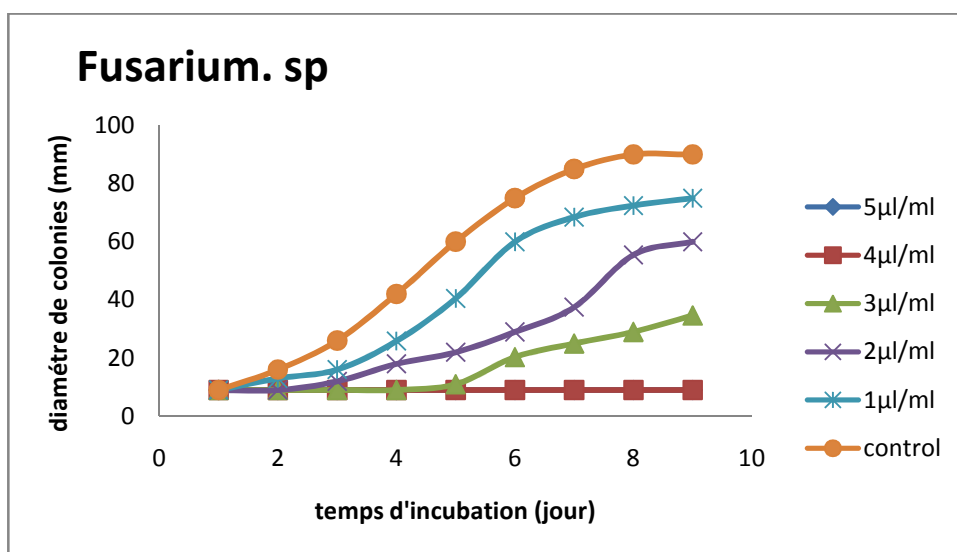


Figure 23 : Effet de l'huile essentielle de SA sur la croissance de *Fusarium. sp*

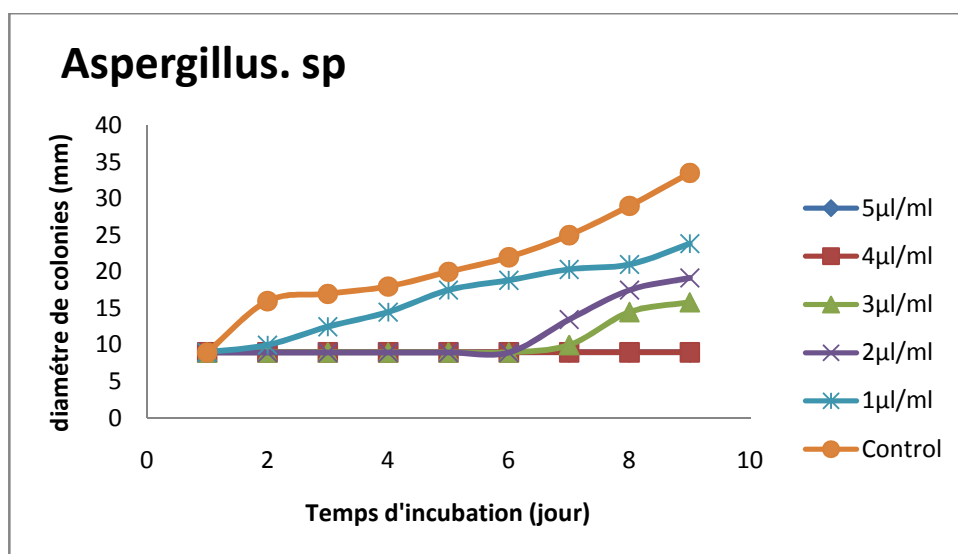


Figure 24 : Effet de l'huile essentielle de SA sur la croissance d'*Aspergillus. sp*.

De même qu'avec la SJ, on remarque que la relation concentration-pourcentage d'inhibition est proportionnelle. Une activité inhibitrice de 100% est obtenue à partir d'une concentration de 4 µl/ml.

D'après tout ces données on remarque que l'HE de *Calamintha nepeta* de la zone d'Annaba s'est montré le moins efficace sur les deux souches testées. Ceci implique que ces souches sont moins sensibles (taux d'inhibitions inférieurs à 50%) pour des concentrations de 1 et 2 µl/ml. On remarque aussi, que cette huile présente un effet proche de celui de propinèbe sur la souche *Fusarium. sp* à une concentration de 1 µl/ml.

Comparée à l'huile essentielle d'Annaba, l'huile essentielle de Jijel a été la plus puissante. Cette divergence de résultats serait due au ratio en produits majoritaires. La Piperitone oxide qui est le produit principal (54.71%) de la plante de la zone d'Annaba (SA) est moins active par rapport à la pulegone. Ceci a été confirmé par l'étude de **Oumzil et al., (2002)**. On peut constater, que l'activité antifongique des deux huiles essentielles est influencée par leur composition chimique. Sur la base de la variabilité de cette composition, les HE agissent différemment sur les souches fongiques testées.

Par ailleurs, les deux fongicides ont agi différemment sur les germes testés. Propinèbe a été moins actif sur *Fusarium.sp* par rapport à Vapcotop. Néanmoins sur *Apssegillus.sp* il a donné un pourcentage d'inhibition mycélienne qui dépasse les 50%. Vapcotop a été trouvé efficace sur les deux souches avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%.

Résultats et discussion

En conclusion, nos extraits révèlent des activités très importantes comparées à celles des molécules de références étudiées (Propinèbe et Vapcotop). On note que cette huile a été plus puissante que Propinèbe sur la souche d'Aspergillus et son effet a été presque identique à celui du Vapcotop sur la même souche.

Ce potentiel antifongique des deux huiles ouvre d'une part des perspectives comme conservateurs alimentaires palliant l'utilisation des molécules synthétiques, et d'une autre part peut trouver une issue éventuelle en application phytopharmaceutique.

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps comme remèdes des maladies humaines puisqu'elles contiennent des composants chimiques de valeur thérapeutique. Selon l'OMS, plus de 80% de la population mondiale dépendent encore de la médecine traditionnelle pour prendre soin de leur santé.

En Algérie, nombreuses sont les plantes décrites pour leurs vertus médicinales, c'est en cela que nous nous sommes intéressés à étudier une plante du nord est algérien dont le but est de valoriser davantage les ressources du sol local.

Notre travail étudie les propriétés microbiologiques et antioxydantes des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'une plante spontanée de la région de Annaba et de la région de Jijel.

Les huiles essentielles se présentent généralement sous forme de mélanges complexes dont il est nécessaire de connaître avec précision la composition avant toute étape de valorisation. La caractérisation d'une huile essentielle est une opération indispensable lorsque l'on souhaite la contrôler, la commercialiser, ou mettre en évidence son éventuelle spécificité.

Les parties aériennes sont soumises à extraction par hydrodistillation et les rendements en huiles essentielles sont très importants, ils sont compris entre 1.48 et 2.54 %.

Pour la détermination de la composition chimique, les HE sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS). *C. nepeta* de la zone de Annaba (SA) a révélé la présence de 20 composants et celle de la zone de Jijel (SJ) 34 composants. L'HE de SA est dominée par la présence de la Piperitone oxide (54.71%) et Cyclohexanone,2-(1 méthylethylidene)- (20.32%). Celle de (SJ) est représentée par la Menthone (26.46%), Piperitone oxide (22.26%) et la pulegone (14.04%).

Les extraits méthanoliques qui sont obtenus par extraction avec le Soxhlet ont donnés des rendements de l'ordre : 14.6% pour (SA) et 12% pour (SJ).

L'analyse quantitative de la teneur en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu montre la présence de quantités importantes de substances phénoliques surtout pour (SA) dont le taux est presque deux fois plus que celui de (SJ).

L'étude de l'activité antioxydante est effectuée par le Test de DPPH. Les résultats montrent que les extraits ont donné une activité antiradicalaire moyennement satisfaisante malgré leurs

Conclusion générale et perspectives

grandes teneurs en polyphénols. Tandis que l'activité des huiles essentielles est moins efficace et presque insignifiante.

L'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur des huiles et des extraits révèle que les HE de la plante exercent un effet inhibiteur puissant sur la majorité des souches testées.

Il est important de noter que l'extrait méthanolique de SA s'est montré actif sur quelques souches. Sinon on peut considérer que ces extraits sont dépourvus d'activité antibactérienne.

Enfin, l'action des HE sur une levure: *Candida albicans* et deux moisissures phytopathogènes: *Fusarium. sp* et *Aspergillus. sp* a montré que l'HE de (SJ) possède une activité inhibitrice très forte sur la croissance mycélienne de ces deux champignons à de faibles concentrations. Cependant, l'activité inhibitrice de l'HE de (SA) est modérée par rapport à (SJ).

Les huiles essentielles de *Satureja calamintha nepeta* peuvent trouver des applications dans le domaine de la conservation des fruits et légumes vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

Ce travail nécessite d'être poursuivi pour les activités antioxydante ou antibactérienne importantes de ces huiles et extraits, car le problème de la résistance bactérienne se pose de plus en plus ainsi que les effets négatifs sur la santé humaine des additifs de synthèse.

Il serait intéressant aussi de procéder à une analyse structurale des constituants présents dans les extraits méthanoliques ainsi que les produits d'hydrolyse résultant de l'interaction huile essentielle/ champignons.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adams RP., 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publ.Corp., Carol stream, IL. P:445.

Aghnihotri VK., Agarwal SG., Dhar PL., Thappa RK., Baleshwar., Kapahi BK., Saxena RK., Qazi GN., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulgium* L., growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour. Frag. J.* 20: 607-610.

Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan. J. Agric. Sci.* 4: 265 - 274.

Anonyme., 2004. US EPA Archives Document, R.E.D. FACTS, Thiophanate-Methyl. United States.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed Masson, Paris,

Aruoma IO., 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 75, 199–212.

Avril JL., 1991. Dictionnaire pratique de bactériologie. Ed : Ellipses. P :8-86.

B

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. *Rev: Food. Chem.Toxicol.* 46: 446–475.

Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., 2000. Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flav. Fragr. J.* 15 :50-54.

Balentine CW., Crandall PG., O'Bryan CA., Duong DQ., Pohlman FW., 2006. The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science.* 73: 413-421.

Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert JM., Bernardini JF., Costa J., 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum*

Références bibliographiques

glandulosum Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106:132-139.

Barhouchi B., 2015. Synthèse des dérivés glucidiques, lipidiques et protéiques d'origine biologique et applications industrielles. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie. P 148.

Baser KHC., Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

Bauer AW., Kirby WMM., Sherris JC., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* 15, 169–172.

Bertini LM., Pereira AF., Oliveira CLL., Menezes EA., Morais SM., Cunha FA., Cavalcanti ESB., 2005. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma.* 17:80-83.

Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Ed Masson, Paris, 486 p.

Bicchi C., Liberto E., Matteodo M., Sgorbini B., Mondello L., d'Acompara Zellner B., Costa R., Rubiolo P., 2008. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.* 23 : 382-391.

Billing J., Sherman PW., 1998. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 3-49.

Boizot N., Charpentier JP., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des techniques de l'Inra.* 79-82.

Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed TEC&DOC, Lavoisier, Paris. P : 1021-1043.

Références bibliographiques

Bougandoura N., 2011. Pouvoir Antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha ssp nepta (nabta)* et *Ajugaiva L. (chendgoura)* de l'ouest d'Algérie. Thèse de Magister. Université Abou Baker BelKaied, Tlemcen, Algérie. P 85.

Bougandoura N., Bendimerad N., 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie.* 09 : 14-19.

Boukhatem MN., Ferhat MA., Kameli AK., Saidi F., Taibi H., Teffahi D., 2014. Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris L.*) en aromathérapie anti-infectieuse. *International Journal of Innovation and Applied Studies.* 8(4): 1418-1431.

Bouquet A., 1972. Plantes médicinales du Congo Brazzaville. Ed O.R.S.T.O.M.

Bowles EJ., 2004. The chemistry of aromatherapeutic oils.. 3rd Ed. Crows Nest, NSW: Allen & Unwin Academic.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic LJ., Simin N., Samojlik I., Couladis M., 2008. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* scheele essential oils. *Molecules.* 13(9):2058–2068.

Bray L., 2005. Phylogénie des Angiospermes. Consulter le 22/07/2012 sur : <http://www.botanique.org>

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 915.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1120.

Bruneton J., 2008. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1188.

Buronzo AM., 2008. Le Grand Guide des Huiles essentielles. Ed : HACHETTE Pratique. P : 235.

Références bibliographiques

Buettner, GR., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:535-543.

Burits M., Bucar F., 2000. Antioxydant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research.* 14: 323-328.

Burt S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. *A review intern : J. Food. Microbiol.* 94: 223-253.

C

CASFM : comite de l'antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. Recommandations 2012. Consulter le 17/06/2013 sur: <http://www.sfm-microbiologie.org/>

Cantino PD., Harley R M., Wagstaff SJ., 1992. Genera of Labiatae: Status and Classification. In R.M. Harley & T. Reynolds (Eds.), *Avances in Labiatae Science*. Kew: Royal Botanical Gardens, P : 511–522.

Caillet S., Lacroix M., 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). P :1- 8.

Cao G., Sofic E., Prior RL., 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure–activity relationships. *Free. Radical. Biol Med.* 22:749–760.

Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Hinton G., 1987. *Bactériologie médicale : Technique usuelle*, Ed : SINEP. P: 51.

Carr G., 2004. Vascular plant family. Consulter le 25/05/2011 sur : <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/pfamilies.htm>

Carré P., 1953. *Précis de technologie et de chimie industrielle*. T3. Ed Ballière JB. et fils.

Carson CF., Rilley TV., Bosque F., 2002. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *J.Appl. Bacteriol.* 78: 264-269.

Cavallo JD., 2007. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Références bibliographiques

Cazzola C., Doublet C., 2015. Mise au point d'une technique de séparation et de quantification des composés présents dans une huile essentielle. Rapport PE huiles essentielles, projet de l'Institut National des Sciences Appliquées de Rouen (INSA).P :13-14.

Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt CO., Vey M., 2003. Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *J Agric. Food. Chem.* 51 : 398-403.

Chemat F., Lucchesi ME., Smadja J., 2004. Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1.

Clement RP., 2005. Aux racines de la phytothérapie : entre traditions et modernité. *Phytotherapie.* 4:171-175.

CLSI., 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test. Fifteenth International Supplement. Wayne. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S16.

Colombo RP., Martíneza AE., di Pardo AF., Bidondo LF., Van Baren C., Di Leo Lira P., Godeas AM., 2013. Differential effects of two strains of *Rhizophagus intraradices* on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta*. *Rev. Argent. Microbiol.* 45: 114-118.

Cosentino S., Tuberoso CIG., 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian. *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology.* 29(2): 130-135.

Cox SD., Gustafson JF., Warmington JR., Wyllie SG., 1991. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *J.Appl. Microbiol.*88:170-175.

Croteau R., Kutshan TM., Lewis NG., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchana, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds), *biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of plant Physiologists, 1408 : 1250-1268.

D

Références bibliographiques

Dacosta Y., 2003. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris. P:317.

Daels-rakotoarison D., 1999. Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. P : 64.

Daferera DJ., Ziogas BN., Polissiou MG., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop. Protection*. 22 :39–44.

Daniel M. Medicinal Plants: chemistry and properties; 2006.Ed: SCIENCE PUBLISHERS. P: 59,77.

Dasgupta N., De B., 2007. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. *Food Chem*. 101:471 – 474.

Dastmalchi, K., Damien Dorman, HJ., Oinonen, PP., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food. Sci. tech LWT*. 41 (3), 391-400.

Davis J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 264, 375–382.

De Pooter HL., Goetghebeu P., Schamp P., 1987. Variability in composition of the essential oil of *Calamentha nepeta*. *Phytochem*. 26(12): 3355-3356.

De Rijke E., Out P., Niessen WMA., Ariese F., Gooijer C., Brinkman UAT., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J.Chromatogr. A*. 1112: 31 - 63.

Devkatte AN., Zore GB., Karuppayil SM., 2005. Potential of plant oil as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*. 5: 867-73.

Djabou N., Lorenzi V., Guinoiseau E., Andreani S., Giuliani MC., Desjobert JM., Bolla JM., Costa J., Berti L., Luciani A., Muselli A., 2013. Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxic-infectious pathogens. *Food Control*. 30: 354-363

Références bibliographiques

Dohou N., Yamni K., et Tahrouch S., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Phrm.*142: 61-78.

Duru ME., Ozturk M., Ugur A., Ceylan O., 2004. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 94:43-48.

E

Eberhard T., Robert A., Annelise L., 2005. Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.

Es-Safi NE., Kollmann A., Khlifi S., Ducrot PH., 2006. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. *LWT.* 40: 1246-1252.

Essawi T., Srour M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J.Ethnopharmacol.* 70: 343-349.

F

Fasty D., 2007. Ma bible des huiles essentielles. Leduc Editions. P :20.

Favier A., 2003. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique.* 108-117.

Favier A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 390-396.

Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix JJ., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* .121-216.

Foti M., Piattelli M., Baratta MT., Ruberto G., 1996. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure–activity relationship. *J.Aгри. Food Chem.* 44:497–501.

Franchomme P., Pénéol D., 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. P:445.

Références bibliographiques

François S., 2000. Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. *Hygiène en milieu hospitalier*.30 :8-13.

Freney J., Renaud F., Leclercq R et Riegel P., 2007. Précis de bactériologie clinique. Ed : ESKA, paris. P : 17-64.

G

Gende LB., Mendiara S., Fernández NJ., Van Baren C., Di Leo Lira A., Bandoni A., Fritz R., Floris I., Eguaras M., 2014. Essentials oils of some *Mentha* spp. and their relation with antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees, by using the bioautography technique. *Bull. Insect.* 67 (1): 13-20.

Gilly G., 2005. Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: Botanique, Culture, Chimie, Production et Marché. Edition l'Harmattan,

Guignard JL., 1996. Biochimie Végétale. Ed Masson, Paris.

Guignard JL., 1998. Abrégé botanique. 11^{ème} Edition Masson, Paris.

Guignard JL., 2001. Botanique systématique moléculaire. Ed Masson, Paris.

Guinoiseau E., 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat. Université de corse, France. P 114.

Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., 2003. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil, methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agri.Food. Chem.* 51: 3958–3965.

Gulluce M., Aslan A., Sokmen M., Sahin F., Adiguzel A., Agar G., Sokmen A., 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine.* 13: 515–521.

H

Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl. Microbiol.* 86:985-990.

Références bibliographiques

Hagerman AE., Riedl KM., Jones GA., Sovik KN., Ritchard NT., Hartzfeld PW., Huang D., Ou B., Prior RL., 2005. The chemistry behind antioxydant capacity assays. *J.agri. food chem.* 53(6): 1841-1856.

Harris CA., Renfrew MJ., Woolridge MW., 2001. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food. Addit. Contam.* 18:1124-9.

Hart T., Shears P., 1997. Atlas de poche de Microbiologie. P :17.

Havsteen BH., 2002. The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96:67–202.

Huang D., Ou B., Prior RL., 2005. The chemistry behind Antioxydant capacity assays. *J. Agrc. Food. chem.* 53:1841-1856.

Hubert Richard., 1998. Biochimie de l'aliment, acides aminés et oligopeptides ENSIA.

Hurtel JM., 2006. Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé. Consulter le 02/09/2014 sur: www.phytomania.com

Hüsnü can ba er K., Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application. Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS., P: 121.

I

Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparation, soin. Ed Larousse. P: 267.

Iwueke AV., Nwodo OFC., 2008. Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of Daniella oliveri and Sarcocephalus latifolius roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri.* 20: 63 - 70.

J

Jaakola L., 2013. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. Trends in plant. *science.* 18:477-483.

Références bibliographiques

Javidnia K., Tabatabaiee M., Shafiee A., 1996. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ziziphora tenuis*, population Iran. *DARU*. 6:56-9.

Joubert TL., Chambon P., Gattefosse M., 1958. Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et mélanges ; *Bull. Tech. Gatte*. 56 : 7-16.

Jungkind DL., 1995. Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], P 248.

K

Kalemba D., Kunicka A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10 : 813-829.

Kapoor R., Giri B., Mukerji KG., 2002. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum [*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague]. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 18:459-63.

Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A., 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 76: 183–186.

Kerbouche L., Hazzit M., Baaliouamer O., 2013. Essential Oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. Volume. 3, Issue 4.

Khan MAU., Ashfaq MK., Zuberi HS., Mahmood MS., Gilani AH., 2003. The in vivo Antifungal Activity of the Aqueous Extract from *Nigella sativa* Seeds. *Phytother. Res.* 17: 183–186.

Kitic D., Stojanovic G., Palic R., Randjelovic V., 2005. Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonda* (Borb.) Hayek from Serbia. *J. Essent. Oil. Res.* 17: 701-703.

Références bibliographiques

Koehlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165–177.

Koneman EW., Allen SD., Janda WM., Scherckenberger PC., Winn WC., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Kopp S., Schweizer WB., Altman KH., 2009. Total synthesis of Valerenic Acid. *Synlett*. 1769-1772.

Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R. 2001., Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 33: 2-16.

L

Lahlou M., 2004. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour .Fragr. J* .19, 159–165.

Lardry JM., Haberkorn V., 2007. Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews*. 61: 18-23.

Lawrencet Brian M., 2000. Essential oils: from agriculture to chemistry. *J.Aromatherapy*. 10: 82-98.

Lee KW., Kim YJ., Lee HJ., Lee CY., 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than teas and Red Wine. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 7292-7295.

Liang YZ., Xie P., Chan K., 2004. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B*, 812: 53-70.

Licina BZ., Stefanovic OD., Vasic SM., Radojevic ID., Dekic MS., Comic LR., 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*. 33: 498-504.

Lingk W., 1991. Health risk evaluation of pesticide contamination in drinking water. *Gesunde Pflanz*; 43:21–25.

Références bibliographiques

Lucchesi ME., Chemat F., Smadja J., 2004^a. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A.* 1043: 323-327.

Lucchesi ME., Chemat F., Smadja J., 2004^b. An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices», *Flavour. Fragr. J.* 19: 134-138

Lucchesi ME., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F., 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food .Engineer.* 79 :1079- 1086.

M

Madhavi DL., Deshpande SS., Salunkhe DK., 1996. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P: 65.

Maisuthiasakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P., 2007. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food composition and analysis.* 21: 229-240.

Makoi JHJR., Ndakidemi PA. , 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *Afric. J.Biotech.* 6(12): 1358-1368.

Mazars G., 2003 .Les phytomédicaments âyurvédiques. *Phytothérapie.* 6: 162-168.

Miguel MG., 2012. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour. Fragr.J.* 25: 291-312.

Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S., 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochem. Rev.* 3 :173-193.

Möller K., 2008. La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO. P : 152.

Références bibliographiques

Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.

Muanda FN., 2010. Identification de Polyphenols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. P 239.

Multon JL., Richard-Molard D., and Roquebert MF., 1998. Moisissures des alimentpeu hydrates. Lavoisier Tec&Doc, France.

Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover FC., Tenover FC., Yolke RH. 1995. Manual of Clinical Microbiology. sixth Ed. ASM, Washington, DC, USA.

N

Nauciel. C., and Vildé J.L., 2005. Bactériologie médicale. 2èmeEd. Masson, Paris. P: 5,10.

Nicklin J., Graeme K-Cook., Paget RT., Killingtons R., 2000. Essentiel en microbiologique .Berti édition .paris. P : 3,75.

O

Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food. Chem.* 112: 874–879.

Okmu DE., 2005. Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int. J. Mol. Adv. Sci.* 1(14): 375-381.

Ordóñez A., Baldoncini S., Berioli G., Chaves G., Bled L., Massuh Y., Liébana C., Torres L., Ojeda M., 2006. Domestication of native aromatic plants. *Mol. Med. Chem.* 11:58-59.

Oumzil H., Ghouami S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M., Benjouad A., 2002. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* 16:727-731.

Références bibliographiques

P

Panizzi L., Flamini G., Cioni PL., Morelli I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 39: 167-170.

Pauli A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 11 : 126-133.

Pellerin P., 2001. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim. V.* 94:51-62.

Peskin AV., Winterbourn CC., 2000. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta.* 293 :157–166.

Pietta PG., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63:1035-1042.

Piquet MA., et Hébuterne X., 2007. Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16,20.

Podsdek A., 2007. Natural antioxidants capacity of Brassica vegetables. *LWT.* 40:1-11.

Poknory J., Yanishlieva N., Gordon H., 2001. Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.

Pourmortazavi SM., Hajimirsadeghi SS., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.* 1163: 2-24.

Q

Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, P :788-789.

Références bibliographiques

R

Randrianarivelo R., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « cinnamosma fragrans », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo. P :45.

Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.

Richard F., 1992. Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc. P :1228-1242.

Richard H., 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. P :339.

Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., 1995. Essential oils of *Calamintha nepeta subsp.nepeta* and *subsp.glandulose* from Corsica (France). *J. Essent. Oil. Res.* 8: 363-366.

Rizk AM., 1982. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia.* 52: (2), 35-42.

Roux D., Catier O., 2007. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3^{ème} Edition, wolters Kluwer. P 141.

Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi ., 2010. C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25, 282-290.

S

Samber N., Varma A., Manzoor N., 2014. Evaluation of Mentha piperita Essential Oil and its Major Constituents for Antifungal Activity in Candida spp. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Tech.* 3(2): 9404-11.

Sarer E., Pançali SS., 1998. Composition of the Essential Oil from Calamintha nepeta (L) Savi ssp glandulosa (Req) P W Ball. *Flav. Fragr. J.* 13:31-32.

Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. P : 2, 10.

Références bibliographiques

Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M., Chaouch A., 2001. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 94(956): 241-250.

Senatore F., Arnold NA., Piozzi F., 2004. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A.* 1052 : 237-240.

Service RF., 1995. Antibiotics that resist resistance. *Science.* 270:724–727.

Sharma A., Gupta S., Sarethy IP., Dang S., Gabrani R., 2012. Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food. chem.* 135: 672–675.

Shellie R., Marriott P., Chaintreau A., 2004. Quantification of suspected allergens in fragrances: evaluation of comprehensive two-dimensional GC for quality control. *Flavor. Fragr. J.* 19: 91-98.

Simonpoli P., 1993. Arburi, arbe, arbigliule : Savoirs populaires sur les plantes de Corse. Ajaccio, Parc naturel régional de la Corse.

Singh SB., Barrett JF., 2006. Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015.

Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey NK., Gupta R., 2008. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J. Sci. Food. Agric.* 88:2421–2425.

Skoc̃ibus̃ić M., Bezić N., Dunkić V., 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food. Chem.* 96: 20–28

Slinkard K., Singleton VL., 1977. Total phenol analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 49–58.

Smallfield B., 2003. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop. Food. Res.* 45-49.

Références bibliographiques

Smirnoff N., 2005. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants; Ed BLACKWELL. P: 141-210.

Smythies JR., 1998 . Every Person's Guide to Antioxidants. Ed: BRITISH CATALOGING; p: 89-110.

Sokmen A., Jones BM., Erturk M., 1999. The in vitro antibacterial activity of Turkish plants. *Journal of Ethnopharmacol* .67, 79–86.

Speck B., Ursula., FotschC., 2008. Connaissance des herbes sarriette. EGK Caisse de Santé.

Stalikas CD., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci.* 30:3268 – 3295

Svobda KP., Hampson JB., 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA5 6HW.

T

Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosc, Biotech, Biochem.* 58(10): 1780-1783.

Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B., 2006. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. *J.Pharm. Biomed.Anal.* 41: 182–188.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food. Chem* .90:333–340.

Tian J., Ban X., Zeng H., He J., Huang B., Wang Y., 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J.Food. Microbiol.* 145:464–70.

Références bibliographiques

Toplisek T., Gutsafon R., 1995. Cleaning with d-Limonenes: a substitute for chlorinated solvents. *Precision Cleaning*. 3:17-20.

Trease E., Evans WC., 1987. *Pharmacognosy Billiaire*. Editions Tindall London 13: 61-62.

Twidwell EK., Wagner JJ. & Thiex Nancy J., 2002. Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. P:77-88.

U

Urquiaga INES., Leighton FEDE., 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.*33: 55-64.

(USAID), A.A.p.I.D.I., 2008. Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte Contre la Désertification: Maroc. p. 70.

V

Vârban DI., Duda M., Vârban R., Muntean S., 2009. Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis L.* Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*. 66(2), 225-229.

Vijaya M., Ingram C., Gray J., Nadeem AT., Bobby W., 2001. Echard, Debasis Bagchi and Harry G. Preuss Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell.Biochem*. 228: 111–117.

Vilas A., Kamble., 2012. In vitro anticandidal activity of pimenta dioica (allspice) essential oil against clinical isolates of *candida albicans* and non-albicans candida. *International journal of life science and pharma reaserch*. 2: 150-158.

Vincent MC., 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie, Paris.

Voukou D., Kokkini S. & Bressiere J.M., 1988. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . *Economy botanic*. 42:407-412.

Références bibliographiques

Viuda Martos M., Mohamady MA., Fernández López J., Abd El Razik KA., Omer EA., Pérez Alvarez JA., Sendra E., 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22: 1715-1722.

W

Wan PJ., Pakarinen DR., Hron RJ., 1995. Alternative hydrocarbon solvent for cottonseed extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:653-659.

Wang W., Wu N., Zu YG., Fu YJ., 2008. Antioxidant activity of Rosmarinus officinalis L oil compared to its main compounds. *Food chem.* 108 (3): 1019-1022.

Wang L., Yen JH., Liang HL., Wu1 MJ., 2003. Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.) *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(1): 60-66.

Wenqtang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T., Can Q., 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001: 1558-1564.

White N., 1994. Artemisinin: CUITent statut. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:3- 4.

Willem JP., 2004. Les huiles essentielles, Médecine d'avenir. Ed, Dauphin, Paris. P: 311.

Y

Yen TB., Chang ST., 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource of Technology*. 99: 232-236.

Yrjöen T., 2004. Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. P 76.

Z

Zaika LL., 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of food safety*. 9(2): 97-118.

Références bibliographiques

Zhiri A., Baudoux D., 2005. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg. P :8.

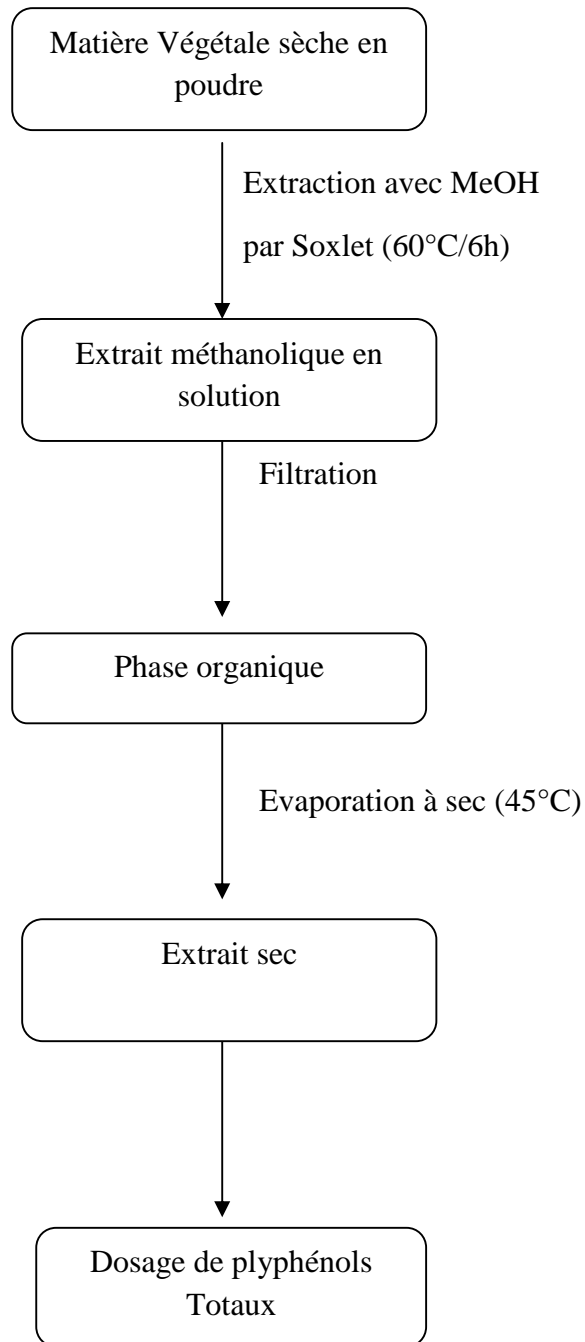
ADRESSE ELECTRONIQUE

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Propinèbe>, consulter le 25/01/2014.

Annexes

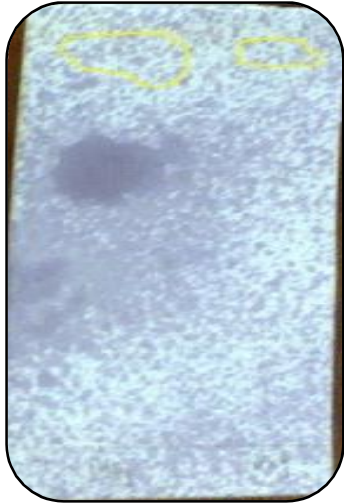
Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction d'extrait Méthanolique



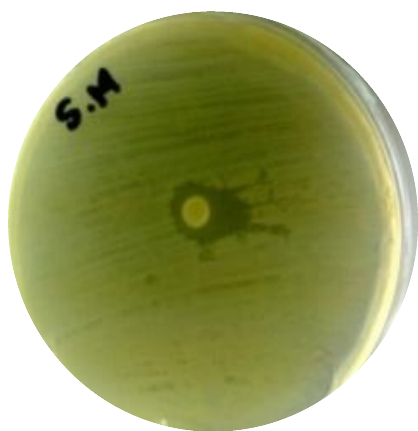
Annexes

Annexe 2 : Résultats du Test antiradicalaire contre le DPPH sur plaques de CCM

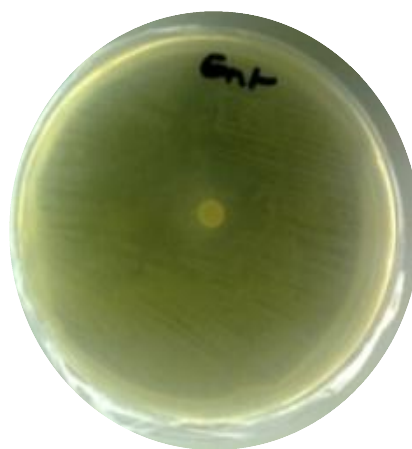


Annexes

Annexe 3 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne des HE de SJ et de SA respectivement par la méthode d'aromatogramme



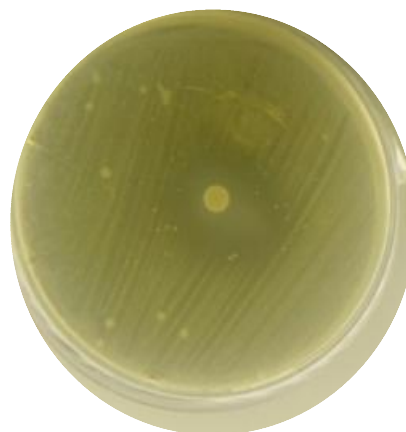
Serratia marcescens



Enterobacter cloacae



Enterobacter feacalis ATCC29212



Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus



Klebsiella pneumoniae

Annexes



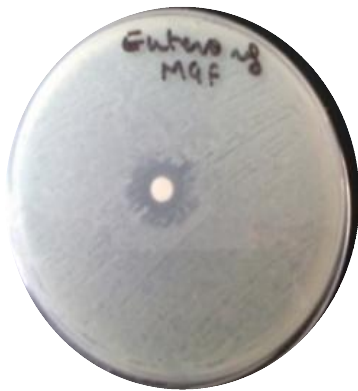
Escherichia coli



Escherichia coli ATCC25922



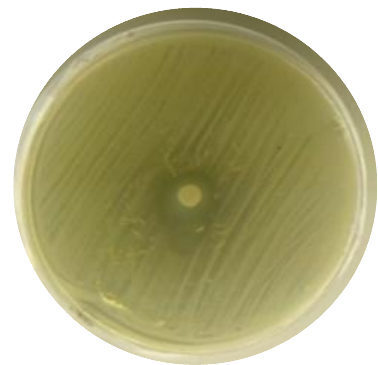
Enterobacter cloacae



Enterobacter feacalis ATCC29212



Klebsiella pneumonia ATCC13883



Serratia odorifera



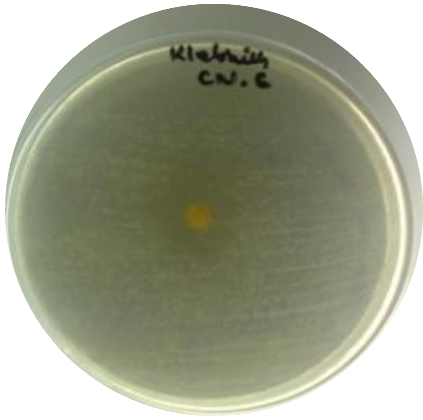
Staphylococcus aureus



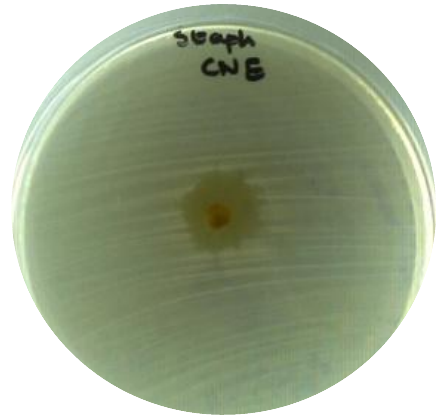
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Annexes

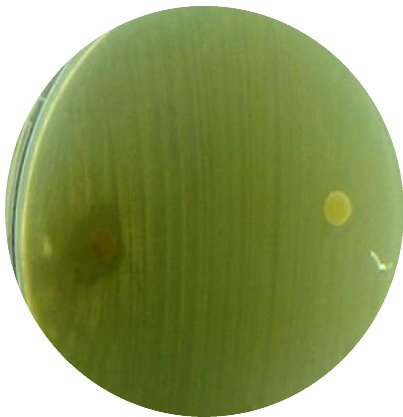
Annexe 4 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de SA par la méthode d'aromatogramme



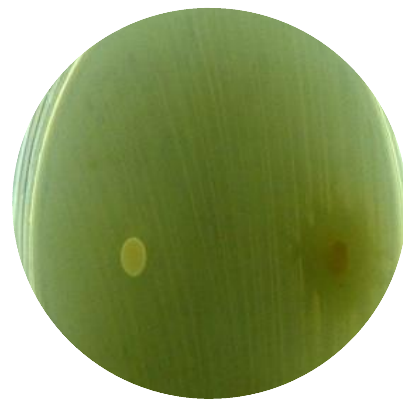
Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



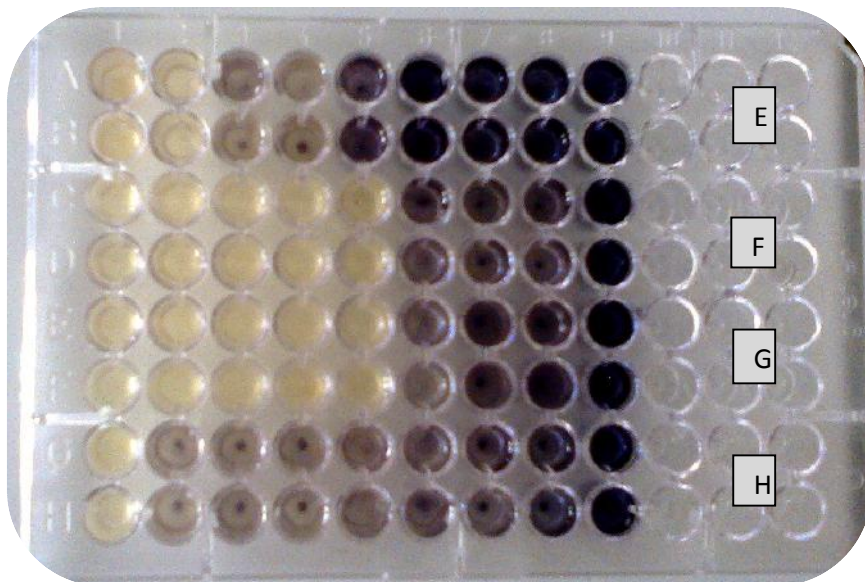
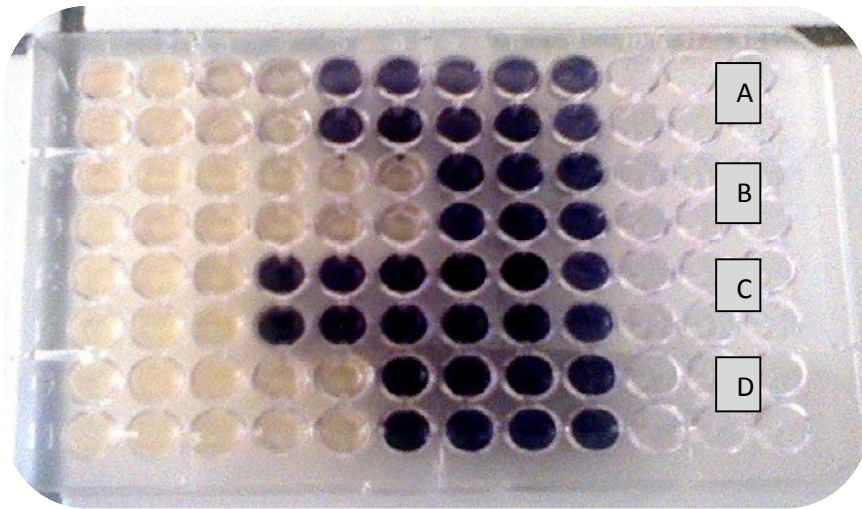
Serratia odorifera



Enterobacter cloacae

Annexes

Annexe 5 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne des HE de SJ et de SA respectivement par la méthode de microdilution



Annexes

A : *Klebsiella pneumonia* ATCC13883 ;

B : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

C : *Escherichia coli* ATCC25922

D : *Enterobacter feacalis* ATCC29212

E : *Serratia odorifera*

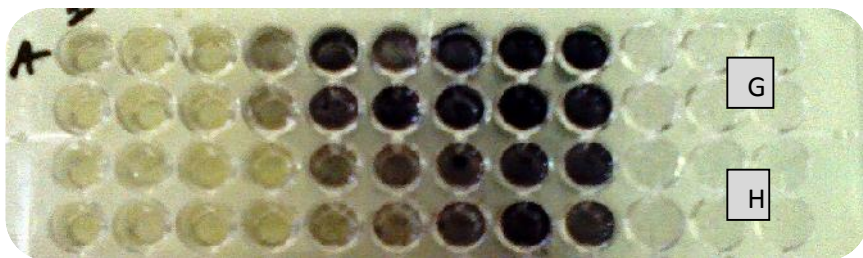
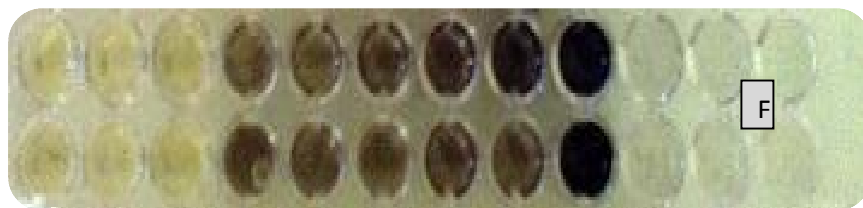
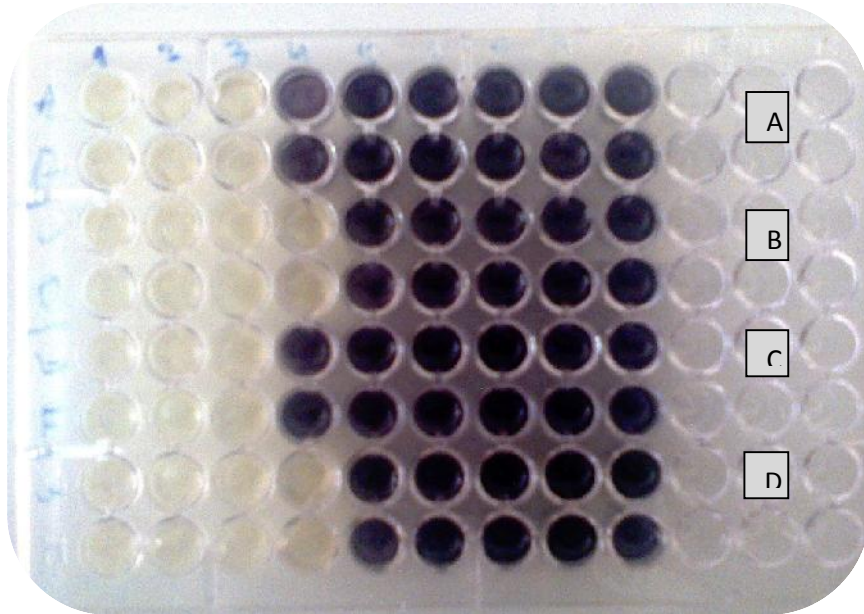
F : *Staphylococcus aureus*

G : *Enterobacter cloacae*

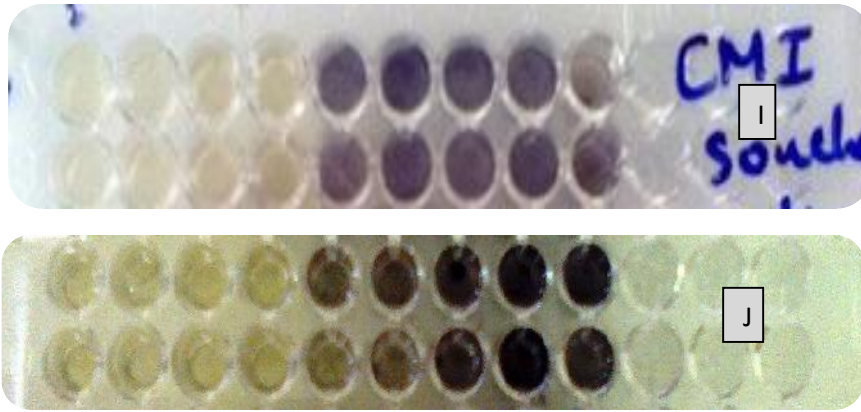
H : *Escherichia coli*

I: *Klebsiella pneumonia*

J : *Serratia marcescens*



Annexes



A : Staphylococcus aureus ;

B : Escherichia coli

C : Enterobacter cloacae

D : Serratia odorifera

E : Serratia marcescens

F : Klebsiella pneumonia

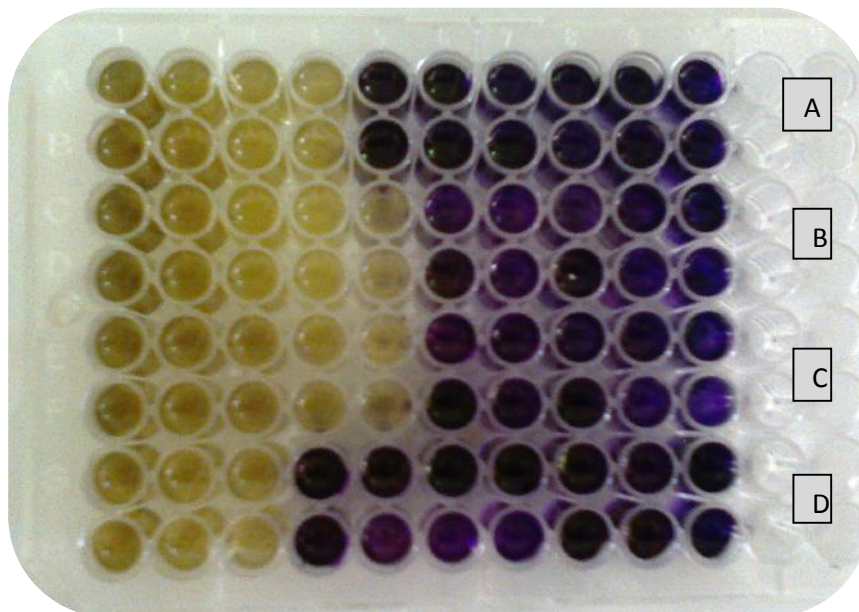
G : Staphylococcus aureus ATCC 25923

H: Klebsiella pneumonia ATCC13883

I: Enterobacter feacalis ATCC29212

J: Escherichia coli ATCC 25922

Annexe 6 : Photo représentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait MeOH de SA par la méthode de microdilution



A : Serratia odorifera

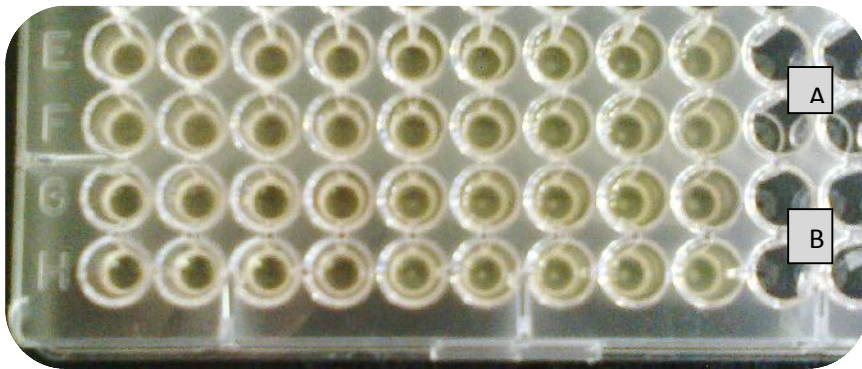
B : Enterobacter cloacae

C : Escherichia coli

D : Staphylococcus aureus

Annexes

Annexe 7 : Photos représentant les résultats de l'activité anti-candida des HE de SJ et SA respectivement par la méthode de disque et de microdilution

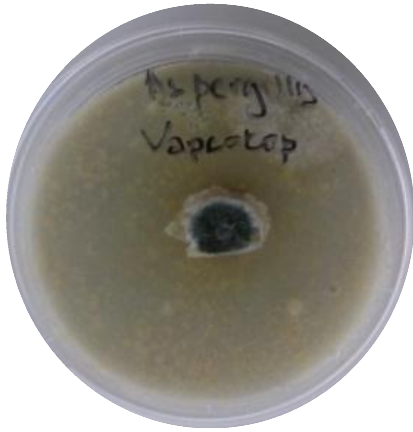


A : l'HE de SJ

B : l'HE de SA

Annexes

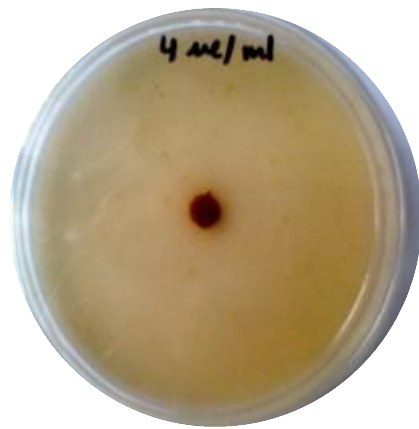
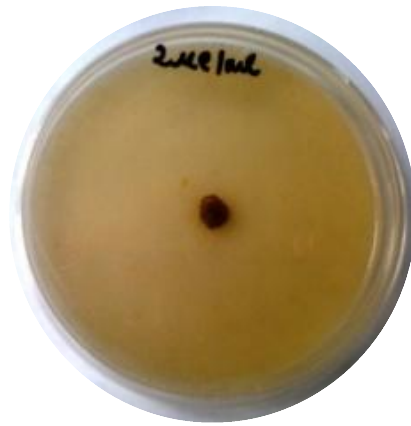
Annexe 8 : Photos représentant les résultats de l'activité antifongique des fongicides et des HE



Fongicides : Pro : Propinebe

Vap : Vapcotop

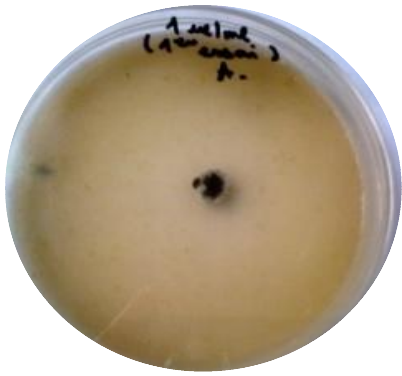
Annexes



F : *Fusarium.sp*

HE : SJ

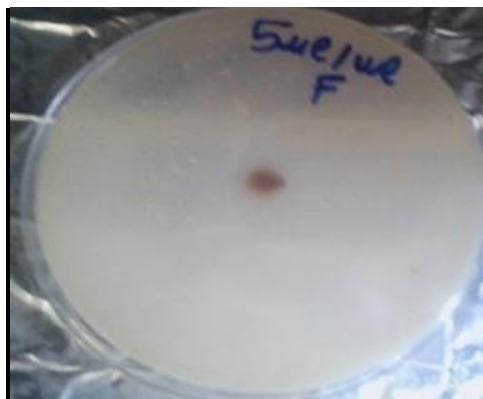
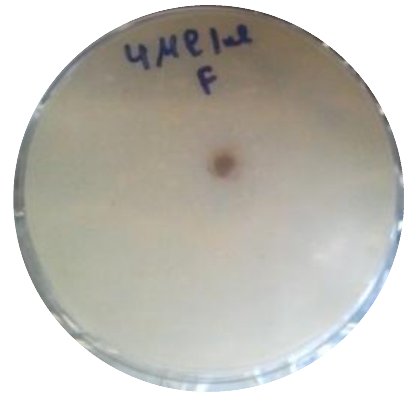
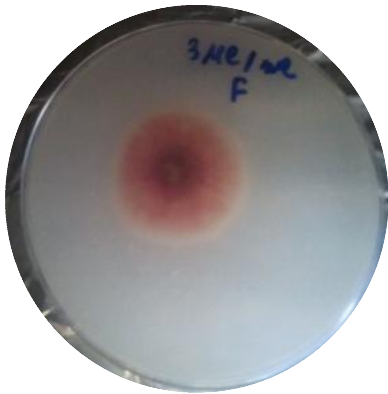
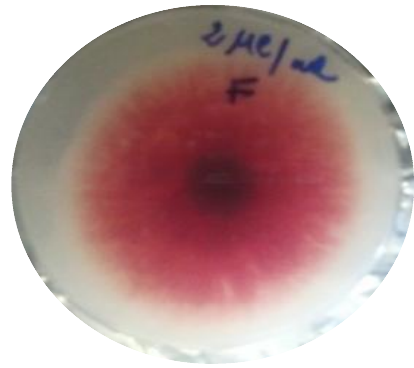
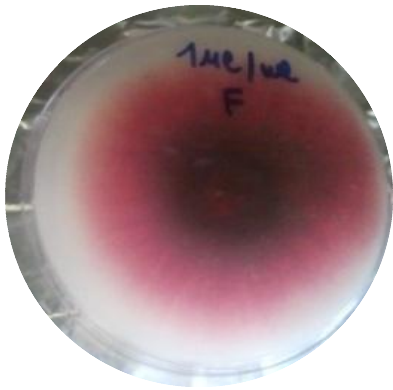
Annexes



A : *Aspergillus. sp*

HE: SJ

Annexes



F : *Fusarium.sp*

HE : SA

Annexes



A : *Aspergillus. sp*

HE : SA

Résumé

Les plantes productrices d'huiles essentielles et d'extraits ont toujours été utilisées dans le domaine culinaire, la médecine traditionnelle, et la préservation des aliments. La recherche de nouvelles molécules comme substituant aux agents antioxydants ou antimicrobiens de synthèse est l'objectif de ce projet.

La présente étude vise à investiguer la composition chimique, et l'évaluation de l'activité antioxydante, activité antibactérienne et antifongiques des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *Satureja calamintha nepeta* collectée de deux régions du Nord Est Algérien : Annaba (S_A) et Jijel (S_J).

L'analyse effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) des HE obtenues par hydrodistillation a permis d'identifier 24 composants (représentant 98,83% de l'HE totale) pour (S_A) et 35 composants (représentant 99,40% de l'HE totale) pour (S_J). La GC-MS a révélé que les constituants majeurs de (S_A) et (S_J) sont : Piperitone oxide (54.71 et 22.26%), cyclohexanone, 2-(1-méthylethylidene) (20.32 et 9.37%), et Menthone (5.97 et 26.46%), respectivement, et la pulegone avec 14.04% pour la (S_J).

Les extraits méthanoliques des deux plantes sont obtenus par extraction au Soxhlet. Le contenu phénolique total est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu, il est de $482.666 \pm 2.516 \mu\text{g}$ équivalent d'acide gallique (EAG) /mg d'extrait pour (S_A) et $264.666 \pm 0.577 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait pour (S_J).

L'activité antioxydante des HE et des extraits méthanoliques est évaluée par le test antiradicalaire utilisant le DPPH. Les résultats obtenus montrent que les extraits sont plus efficaces à piéger le radical libre que les huiles essentielles.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE et des extraits *in vitro* vis-à-vis des microorganismes est effectuée par deux méthodes : la diffusion sur disque et la microdilution. Les résultats montrent que les HE exercent un effet très puissant à inhiber l'ensemble des souches testées alors que les extraits n'ont presque pas d'effet.

L'activité antifongique des HE et des extraits méthanoliques sur la levure est évaluée aussi par l'aromatogramme et la microdilution. Pour champignons phytopathogènes seule l'activité des HE est étudiée, elle est évaluée par la méthode de contact. Les résultats sont très prometteurs en particulier pour SJ.

Ces résultats montrent que les HE *Satureja calamintha nepeta* possèdent des propriétés antimicrobiennes alors que les extraits méthanoliques possèdent une activité antioxydante modérée.

Mots clés : Plantes aromatiques, *Satureja calamintha nepeta*, huile essentielle, GC/MS, extrait méthanolique, activité antibactérienne, activité antioxydante, activité antifongique.

الملخص

استخدمت النباتات المنتجة للزيوت العطرية لعدة سنوات في مجال الطهي، الطب التقليدي، وحفظ الأغذية. البحث عن جزيئات جديدة باعتبارها المستبدلة من المواد المضادة للاكسدة والعوامل المضادة للجراثيم هو الهدف من هذا المشروع.

وتهدف هذه الدراسة للتعرف على التركيبة الكيميائية، تقييم النشاط مضادات الأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا ومضاد للفطريات للزيوت العطرية ومستخلصات الميثانول من *Satureja calamintha nepeta* التي تم جمعها في منطقتين في شمال شرق الجزائر: عنابة (SA) وجيجل (SJ).

مكن التحليل الكيميائي بواسطة (GC / MS) للزيوت العطرية التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير البخار بعزل 24مكون بالنسبة الى (SA) و 35 عنصر بالنسبة إلى (SJ). كشفت GC-MS إلى أن المكونات الرئيسية للـ (SA) و (SJ) هي: Piperitone oxide (54.71 و 22.26٪)، cyclohexanone, 2-(1-methylethylidene) (9.37 و 20.32%) و Menthone (5.97 و 26.46٪) و Pulegoone (14.04٪ بالنسبة الى (SJ).

تم الحصول على المستخلصات الميثانولية من النباتات عن طريق Soxhlet . وقدر مجموع المحتوى الفينولي عن طريق فولين-Ciocalteau، من تحصيل $482666 \pm 2.516 \mu\text{g}$ يعادل حمض الغاليك (EAG) / ملغ من مستخلص لـ (SA) واستخراج $264666 \pm 0.577 \mu\text{g}$ EAG / ملغ لـ (SJ). النشاط المضادة للأكسدة للزيوت العطرية والمستخلصات الميثانول تم باستخدام اختبار DPPH ، فقد بينت النتائج أن المستخلصات الميثانولية أكثر فعالية مقارنة مع الزيوت الأساسية إلى اعتراض الجذور الحرة.

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا ضد الكائنات الحية الدقيقة تم بطريقتين: طريقة القرص و microdilution. وأظهرت النتائج أن للزيوت العطرية تأثير قوي جدا لمنع جميع السلالات المختبرة من التكاثر في حين ان المستخلصات الميثانولية لم يكن لديها تقريبا أي تأثير.

تقييم نشاط مضاد الفطريات الممرضة للنباتات تم فقط بالنسبة للزيوت العطرية من خلال أسلوب الاتصال، وكانت النتائج مهمة جدا خاصة بالنسبة الى SJ. كما تم تقييم النشاط المضاد للخميرة من نوع *candida albicans* وذلك عن طريق الزيوت الأساسية و المستخلصات الميثانولية لكنتا النباتين. من خلال هذه النتائج يمكننا أن نستنتج أن للزيوت العطرية أفضل خاصية لمنع نمو الجراثيم الفطرية والبكتيرية، كما ان للمستخلصات الميثانولية نشاط مضاد للأكسدة متوسط.

كلمات البحث: النباتات العطرية *Satureja calamintha nepeta* ، الزيوت الأساسية ، CPG / SM ، المستخلصات الميثانولية ، مضاد للجراثيم، المضادة للأكسدة، والنشاط مضاد للفطريات.

Abstract

Plant products essential oils and extracts have been used for many times in traditional medicine, natural therapy and food preservation. The search of new natural products as natural antioxidant and antibacterial agents was the object of this study.

The present study was conducted to examine the chemical composition, *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of both the essential oil and methanol extract of *Satureja calamintha nepeta* collected from tow localities in the northeast of Algeria: Annaba (S_A) and Jijel (S_J).

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oils obtained by steam distillation identified about 20 (98, 83% of the total oil) and 34 (99.40 % of the total oil) constituents from S_A and S_J respectively. GC–MS analysis revealed that the major constituents of the S_A and S_J were Piperitone oxide (54.71 and 22.26%), cyclohexanone, 2-(1-methylethylidene) (20.32 and 9.37%), and Menthone (5.97 and 26.46%), respectively, and pulegone 14.04 for S_J.

Methanol extracts were extracted in a Soxhlet apparatus. Total phenolic content was found to be 482.666±2.516µg/mg of dry extract for S_A and 264.666±0.577µg/mg of dry extract for S_J.

Antioxidant activity of the EO and MeOH extract was evaluated by DPPH test. Results indicate that the effect of the essential oils was very low and less effective than methanol extracts.

The evaluation of the antibacterial activity was assessed by disc diffusion and microdilution methods. No, or slight, activity was observed when the extracts were tested against bacterial strains, whereas essential oils exhibited strong antibacterial activity.

Antifungal activity of the essential oils against phytopathogens fungi was evaluated by poisoned food technique, the results were very important especially for S_J.

The results indicate that the oils have the capacity to inhibit the growth of pathogenic microorganisms; on the other hand methanol extracts showed antioxidant activity.

Keywords: aromatics plants, *Satureja calamintha nepeta*, Essential oil, GC–MS, methanol extract, antibacterial activity, Antioxidant activity, Antifungal activity.

Original Article

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *SATUREJA CALAMINTHA NEPETA* AGAINST PHYTOPATHOGENS FUNGI

RYMA LABIOD*, SAOUDI AOUADI, NABILA BOUHADDOUDA

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria
Email: labiod_ryma@hotmail.fr

Received: 27 Mar 2015 Revised and Accepted: 21 May 2015

ABSTRACT

Objective: The increasing incidence of resistance among pathogen towards synthetic fungicides is a cause of serious problem. For this, the fight against fungi is directed to the use of natural products. The main objectives of this study were to investigate the chemical composition and antifungal activity of the essential oil against two post harvest pathogenic fungi: *Fusarium. sp* and *Aspergillus. sp* and then compare it with the effect of two fungicides (Vapcotop and Propineb) on the same stem.

Methods: Essential oil samples of *Satureja calamintha nepeta* were analyzed using a Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS) technique. The *in vitro* antifungal activity of the essential oils was done by the poisoned food technique.

Results: The GC-MS analysis of the essential oil identified 35 components accounting for 99.40% of the total oil composition. The most abundant components were Menthone (26.46%), piperitone oxide (22.26%), and pulegone (14.04%). Essential oil was found effective against all the tested fungi, and was more potent than the two fungicides with minimum inhibitory concentration (MIC) value of 2 µl/ml.

Conclusion: The essential oil exhibited a significant reduction in mycelial growth with the two fungi species, and has a higher biological activity than those of the two fungicides. This study suggests that essential oil represents a good alternative to eliminate fungi that can be pathogens for plants.

Keywords: *Satureja calamintha nepeta*, Essential oils, Antifungal activity, *Aspergillus. sp*, *Fusarium. Sp*

INTRODUCTION

Plant pathogens that include fungi, nematodes, bacteria and viruses can cause diseases or damages in plants. They cause yield losses in numerous economically important crops [1].

Fungal species of *Aspergillus* and *Fusarium* genera are the most species producer's mycotoxins in food and in addition to diseases such as mildew, seeds corruption, stem rot, wilt and dwarf plants involved [2]. The application of synthetic fungicides has led to a number of environmental and health problems because they are themselves carcinogenic, teratogenic, and highly and acutely toxic with long degradation periods [3-4].

New awareness to reduce the usage of the chemical pesticides by developing alternative strategies or technologies in order to improve plant disease resistance and control of pathogens are being promoted. Therefore, there has been a growing interest in research concerning the alternative pesticides and antimicrobial active compounds, including the plant extracts and essential oils of aromatic plants [5-7].

Various plant materials are believed to have antifungal activity and many essential oils have been reported to have antifungal activities with no side effects on humans and animals [8]. Previous *in vitro* and *in vivo* investigations suggested that the essential oils could be used as effective antifungal agents [9].

The genus *Satureja*, which belongs to the Lamiaceae, is represented by about 200 species of herbs and shrubs, often aromatic, widely distributed in the Mediterranean area, Asia and boreal America [10].

These are annual or perennial semi-bushy aromatic plants that inhabit arid, sunny, stony and rocky regions. Many members of this genus are well known for their aromatic and medicinal character. They are used as culinary herbs and in folk medicine to treat various ailments, based on the different plant activities [11-12].

Several studies have been made on the genus *Satureja*. However, few works in Algeria have been devoted to the specie *Satureja calamintha nepeta* and limited to the study of the antimicrobial activity of plant

extracts. This oil is highly volatile, and it can be used by spraying in warehouses of agricultural products. The present study was undertaken to investigate the phytochemical composition and the antifungal activity of the oil of the Algerian *Satureja calamintha nepeta* against *Fusarium. sp* and *Aspergillus. sp*, and then compare it with the effect of two fungicides using as standard (Vapcotop and Propineb) on the same stem.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts of *Satureja calamintha nepeta* at the flowering stage (September 2012), were collected from Jijel in North-eastern of Algeria. The samples of the plant were identified and performed in a shady place at room temperature for 10 days

Isolation of the essential oil

Dried aerial parts (100 g) of the plant was cut and subjected to the hydro-distillation for 2 h, using Clevenger type apparatus (1.48% v/w). The resulting essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored at 4 °C until tested.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis

Analyses were realized in the university Ouled Aissa (Jijel), Algeria. The GC-MS used was a Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The column was a 30 m × 0.25 mm DB-5 MS capillary with 0.25µm film thickness. The carrier gas was helium at a flow rate of 2.0 ml min⁻¹. Samples were injected by placing the SPMe fiber in the GC inlet for 2 min. The starting temperature was 40 °C for 10 min, then raised to 200 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ and held at 220 °C for 5 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode with ion source temperature of 250 °C, using an ionization voltage of 70 eV. The mass range was 40-450 amu. The components were identified by computerized bank ESO 2000 database: library Nist 05 and literature data [13].

Fungal strains

Two filamentous fungal strains *Aspergillus. sp* and *Fusarium. sp* causes damping off in wheat were obtained from the Laboratory of

Microbiology (BADJI Mokhtar University), Algeria. The fungal strain cultures were maintained on a Potato Dextrose Agar (PDA) slant at 4 °C.

Antifungal activity assay

Antifungal activity of the essential oil was tested against the two fungal strains reported above following the poisoned food technique [14].

Aliquots of the essential oil dissolved separately in 0.5 ml of 5% (v/v) Tween-20 were pipetted aseptically onto glass Petri dishes (9 cm×1.5 cm) containing 9.5 ml PDA medium at a temperature of 45–50 °C to produce concentrations of 1, 2, 3, 4, and 5 µl/ml. Control plates (without essential oil) were inoculated following the same procedure. A fungal disc (9 mm in diameter) of mycelium, cut from the periphery of a five-day-old culture using a cork borer, was inoculated aseptically into the center of each Petri dish. The plates were sealed with polyethylene film and incubated at a temperature of 28±2 °C. The efficacy of the treatment was evaluated daily for nine days by measuring the average of two perpendicular diameters of each colony. All tests were performed in triplicate. The percentage inhibition of the radial growth of the two tested fungi by the oils, compared with the control, was calculated at day 9, using the following formula [15]:

$$\text{Percentage mycelial inhibition} = [(dc-dt)/dc] \times 100$$

Where *dc* is the mean colony diameter for the control sets and *dt* is the mean colony diameter for the treatment sets. The lowest concentration that completely inhibited the growth of the fungus was considered the minimum inhibitory concentration (MIC).

In parallel we have tested activity of two fungicides: Propineb and Vapcotop on the same stem. Whose purpose is to compare their

effect with that of the essential oil. Propineb was used at the concentration of (1.59 mg/Petri dishes), and Vapcotop at (2 mg/ml/Petri dishes).

Results and discussion

Chemical composition of essential oil

The aerial parts of *Satureja calamintha nepeta* (*C. nepeta*) yielded 1, 48% v/w essential oil by steam distillation. A total of thirty five different components of the essential oil, accounting for 99.40% of the total oil composition, were identified by GC-MS analyses. The identified chemical composition, retention time, retention indice and percentage composition are given in table 1. The most abundant components of the essential oil were Menthone (26.46%), piperitone oxide (22.26%), and pulegone (14.04%). The chemical composition of our essential oil appears different compared to those reported in the literature; this is may be due to many factors: the climate, geographical area, seasons, soil conditions, crop period and extraction technique [16-17].

Previous studies on the essential oil of many samples of *C. nepeta* grown from seeds in the Botanical Garden of the State University of Gent (Belgium), have shown that it contains Pulegone (11.5 to 33.2%), Piperitenone oxide (5.9 to 37.8%) and Menthone (4.9 to 8.9%) as major components [18]. That from Molina di Quosa (Italy) on rocky, dry and calcareous soil showed that pulegone (46%), piperitenone oxide (2.53%), piperitone oxide (2.29%), and piperitenone (2.00%) were the dominant components [19]. The study realized in Morocco found that: *p*-cymene (20.9%), *γ*-terpinene (18.7%), and thymol (34.94%) were the most abundant constituents [20].

Table 1: Chemical composition of the essential oil of *calamintha nepeta*

S. No.	Compounds ^a	RT ^b	IR ^c	% composition
1	α-Thujene	4.46	924	0.09
2	1R-α-Pinene	4.60	932	0.7
3	L-β-Pinene	5.54	980	1.33
4	3-Octanol	5.61	988	0.96
5	α-Terpinene	6.16	1014	0.27
6	(+)-4-Carene	6.87	1015	0.31
7	D-Limonene	7.19	1024	1.94
8	B-Phellandrene	7.27	1025	0.26
9	β-cis-Ocimene	7.66	1035	0.76
10	γ-Terpinene	8.29	1054	0.23
11	Cis-Sabinene hydrate	9.38	1065	0.14
12	Cyclohexanone,2-(1 methylethylidene)-	11.42	1099	9.37
13	3-Octanol-acetate	11.84	1120	0.35
14	Menthone	12.04	1148	26.46
15	Cis-Carveol	12.95	1226	0.16
16	Pulegone	14.82	1233	14.04
17	Piperitone oxide	16.42	1253	22.26
18	Thymol	17.42	1289	0.26
19	Diosphenol	17.57	1309	0.43
20	Piperitenone	17.89	1340	0.2
21	Jasmatone	18.74	1378	0.25
22	β-Cubebene	19.84	1387	5.51
23	β-Element	19.98	1389	0.27
24	Caryophyllene	21.10	1419	4.33
25	Z-β-Farnesene	22.22	1440	0.48
26	α-Caryophellene	22.51	1455	0.73
27	Elixene	22.69	1456	1.93
28	Allo-aromadendrene	22.79	1458	0.6
29	γ-Muuroolene	22.90	1478	0.16
30	α-Muuroolene	23.19	1500	0.93
31	γ-cadinene	24.47	1513	0.77
32	(-)-α-Panasinsen	24.63	1530	0.23
33	α-Cadinene	25.36	1537	1.84
34	3-Oxo-α-ionone	25.98	1675	0.25
35	Phytol	39.92	1942	0.56
TOTAL				99.40

^a: Compounds listed in order of their elution., ^b: Retention time (as min), ^c: Retention indices.

Antifungal activity assay

Phytopathogenic fungi are controlled by synthetic fungicides; however, the use of these is increasingly restricted due to the harmful effects of pesticides on human health and the environment [21].

Propineb and Vapcotop are an active substance of plant protection products (phytopharmaceutical products or pesticide) which have a fungicidal effect.

Propineb is a dithiocarbamate fungicide of German origin (Bayer), (1962), the molecule is quite persistent, insignificant toxicity (LD50 for rats by ingestion of 8500 mg • kg⁻¹), the propineb is used alone or in combination, to the fight against late blight of potato, tobacco, scab, botrytis garlic and onion. The first brand name is marketed Antracol [22].

Vapcotop fungicide is belonging to the Thiophanate-methyl (TM) group. TM is used on a variety of trees, vine, and root crops, as well as on canola and wheat. It may be applied as a dip treatment for cut flowers, rose bud wood, or nursery stock; and as a seed treatment for peanuts and potato pieces. TM was first registered as a pesticide in the United States in 1973 for use as a fungicide. EPA issued a Registration Standard for TM in March, 1996.

TM generally has been shown to have low acute oral/dermal/inhalation toxicity (toxicity categories III/IV). TM is not an irritant to the skin and only a slight ocular irritant (toxicity category IV) and is a skin sensitizer. TM is classified as “likely to be carcinogenic to humans based on dose-dependent increases in liver tumors in male and female mice [23].

The activity of propineb and Vapcotop on our steam is giving in table 2. These two fungicides were used in our work that aims to compare their effects to that of the essential oil.

As already mentioned above Vapcotop and propineb were used at concentrations (2 mg/ml/Petri dish) and (1.59 mg/Petri dish), respectively. (Concentrations were selected based on the concentrations mentioned on bags of both products).

The results show that propineb had a less effective on *Fusarium. sp* than Vapcotop. However, it gave a percentage mycelial inhibition greater than 50% on *Aspergillus*. Unlike Vapcotop gave a percentage inhibition greater than 50% over the two fungal strains.

Recently, the scientific interest in biological properties of essential oil (EO) has been increased. New researches about biological active secondary compounds present in EO of plants have been seen as a potential way to control fungal contamination. Our study had assessed potential antifungal activity of essential oil *C. nepeta*.

Table 2: Percentage of mycelial inhibition of the two fungicides

fungicides	Percentage mycelial inhibition % ^a	
	<i>Fusarium. sp</i>	<i>Aspergillus. sp</i>
Propineb	11.11±0.00	56.11±3.85
Vapcotop	55.55±0.00	67.22±7.69

^a: Values expressed are means±SD of three parallel measurements.

The growth of the two fungal species over the nine days is shown in (fig.1), and Percentage of mycelial inhibition of essential oil is shown in table 3. The results showed that growth increased with incubation time but mycelial growth was considerably reduced with increasing concentration of essential oil. Growth was delayed by five days for *Fusarium sp*, and six days for *Aspergillus sp* at 1 µl/ml concentration. A MIC of 2 µl/ml was obtained after nine days of incubation.

The percentage inhibition of mycelia growth was determined at day 9. The oil produced a significant reduction in mycelial growth with the two fungi species at 1 µl/ml concentration with percentage reduction of 66,29±1,69 for *Fusarium. sp* and 62,72±0,64 for *Aspergillus. sp*. The growth of fungi was completely inhibited at concentration of 2, 3, 4 and 5 µl/ml which indicates the excellent antifungal property of the oil.

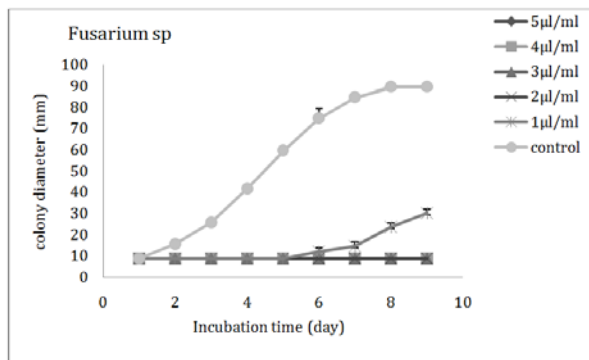


Fig. 1: Effects of the different concentrations of EO on colony diameter (mm) growth of *Fusarium sp*. Values are means (n=3)±standard deviations. Sample size: 9 mm

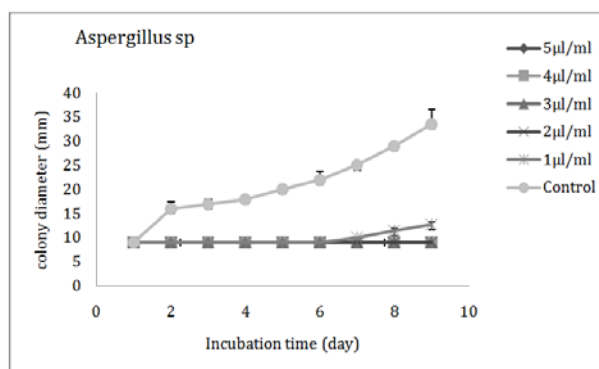


Fig. 1: Effects of the different concentrations of EO on colony diameter (mm) growth of *Aspergillus sp*. Values are means (n=3)±standard deviations. Sample size: 9 mm

Table 3: Percentage of mycelial inhibition of essential oil of *Satureja calamintha nepeta*

Concentrations(µl/ml)	Percentage mycelial inhibition % ^a	
	<i>Fusarium. sp</i>	<i>Aspergillus. sp</i>
1	66,29±1,69	62,18±1,72
2	100±0,00	100±0,00
3	100±0,00	100±0,00
4	100±0,00	100±0,00
5	100±0,00	100±0,00

^a: Values expressed are means±SD of three parallel measurements

It would seem possible that the antifungal mode of action of essential oils might be attributed to the presence of menthone, pulegone and pipertone oxide. These three compounds have been shown to possess strong antimicrobial properties: Carvone, Menthol and Menthone are structurally related fungicidal bioactive compounds having low MIC values and negligible cytotoxicity.

Mint essential oil and its three lead compounds (Carvone, Menthol and Menthone) not only reduce the transition of *Candida albicans* from yeast to the invasive and more pathogenic hyphal form at sub-inhibitory concentrations but has also a significant effect on the production of the hydrolytic enzymes (Proteinase and phospholipase) secreted by the fungal cell during an interaction with a substance to be assessed antifungal activity [24]. The pulegone has pronounced activity against fungi and bacteria [25].

When we compare between the effects of *C. nepeta* essential oil with that of the two fungicides, we find that the essential oil was more effective against *Fusarium* than both fungicides, it was more

powerful than propineb against *Aspergillus*, and its effect was very similar to that of Vapcotop on the same stock.

CONCLUSION

The results of *in vitro* study are a clear demonstration of the excellent antifungal property of *C. nepeta* essential oil against *Fusarium sp* and *Aspergillus sp*, and have a higher biological activity than those of the two fungicides. The antifungal activity of the oil can be attributed by its high content of menthone, piperitone oxide or pulegone.

This study indicated that *C. nepeta* essential oil can be exploited as an ideal treatment for future plant disease management programs eliminating fungal spread.

These results are also of interest for the use of this oil in the food industry in order to increase the life of many food products, in the control of the food borne pathogens, as well as in the prevention of lipid oxidation. However, the presence of pulegone should be considered, according to the regulations described in the application guide of EFFA [26] this molecule is counted among the undesirable substances as such. For this purpose it is necessary to improve the quality of our essential oil by the method of fractional distillation *in vacuo*. It is also interesting to identify the products of hydrolyse resulting to the interaction Essential oil/fungi, because some of the microorganisms are able to neutralize the inhibitory effect of essential oil. This can be exploited in the field of fine chemistry for the bioconversion of molecules [27-28].

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Pr. Ladjama Ali, the director of Applied Microbiology and Biochemistry laboratory (Department of Biochemistry, Annaba, Algeria). Our sincere thanks also go to Dr. Sebti Mohammed laboratory of Phytochemistry and Pharmacology (Department of Animal Biology and vegetable, Jijel, Algeria) for providing necessary facilities in the analysis.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interest in publication of this article.

REFERENCES

- Fletcher J, Bender C, Budowle B, Cobb WT, Gold SE, Ishimaru CA, *et al.* Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiol Mole Biol* 2006;70:450-71.
- Fandohan P, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination on with fumonisin in Africa. *Afr J Biotech* 2003;2(12):570-9.
- Lingk W. Health risk evaluation of pesticide contamination in drinking water. *Gesunde Pflanz* 1991;43:21-5.
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* 2011;145:464-70.
- Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones JB. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Dis* 2003;87:423-7.
- Kotan R, Cakir A, Dadasoglu F, Aydin T, Cakmakci R, Ozer H, *et al.* Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric* 2010;90:145-60.
- Kotan R, Dadasoğlu F, Karagoz K, Cakir A, Ozer H, Kordalia S, *et al.* Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Sci Hortic* 2013;153:34-41.
- Sokmen A, Jones BM, Erturk M. The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1999;67:79-86.
- Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 1998;46:1739-45.
- Skocibusic M, Bezic N, Dunkic V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. *Food Chem* 2006;96:20-8.
- Azaz D, Demirci F, Satil F, Kurkcuoglu F, Baser KHC. Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils. *Z Naturforsch* 2002;57:817-21.
- Azaz AD, Kurkcuoglu M, Satil F, Baser KHC, Tumen G. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. *Flavour Fragrance J* 2005;20:587-91.
- Adams RP. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol stream, IL; 2001.
- Singh P, Srivastava B, Kumar A, Kumar R, Dubey NK, Gupta R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J Sci Food Agric* 2008;88:2421-5.
- Albuquerque CC, Camara TR, Marian RDR, Willadino L, Marcelino C, Ulisses C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Braz Arch Biol Technol* 2006;49:527-35.
- Bertini LM, Pereira AF, Oliveira CLL, Menezes EA, Morais SM, Cunha FA, *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma* 2005;17:80-3.
- Gende LB, Mendiara S, Fernández NJ, Van Baren C, Di Leo Lira A, Bandoni A, *et al.* Essentials oils of some *Mentha* spp. and their relation with antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees, by using the bioautography technique. *B Insectol* 2014;67:13-20.
- De Pooter HL, Goetghebeur P, Scamp N. Variability in the composition of the essential oil of *Calamintha nepta*. *Phytochemistry* 1987;26:3355-6.
- Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *J Ethnopharmacol* 1993;39:167-70.
- Satrani B, Farah A, Fechtal M, Talbi M, Blaghen M, Chaoouch A. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann Falsif Expert Chim* 2001;94:241-50.
- Harris CA, Renfrew MJ, Woolridge MW. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Addit Contam* 2001;18:1124-9. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Propinèbe>
- Anonymous. US EPA Archives Document, R. E. D. FACTS, Thiophanate-Methyl. United States; 2004.
- Samber N, Varma A, Manzoor N. Evaluation of *Mentha piperita* essential oil and its major constituents for antifungal activity in *Candida* spp. *Int J Innov Res Sci Eng Tech* 2014;3(2):9404-11.
- Javidnia K, Tabatabaiee M, Shafiee A. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ziziphora tenuir*, population Iran. *DARU* 1996;6:56-9.
- Guide d'application de l'EFFA sue le règlement européen relatif aux aromes ; 2009.
- Shimoni E, Ravid U, Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J Biotechnol* 1999;78:1-9.
- Furukawa H, Zenno S, Jwasawa Y, Morita H, Yoshida T, Naagasawa T. Ferulic Acid Production from clove oil by *Pseudomonas fluorescens* E118. *J Biosci Bioeng* 2003;96:404-5.

Research Article

Chemical Composition of the Essential Oil Extracted from the Aerial parts of Sage (*Salvia officinalis* Collected from North East of Algeria.

Labioud Ryma*, Aouadi Saoudi, Bouhaddouda Nabila

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.

*Corresponding Author:

Labioud Ryma

Email: labioud_ryma@hotmail.fr

Abstract: The purpose of this study was to investigate the chemical composition of the essential oil from *salvia officinalis* collected from north east of Algeria. The oil was isolated by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and analyzed by GC/MS. The yield of the essential oil was 1.48% (v/w) and thirty seven constituents were identified according to their chromatographic retention times and mass spectra, corresponding to 100% of the compounds present. The major constituents of the oil were caryophyllene (25.87%), 1-alpha- Terpineol (16.85%), (+)-Ledene (10.05%) and Allo-aromadendrene (6.99%). The essential oil studied was not similar to those found in the literature; however, the main compounds of this oil present several interesting biological activities.

Keywords: medicinal plants, *salvia officinalis*, essential oil, hydrodistillation, chemical composition, GC/MS

INTRODUCTION

The exploration of traditional knowledge for cure to common diseases is attractive since antiquity. The medicinal plants are responsible for the most of the medicine and food used in modern society. It is estimated that an amount of 20,000 species from several families are useful for these purposes [1, 2].

Aromatic plants have been used for centuries as spices and condiments to confer aroma and flavor to food and beverages. Additionally, due to their constituents, medicinal and aromatic plants can act as stabilizer agents, playing an important role in the shelf-life of foods and beverages [3], but only in the last decade scientific research have focused its interest on their essential oils (EOs) and extracts as natural sources of antimicrobial and antioxidant compounds [4].

Essential oils occur in edible, medicinal and herbal plants, which minimize questions regarding their safe use in food products. Essential oils and their constituents have been widely used as flavouring agents in foods since the earliest recorded history and it is well established that many have wide spectra of antimicrobial action [5, 6]. The composition, structure as well as functional groups of the oils play an important role in determining their antimicrobial activity [7].

The genus *Salvia* with its nearly 1000 species [8] represents a huge and important taxonomic unit of the tribe Menthae, Lamiaceae Subfam. Nepetoideae [9].

Salvia officinalis L., popularly known as salvia or sage, is an aromatic plant widely distributed in the world. Common sage, since ancient times, has been an ingredient in perfumes, a flavoring in a variety of food preparations, and a medicinal plant used in the healthy Mediterranean diet [10, 11].

The essential oil of sage is added to meat, sausage, poultry stuffings, fish, soups, canned foods and other food products. Sage essential oil protected liver patés from oxidation processes and could be used as alternative option to synthetic antioxidants such BHT and was used in dry fermented buffalo sausage too [12].

Sage essential oil is also exhibit anti-inflammatory, antispasmodic, antimicrobial and stimulant properties [13].

Many studies have focused on the chemical composition of *S. officinalis* and large variations have been reported from different countries [14].

The variability in the composition of the essential oil depends on genetic (species, chemical plant variety) and environmental factors (climate, insolation, altitude) [15].

The purpose of this paper was to examine the composition of the essential oil of *Salvia officinalis* collected from north east of Algeria by GC/SM.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of wild growing plant materials of *salvia officinalis* were available in the local markets from Algeria (exactly from Annaba). The collected samples were washed clearly by water to remove dust materials. Then they were dried.

Isolation of the essential oil

Air-drying of the plant was performed in a shady place at room temperature for 10 days. Dried aerial parts (100 g) of plants were cut and subjected to the hydro-distillation for 2 h, using Clevenger type apparatus. The resulting essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate and stored at 4°C until analyzed.

Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) analysis

Analyses were realized in the university Ouled Aissa (Jijel). The GC-MS used was a Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The column was a 30 m × 0.25 mm DB-5 MS capillary with 0.25µm film thickness. The carrier gas was helium at a

flow rate of 2.0 ml min⁻¹. Samples were injected by placing the SPMe fiber in the GC inlet for 2 min. The starting temperature was 40°C for 10 min, then raised to 200°C at a rate of 5°C min⁻¹ and held at 220°C for 5 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode with ion source temperature of 250°C, using an ionization voltage of 70 eV. The mass range was 40-450 amu.

The components were identified by computerized bank ESO 2000 database, library NIST 05.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrodistillation of sage purchased from local markets yielded 1.48% (v/w). This is in accordance with others values found in literature, which reported yields of 1.1 to 2.8% (v/w) [16-12].

Table.1 shows the qualitative and average quantitative composition of the main constituents in the oil sample of sage. Chemical analysis of the EO revealed the presence of 35 components making up to 100 % of the total material.

Table-1: Chemical composition (%) of the essential oils isolated from aerial parts of *S. officinalis* L.

N°	Compounds	RT	Composition (%)
1	1-alpha- Terpineol	3.843	16.85
2	γ-Terpinene	4.016	1.36
3	L-4-Terpinolene	5.364	1.11
4	Terpinolene	5.826	0.59
5	β-Thujone	6.105	1.83
6	Linalool	6.588	0.36
7	Myrtenol	6.965	0.51
8	D-camphor	7.937	8.54
9	trans-3-pinanone	8.959	0.85
10	3-pinanone-cis	9.650	0.23
11	L-4-Terpineol	10.550	0.95
12	Estragole	11.511	0.16
13	Anethol	13.989	2.55
14	Bornyl acetate	16.283	0.78
15	Carvacrol	17.394	0.26
16	α-Terpinyl acetate	18.426	2.24
17	Caryophyllene	21.957	25.87
18	Allo-aromadendrene	22.296	6.99
19	β-Gurjunene	23.089	0.96
20	(-)-α-Panasinsen	23.185	0.72
21	Isocaryophyllene	23.413	5.88
22	γ-Gurjunene	23.520	1.60
23	α-caryophyllene	23.928	2.72
24	Espatulenol	24.201	1.17
25	δ-Guaiene	24.996	0.84
26	(+)-Ledene	25.436	10.05
27	β-Cadinene	27.217	0.24
28	Cyclopentane, 4-methylene- 1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl-	27.868	0.22
29	9β-Acetoxy-3,5,8-trimethyltricyclo[6.3.1.0 (1,5)]dodec-2-ene	29.682	0.24
30	caryophyllene oxide	32.256	0.39
31	Tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl-	32.416	0.24
32	4,8, 13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol, 1,5,9- trimethyl-12-(1-methylethyl)-	33.418	0.78
33	Androstan-17-one, 3-ethyl-3-hydroxy-,(5α)-	33.936	0.28
34	Sclarene	40.838	1.49
35	Trachylobane	42.680	1.04

The major components were caryophyllene (25.87%), 1- α -Terpineol (16.85%), (+)-Ledene (10.05%), D-camphor (8.45%) and *Allo*-aromadendrene (6.99%).

The results of GC/MS analysis show that the presence and quantity of dominant compounds in the essential oil of investigated population of *salvia officinalis* significantly differ from the results published earlier (Table 2).

Table-2: Major components (%) of some essential oil of *Salvia officinalis* in literature data.

Authors	Country	Major components
Soković <i>et al.</i> , [21]	The Netherlands	Camphor (16.7%) and α -thujone (31.7%)
Arraiza M.P. <i>et al.</i> [16]	Spain	α -thujone (40.1 - 46.5%), β pinene (2.6 - 4.5%), cineole (3.5 - 8.7%), β thujone (4.1 - 5.6%), camphor (4.1 - 8.0%), borneol (1.3 - 3.7%), α humulene (3.8 - 7.3%), viridiflorol (3.4-12.6%) and manool (0.1-4.5%).
Kabouche Z <i>et al.</i> , [22]	Algeria	α -thujone (24.52%), camphor (16.86%), 1,8-cineole (15.92%), β -thujone (6.50%) and veridiflorol (6.35%)
Porte A <i>et al.</i> , [12]	Brazil	α -thujone (40.90 %), camphor (26.12 %), α -pinene (5.85 %) and β -thujone (5.62 %)

The greatest difference in essential oil composition could be arise from several environmental (climatical, seasonal) and genetic differences [15].

It also might be correlated to the geographic origin of the populations and ecological conditions [17].

Furthermore, the essential oil studied could have good antimicrobial properties because of its high content of 1- α -Terpineol. This components was proved as an efficient agent against Gram + and Gram – bacteria [18], in association with terpinene-4-ol and alpha-pinene, it can be efficient against *Propionibacterium acnes* [19].

The study realized by Hammer el al. [20], indicate that 1- α -Terpineol exert antifungal actions by altering membrane properties and compromising membrane-associated functions.

Conclusions

The chemical composition of the aerial parts of *Salvia officinalis* collected from the north east of Algeria was investigated. Essential oil was obtained from hydrodistillation method, and its chemical composition was determined b GC-MS.

The findings indicated that the essential oil contained the largest amount of caryophyllene (25.87%) in comparison with previously investigated corresponding oils in different countries.

Our study show clear qualitative and quantitative differences and the oil composition did not match the requirement of ISO 9909, Furthermore, the main compounds of this oil present several interesting biological activities.

The next step will be to isolate some major components of *Salvia officinalis* and then to evaluate their antimicrobial and antioxidant activities.

Acknowledgement

Authors are thankful to Pr. Ladjama Ali, the director of Applied Microbiology and Biochemistry laboratory (Department of Biochemistry, Annaba, Algeria). Our sincere thanks also go to Dr. Sebti Mohammed laboratory of Phytochemistry and Pharmacology (Department of Animal Biology and vegetable, Jijel, Algeria) for providing necessary facilities in the analysis.

REFERENCES

1. Penso, G. (1998). Index Plantarum Medicinalium Totius Mundi Eorumque Synonymorum. Milan: Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica.
2. Joshi, RK. (2013). Chemical constituents and antibacterial property of the essential oil of the roots of *Cyathocline purpurea*. Journal of Ethnopharmacology, 145, 621–625.
3. Salgueiro, L., Martins, A.P., Correia, H. (2010). Raw materials: the importance of quality and safety. Flavour and Fragrance journal, 25, 253-271.
4. Sagdic, O., Karahan, A.G., Ozcan, M., Ozkan, G. (2003). Effect of some spice, extracts on bacterial inhibition. Food Science and Technology International, 9, 353-356.
5. Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. Journal of Agriculture Food and Chemistry, 43,2839-2845.
6. Alzoreky, N.S., Nakahara, K. (2002). Antimicrobial activity of extracts from some edible plant commonly consumed in Asia.

- International Journal of Food and Microbiology, 8,223-230.
7. Geethalakshmi, R., Sarada, D.V.L. (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Trianthema decandra* L. Journal of Pharmaceutical Research, 6,101-106.
 8. Alizar, G. (1993). Catalogue Synonymique des *Salvia* du Monde. (Lamiaceae) VI. Biocosme Mésogéen, Nice, 10(3-4), 33-117.
 9. Cantino, P.D., Harley, R.M., Wagstaff S.J. (1992). Genera of Labiateae: Status and classification. In Harley, R.M., Reynolds, T., (eds.) Advances in Labiate Science, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 511-522.
 10. Kasimu, R., Tanaka, K., Tezuka, Y., Gong, Z. N., Li, J. X., Basnet, P., Namba, T., Kadota, S. (1998). Comparative study of seventeen *Salvia* plants: aldose reductase inhibitory activity of water and MeOH extracts and liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) analysis of water extracts. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 46,500-504.
 11. Lian-Niang, L. (1998). Biologically active components from traditional Chinese medicines. Pure and Applied Chemistry,70, 547-554.
 12. Porte, A., Godoy, R.L.O, Maia-porte, L.H. (2013).Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). Revista Brasileira de Plant Medecinal, Campinas,15, 438-441.
 13. Berotiene, G, Nivinskiene, O, Butkiene, R, Mockute, D. (2007). Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). Chemija,18,38-43.
 14. Lawrence, B.M.(2001). Progress in essential oils -sage oils. Perfume and Flavor, 26, 66-72.
 15. Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGrimpsy, J.A., Smallfield, B.M. (1999).Essential oil from Dalmation sage (*Salvia officinalis* L.), variations among individuals, plant parts, seasons and sites. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2048 2054.
 16. Arraiza, M.P., Arrabal, C., López., J.V.(2012) Seasonal Variation of Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Castilla - La Mancha (Central Spain), Notulae Botanicae Horticultural Agrobot, 40: xx-xx.
 17. Maksimovic´, M., Vidic, D., Milos´, M., Solic´, M.E., Abadzic´, E., Siljak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology, 35,473-478.
 18. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86,985-990.
 19. Enshaieh, S., Jooya, A. (2007). The efficacy of 5% topical tea tree oil gel in mild to moderate acne vulgaris: a randomized, double-blind placebo-controlled study. Indian Journal of Dermatology Venereology Leprology,73(1),22-25.
 20. Hammer, K.A., Carsonand, C.F., Riley, T.V.(2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Antimicrobial Chemotherapie, 53, 1081–1085.
 21. Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., van Griensven, L.J.L.D.(2010). Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model, Molecules, 15,7532-7546.
 22. Kabouche, A., Lakhel, H., Ghorab, H., Chibani, S., Semra, Z., Smati, F., Abuhamdah, S., Kabouche, Z.(2013). Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria), Der Pharmacia Lettre, 3, 310-314.

Communications scientifiques

1. LABIOD R, AOUADI S : Effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* sur deux souches de *Staphylococcus aureus* ; **25^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB**, Hammamet, Tunisie, 24 au 27 Mars 2014.

2. LABIOD R, AOUADI S : Effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* sur deux souches d'*e-coli* responsable d'infection urinaire ; **Journées urologiques nationales d'Annaba**, Annaba, Algérie, 20 et 21 Juin 2014.

3. LABIOD R, AOUADI S : Evaluation du potentiel antioxydant des extraits de *Calamintha nepeta* récolté de l'est algérien ; **International seminar on the valuation of aromatic and medicinal plants of the mediterranean**, Blida, Algérie, 11 et 12 Novembre 2015.

4. LABIOD R, AOUADI S : Caractérisation chimique et évaluation in vitro d'effet antioxydant des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* récoltée de deux zones de l'est algérien ; **3^{ème} Journées internationales de chimie organique de Annaba**, Annaba, Algérie, 5,6 et 7 Décembre 2015.