



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

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEN

THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT

Spécialité : Chimie bio-organique et thérapeutique

Par :

Mme BENYOUCEF FATIMA

Sur le thème

Extraction et caractérisation des huiles essentielles de six plantes provenant de l'ouest Algérien (Salvia argentea, Ammoides verticillata, Satureja candidissima, Thymus fontanesii, Artemisia herba-alba et Rosmarinus officinalis): Effet de synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante et antimicrobienne

Soutenu publiquement le 22/06/2020 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme. BEDJAOUI Lamia	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mr. SELLES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Examinateur
Mr. BOUSALEM Smain	Professeur	C. Univ d'Ain Temouchent	Examinateur
Mme. AIN SEBAA Nabila	MCA	C. Univ de Maghnia	Examinatrice
Mr. DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr. ARRAR Zoheir	Professeur	Université de Tlemcen	Invité

*Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

DEDICACES

***A Mes très chère parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études, leur patience et leur générosité*

***A Mon époux** qui m'a toujours encouragé et aidé (merci beaucoup)*

A Ma petite adorable fille

A Mon beau père

***A Mes frères et mes sœurs** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études*

A ma grand-mère

A mes nièces et neveux

A toutes ma famille

A toutes mes collègues et mes amies

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

A nos enseignants

Remerciements

Avant tous, je remercie ALLAH qui m'a aidé et donné la patience, la force et le courage durant ces longues années d'étude.

Je voudrais tout d'abord adresser mes vives gratitudee au Pr **Mohammed El Amine DIB**, pour sa patience, sa disponibilité, sa grande générosité, ces précieuses qualités humaines et surtout de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, orienté, aidé et conseillé. Je ne trouve pas les mots qu'il faut pour le remercier pour sa participation dans la réalisation de cette thèse, croyez Monsieur le Professeur que ma reconnaissance est infinie.

Les travaux de recherche ont été effectués au laboratoire des substances naturels et bioactives « LASNABIO », je tiens à remercier chaleureusement son directeur le Pr **Said GHALEM** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mes plus profonds remerciements vont également au Professeur **Boufeldja TABTI**, chef d'équipe des huiles essentielles, pour sa générosité, et surtout pour ses grandes qualités humaines, c'est grâce à lui que j'ai pu dépasser des moments critiques et que j'ai pu poursuivre mon travail jusqu'au bout.

Je souhaite exprimer mes remerciements à tous les membres de laboratoire LASNABIO en particulier l'ingénieur de laboratoire Kheira.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux Pr BEDJAOUI Lamia (Université de Tlemcen), Pr. BOUSALEM Smain (Centre Universitaire de Ain Témouchent), Pr. Chaouki SELLES (Université de Tlemcen), Pr Mr. ARRAR Zoheir (Université de Tlemcen) et Mme AINSEBAA Nabila (Centre Universitaire de Maghnia), pour l'honneur qui m'ont fait en acceptant de juger ce travail. Je tiens à leurs exprimer mes sincères reconnaissances.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Pr **Jean COSTA** directeur du Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de

Corse, et Pr Alain MUSELLI Professeur à l'université de Corse, pour la réalisation des analyses CPG et CPG/SM.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à mon mari qui m'a aidé tout au long de la réalisation de ce modeste travail, pour ses sacrifices et sa patience.

LISTE DES ABREVIATIONS

BMH : *Bouillon* Mueller Hinton

BHT : l'hydroxytoluène butylé

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CPG/SM : Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse.

DMSO : Diméthylsulfoxyde

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

ERO : les espèces réactives oxygénées

Fe(III)-TPTZ : complexe tripyridyltriazine ferrique

Fe(II)-TPTZ : complexe tripyridyltriazine ferreux

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

HE : Huile Essentielle.

IR_p: indice de rétention polaire.

IR_a: indice de rétention apolaire.

ACP: l'analyse en Composante Principale

CAH: la classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

A. verticillata : *Ammoides verticillata*

S. argentea : *Salvia argentea*

S. candidissima : *Satureja candidissima*

R. officinalis : *Rosmarinus officinalis*

T. fontanesii : *Thymus fontanesii*

A. herba-alba: *Artemisia herba-alba*

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Répartition géographique et climatologique des huit échantillons de *A. verticillata*
- Tableau 2** : Variabilité chimique de *A. verticillata*
- Tableau 3** : Répartition géographique des échantillons de *S. argentea*
- Tableau 4** : Composition chimique de l'huile essentielle de *S. argentea*
- Tableau 5** : Composition chimique de l'huile essentielle de *S. candidissima*
- Tableau 6** : Composition chimique des mélanges croisés des huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticillata* et de *S. candidissima*
- Tableau 7** : Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis*
- Tableau 8** : Composition chimique de l'huile essentielle de *T. fontanesii*
- Tableau 9** : Composition chimique des huiles essentielles de *A. herba-alba*
- Tableau 10** : Composition chimique de fractions oxygénées des trois huiles essentielles
- Tableau 11** : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles et du BHT à différentes concentrations.
- Tableau 12** : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles et du BHT à différentes concentrations.
- Tableau 13** : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba* et du BHT à différentes concentrations
- Tableau 14** : Activité antimicrobienne (zones d'inhibition) des huiles essentielles et leur effet synergique.
- Tableau 15** : Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association
- Tableau 16** : Concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association
- Tableau 17** : Effets bactéricides et bactériostatiques des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association
- Tableau 18** : Activités antimicrobiennes (zones d'inhibition) des huiles essentielles et des mélanges croisés
- Tableau 19** : Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles étudiées individuellement et en association
- Tableau 20** : Concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association
- Tableau 21** : Effets bactéricides et bactériostatiques des huiles essentielles

étudiées individuellement ou en association

Tableau 22 : Répartition géographique des différents échantillons étudiés

Tableau 23 : Origines des souches utilisées dans les différents tests de l'activité antimicrobienne.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures chimiques de quelques composés présents dans les huiles essentielles.

Figure 2 : *Ammoidesverticillata*

Figure 3 : Analyse en composantes principales (ACP) de la composition chimique d'*A. verticillata*. S: Stations.

Figure 4 : Classification hiérarchique ascendante (CHA) : échantillons des huiles essentielles de *A. verticillata* de la région de Tlemcen et Ain-Temouchent.

Figure 5 : Structure chimique des deux chémotypes de *A. verticillata*

Figure 6 : *Salvia argentéa* «Ferrache-enneda»

Figure 7 : Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile essentielle de *S. argentea*

Figure 8 : Structures chimiques des composés majoritaires des racines de l'huile essentielle de *S. argentea*

Figure 9 : *Satureja candidissima* «Nabta elbida»

Figure 10 : Structures chimiques des composés majoritaires des racines de l'huile essentielle de *S. candidissima*

Figure 11 : Composés majoritaires du mélange de *A. verticulata*, de *S. argentea* et de *S. candidissima*

Figure 12 : *Rosmarinus officinalis* L.

Figure 13 : Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile essentielle de *R. officinalis*

Figure 14 : *Thymus fontanesii*

Figure 15 : Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile essentielle de *T. fontanesii*

Figure 16 : *Artemisia herba-alba* «Chih »

Figure 17 : Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile de *A. herba-alba*

Figure 18 : Schéma de fractionnement des huiles essentielles

Figure 19 : CI₅₀ des huiles essentielles individuelles déterminées par la méthode DPPH.

Figure 20 : CI₅₀ des huiles essentielles individuelles déterminées par la méthode DPPH.

- Figure 21** : IC₅₀ des huiles essentielles individuelles et des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba* par la méthode DPPH.
- Figure 22** : Activité antioxydante des mélanges des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* par la méthode DPPH
- Figure 23** : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis*, *A. herba alba* et du contrôle positif (BHT).
- Figure 24** : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* ainsi leurs mélanges croisés.
- Figure 25** : Concentrations inhibitrices demi-maximales (CI_{50s}) des huiles essentielles ainsi que des fractions oxygénées individuelle et combinées.
- Figure 26** : Pouvoir réducteur des composés oxygénés des huiles individuelles et combinées de *T. fontanesii* et *R. officinalis* et de l'acide ascorbique
- Figure 27** : Dispositif de l'extraction des huiles essentielles de type Clevenger
- Figure 28** : Montage utilisé pour le fractionnement des huiles essentielles
- Figure 29** : Réduction du radical DPPH du violet au jaune.
- Figure 30** : Mécanisme réactionnelle de la méthode FRAP
- Figure 31** : Principe de la méthode de diffusion par disque
- Figure 32** : Exemple d'une zone d'inhibition correspondant à l'absence de la croissance des bactéries
- Figure 33** : Évaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) Par la Technique de microdilution en milieu liquide.
- Figure 34** : Évaluation de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB et CMF) en milieu solide

Sommaire

Introduction Générale	p 1
CHAPITRE I : Généralité, Préparation Et Analyse Des Huiles Essentielles	
I.1. introduction	p 5
I.2. Les huiles essentielles: Définition et profil chimique	p 6
I.3. Le concept de chémotype.	p 7
I.4. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles	p 8
I.5. Effet de synergisme et d'antagonisme	p 8
I.6. Analyse des huiles essentielles	p 10
I.6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	p 10
I.6.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM)	p 10
I.7. Étude statistiques	p 11
I.8. Activités biologiques des huiles essentielles	p 12
I.8.1. Activités antioxydantes	p 12
I.8.2. Activités antimicrobiennes	p 14
Chapitre II: Partie A : Etude de la composition chimique des huiles essentielles individuelles et des mélanges de deux Lamiacées et une Apiacée: <i>Salvia argentea</i>, <i>Satureja candidissima</i> et <i>Ammoides verticillata</i>	
Introduction	p 17
II.1. <i>Ammoides verticillata</i>	p 17
II.1.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 17
II.1.2. Lieux de récolte et rendements	p 19
II.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>A. verticillata</i> des différentes stations	p 20
II.2. <i>Salvia argentea</i>	p 23
II.2.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 23

II.2.2. Travaux antérieurs	p 24
II.2.3. Lieux de récolte et rendements	p 24
II.2.4. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia argentea</i>	p 25
II.3. <i>Satureja candidissima</i> (Munby.) Briq	p 28
II.3.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 28
II.3.2. Lieux de récolte et rendements	p 30
II.3.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja candidissima</i>	p 30
Discussion	p 31
II.4. Composition chimique des mélanges des huiles essentielles de <i>Salvia argentea</i> , <i>Satureja candidissima</i> et <i>Ammoides verticilatta</i> .	p 33
II.4.1. Introduction	p 33
II.4.2. Etude de la composition chimique des mélanges	p 33
Chapitre II: Partie B : Etude de la composition chimique des huiles essentielles individuelles et des mélanges de deux Lamiacées et une Apiécées: <i>Thymus fontanesii</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Artemisia herba-alba</i>	
Introduction	p 38
II.5. <i>Rosmarinus officinalis</i>	p 38
II.5.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 38
II.5.2. Lieux de récolte et rendements	p 39
II.5.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	p 39
II.6. <i>Thymus fontanesii</i>	p 42
II.6.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 42
II.6.2. Lieux de récolte et rendements	p 43
II.6.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i>	p 43
II.7. <i>Artemisia herba-alba</i>	p 46
II.7.1. Description botanique et travaux antérieurs	p 46
II.7.2. Lieux de récolte et rendements	p 47
II.7.3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aérienne de <i>Artemisia herba-alba</i>	p 47
II.8. Fractionnement et isolement de la fraction oxygénée de l'huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> , <i>A. herba-alba</i> et <i>R. officinalis</i>	p 50
II.8.1. Composition chimique des fractions oxygénées de <i>T. fontanesii</i> , <i>A. herba-alba</i> et <i>R. officinalis</i>	p 50

Chapitre III : Evaluation Des Activités Biologiques

III.1. Evaluation des activités antioxydantes des huiles essentielles individuelles et croisées des plantes	p 52
III.1.1. Introduction	p 52
III.1.2. Activités antioxydantes	p 53
III.1.3. Matrice individuelle des huiles essentielles par la méthode de DPPH	p 53
III.1.4. Matrice croisée des huiles essentielles des plantes par la méthode DPPH	p 56
III.1.5. Etude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction des ions ferreux (FRAP)	p 59
III.1.5.1. Matrice individuelle et croisé des huiles essentielles de <i>T. fontanesii</i> , <i>R. officinalis</i> et <i>A. herba alba</i>	p 60
III.1.5.2. Matrice individuelle et croisée des huiles essentielles de <i>A. verticulata</i> , <i>S. argentea</i> et <i>S. candidissima</i>	p 61
III.1.6. Etude de l'activité antioxydante des fractions oxygénées des huiles essentielles individuelles et combinées de <i>T. fontanesii</i> et <i>R. officinalis</i> par la méthode DPPH	p 62
III.1.7. Etude de l'activité antioxydante des composés oxygénés des huiles essentielles individuelles et combinées de <i>T. fontanesii</i> et <i>R. officinalis</i> par la méthode FRAP	p 63
Discussion	p 64
III.2. Evaluation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles individuelles et croisées des plantes	p 69
Introduction	p 69
III.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles individuelles et combinées de <i>Ammoides verticulata</i> , <i>Salvia argentea</i> et <i>Satureja candidissima</i> .	p 70
III.2.1.1. Etude de l'activité antimicrobienne par la Méthode de diffusion sur disque	p 70
III.2.1.2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de micro-dilution (CMI et de CMB)	p 73
III.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles individuelles et combinées de <i>T. fontanesii</i> , <i>R. officinalis</i> et <i>S. argentea</i> ,	p 78

III.2.2.1. Etude de l'activité antibactérienne par la Méthode de diffusion sur disque	p 78
III.2.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de dilution CMI et CMB	p 81
Discussion	p 86
Chapitre IV : Matériels Et Méthodes	
IV.1. Matériel végétal	p 90
IV.2. Extraction des huiles essentielles	p 91
IV.3. Rendement	p 91
IV.4. Fractionnement des huiles essentiel par chromatographie sur colonne	p 92
IV.5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles, leur mélange ainsi que les deux fractions oxygénées	p 92
IV.5.1. Analyse par CPG/FID	p 93
IV.5.2. Condition CPG-SM	p 93
IV.6. Identification des composés	p 94
IV.7. Quantification des composés	p 94
IV.8. Outil statistique	p 94
IV.9. Activités biologiques	p 94
IV.9.1. Activité antioxydante	p 94
IV.9.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	p 94
IV.9.1.2. Réduction du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP)	p 95
IV.9.2. Activité antimicrobienne	p 97
IV.9.2.1. Matériel biologique	p 97
IV.9.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par disque.	p 98
IV.9.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) Technique de microdilution en milieu liquide	p 99
IV.9.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB et CMF) en milieu solide	p 100
Conclusion	p 101
Références	

Introduction

L'Algérie est considéré parmi les plus grands pays riverains de la Méditerranée avec une superficie de 2,3 millions de km² où les trois quarts du pays sont représentés par des zones de steppes et des zones sahariennes. Cette situation géographique exceptionnelle explique bien la très grande richesse de la flore algérienne qui est arborée par plus de 1600 espèces spontanées utile et cultivé [1,2]. Un bon nombre de ces espèces possède des substances actives à usage pharmaceutique, cosmétique, alimentaire et en aromathérapie.

En effet les plantes médicinales et aromatiques représentent une source mondiale d'épices et d'extrait à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant et renferment de nombreuses activités biologiques supplémentaires ou synergiques. ces activités ont été étudiées et reproduits chimiquement pour être introduits dans de nombreux médicaments [3]. Leurs activités biologiques intéressantes sont attribuées aux principes actifs qu'elles contiennent.

Ces espèces végétales sont à l'origine de nombreux médicaments et certains de leurs principes actifs entrent dans la composition de 70% des produits pharmaceutiques commercialisés dans les pays industrialisés. Le tiers restant est constitué de produits de synthèse [4].

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population mondiale compte toujours sur l'utilisation des plantes médicinales comme un premier traitement. Les recherches antérieures menées sur les produits naturels dans différent régions dans le monde, montrent que les plantes occupent toujours une place importante dans la vie quotidienne des gens : préparations culinaires, médecine traditionnelle, et parfumerie.

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. Aujourd'hui, ces extrais de plante sont d'une importance étendue dans le commerce international [1] et ont été largement employé dans de multiples et divers domaines tels que la parfumerie, la pharmacie, l'aromathérapie et l'agro-alimentaire.

Elles ont été également suggérées comme source alternative très importante pour augmenter la durée de la conservation des produits alimentaires grâce aux effets antimicrobiens et antioxydants de certains de leurs composants [5]. Ces huiles naturelles viennent remplacer et réduire l'utilisation des agents de conservation synthétique qui ont montré des effets néfastes sur la santé et l'environnement.

En effet, les huiles essentielles sont des substances naturelles riches en composés bioactifs doués de propriétés thérapeutiques et biologiques intenses notamment comme antimicrobienne, antioxydant, analgésique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antivirale et insecticides [6-11]. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études se sont concentrées sur la recherche d'une nouvelle molécule d'origine naturelle douée d'activités biologiques intenses avec un faible impact négatif sur la santé humaine.

D'autre part, lorsqu'on utilise la plante entière plutôt que ses principes actifs isolés, ses différentes parties agissant ensemble, ils sont plus efficaces qu'une dose équivalente du principe actif extrait de la plante, cela veut dire qu'une plante médicinale contient un ensemble de principes actifs qui ont chacun un effet thérapeutique spécifique. De ce fait, l'action thérapeutique globale d'une plante ne se résume pas à un constituant isolé. Elle est la résultante de l'action de tous ses constituants et nous parlons d'action synergique [12].

Depuis de nombreuses années les huiles essentielles ont été utilisées en combinaison pour agir en synergie dans le but d'améliorer encore leurs effets [13]. En effet, en aromathérapie, le principe de la synergie est simple ; il s'agit de mélanger deux ou plusieurs huiles essentielles.

Même à l'échelle industrielle pharmaceutique, les médicaments sont couramment utilisés dans des mélanges, également appelés cocktails, pour traiter les maladies, en particulier le cancer et les infections virales. Deux ou plusieurs médicaments, ou en l'occurrence, deux ou plusieurs composés végétaux bioactifs, interagiront de quelque façon ou échoueront à interagir.

Tous simplement, si une interaction produit un effet supérieur à celui prévu pour chaque médicament individuel, l'interaction est dite synergique. Si l'effet est inférieur, on l'appelle antagoniste. Si l'effet est égal à l'effet attendu (c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'interaction), l'interaction est appelée additif.

Problématique de la thèse

Six plantes de la flore algérienne ont été sélectionnées pour leurs utilisations médicinales pouvant être en lien avec leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, il s'agit de *Ammoides verticillata*, *Satureja candidissima* et *Salvia argentea*, *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba-alba*.

Dans ce contexte et dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques de l'ouest algérien et dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants et des antibiotiques d'origine naturelle, nous nous sommes intéressés dans ce travail à étudier la composition chimique des mélanges des huiles essentielles ainsi que leurs effets synergiques sur l'activité antioxydante et antimicrobiennes de 6 plantes médicinales poussant à l'état spontané dans l'ouest Algérien.

Un des principaux objectifs de ce travail concerne les interactions entre les composés des huiles essentielles très utilisés dans la médecine traditionnelle, en particulier, nous nous sommes intéressés aux huiles qui ont des effets thérapeutiques potentiels et qui présentent une faible toxicité systémique et ne présentent donc pas un risque élevé de produire des effets indésirables.

La présente thèse est subdivisée en quatre chapitres à savoir :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique en lien avec les constituants des huiles essentielles obtenus par hydrodistillation ainsi qu'à leur utilisation en tant qu'agents antioxydants naturels et dans la lutte contre les infections microbiennes. Le chapitre décrit aussi la séquence analytique mise en œuvre pour la caractérisation des huiles essentielles et des fractions oxygénées en précisant les procédés d'échantillonnage, la préparation du matériel végétal et la méthodologie d'analyse développée.

Le deuxième chapitre est subdivisé en deux parties :

La partie(A) présente dans un premier temps l'étude bibliographique de *S. argentea*, *S. candidissima* et *A. verticillata*, les résultats de l'étude de la composition chimique des échantillons des huiles essentielles individuelles et collectives de chaque espèce et la recherche des paramètres environnementaux impliqués dans la variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata*.

La partie (B) présente aussi une présentation bibliographique de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba-alba*, ensuite nous présentant l'ensemble des résultats relatifs aux constituants moléculaires et enfin, nous présentant le profil chimique de leurs fractions oxygénés.

Le troisième chapitre sera consacré à la valorisation des huiles essentielles des six plantes étudiées individuellement et en combinaisons et cela par des tests des activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne. Et enfin nous terminerons par l'étude du potentiel antioxydant des fractions oxygénées des deux huiles essentielles de *T. fontanesii* et *R. officinalis* séparément et en combinaisons.

Le quatrième chapitre est consacré à la description du volet expérimental développé dans notre travail, à savoir, le matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour réaliser l'extraction et l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles ainsi que leurs mélanges.

Enfin une **conclusion générale** qui résume l'ensemble des résultats obtenus à travers les études chimiques et biologiques des six espèces étudiées et nous terminons par quelques perspectives.

Chapitre I

Généralité, Préparation Et Analyse

Des Huiles Essentielles

I.1. Introduction

Depuis des milliers d'années, les hommes utilisent des huiles essentielles pour améliorer leur santé physique, émotionnelle, mentale et spirituelle. Ce n'est que récemment que la science a commencé à découvrir comment ces liquides aromatiques volatils et les précieux composés chimiques qu'ils contiennent agissent sur le corps et l'esprit. Le peuple égyptien est largement reconnu pour ces réalisations. Il n'est peut-être pas surprenant que les anciens Égyptiens aient été parmi les premiers à utiliser des huiles essentielles. Les archives montrent que les huiles aromatiques faisaient partie de la vie quotidienne en Egypte dès 4500 av [14]. La cannelle, la myrrhe, le bois de santal et l'encens étaient des favoris précieux ; ils étaient d'une telle valeur qu'ils étaient parfois achetés avec de l'or pur.

En Chine, les herbes aromatiques et les huiles essentielles sont devenues des remèdes contre une foule de maux. Nombre de ces composés sont encore utilisés par les praticiens de la médecine orientale de nos jours [15].

Les anciens grecs et romains utilisaient également des huiles essentielles, principalement pour l'aromathérapie, le massage thérapeutique, l'hygiène personnelle et la médecine. L'huile essentielle de myrrhe été mélangée dans une pommade pour une utilisation sur le champ de bataille; c'est un remède efficace pour prévenir les infections post-traumatiques [14].

Au cours de l'épidémie de peste bubonique des années 1400, des médecins désespérés ont décidé d'essayer des mélanges ayurvédiques à la place de médicaments inefficaces. Ces anciens remèdes, qui comprenaient des huiles essentielles de camphre, de reine des prés, de romarin et de lavande, se sont avérés efficaces. Au même moment, l'encens et le pin sylvestre étaient brûlés dans les rues pour écarter les mauvais esprits [16], Ils ont remarqué que moins de personnes sont mortes de la peste dans les régions où cette pratique était courante.

Au début du moyen Age l'intérêt porté sur les huiles essentielles à connu un déclin, et il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'intéresser à nouveau à la filière de l'aromathérapie qui utilise les propriétés biologiques curatifs de ces huiles [17].

Au cours de ces dernières années l'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître, dont plusieurs substances naturelles ont été découvertes avec des caractéristiques intéressantes et par conséquent de nombreux patients qui auparavant ne pouvaient pas bénéficier de traitement adéquat peuvent désormais être exposés à des traitements efficaces qui ne présentent pas un risque élevé de produire des effets indésirables soit sur la santé de l'homme ou bien sur l'environnement.

I.2. Les huiles essentielles : Définition et profil chimique

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des métabolites secondaires aromatiques, volatils de consistance huileuse [18], extraites à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou bien par des procédés mécaniques [19]. En général leur densité est inférieure à celle de l'eau, elles sont solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes [20].

Ces huiles sont couramment utilisées par l'aromathérapie pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Elles sont incorporées dans les commerces pharmaceutiques, cosmétiques, et agroalimentaires. Selon une statistique réalisée par Essawi et al, parmi trois mille huiles essentielles, 300 sont commercialisées et destinées particulièrement à l'industrie des arômes et des parfums [21].

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, très variables constituées principalement par des composés terpénoïdes et des composés phénylpropanoïdes (Figure 1). Ces composés peuvent contenir toutes les grandes fonctions de la chimie organique (alcools, phénols, composés carbonylés, ester, et parfois des dérivés azotés, et soufrés) [20].

La classe des terpénoïdes est la plus abondante des métabolites secondaires, représentée par des molécules très variées au niveau structurel, produites de la condensation de plusieurs unités isopréniques (C_5H_8).

La deuxième classe est représentée par les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, ces derniers sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Elle renferme des molécules odorantes comme la vanilline,

l'eugénol, et l'estragole. Ces composés sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques ; la phénylalanine et la tyrosine.

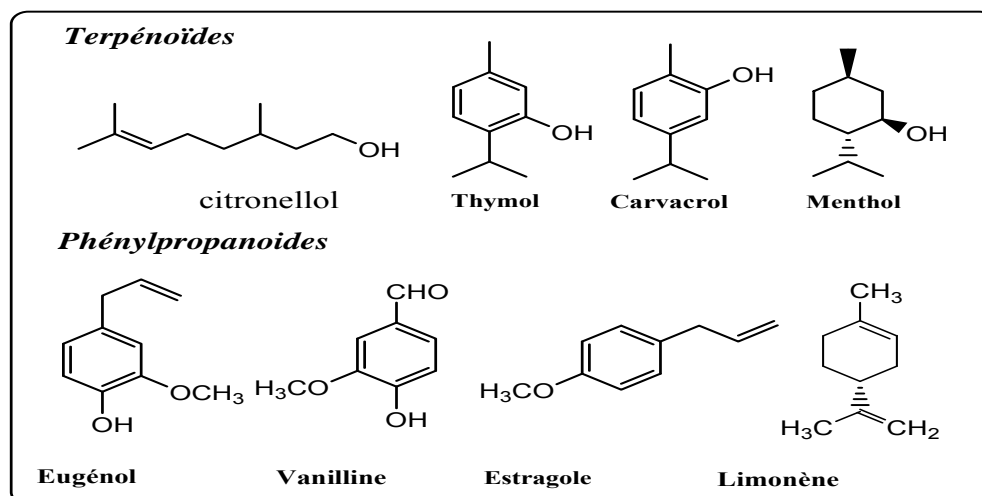


Figure 1. Structures chimiques de quelques composés présents dans les huiles essentielles.

I.3. Le concept de chémotype.

Au sein d'une même variété botanique, le profil chimique d'une huile essentielle peut être différent, on parle alors de race chimique ou de chémotype, en effet le chémotype est une indication précise qui désigne le composant majoritaire et distinctif d'une huile essentielle à une autre d'une même espèce botanique. Cette classification nous a permis de bien favoriser tel ou tel huile essentielle pour des fins plus efficaces et précises. Or les huiles essentielles à chémotype différents présentent des activités différentes et par conséquent des toxicités variables [22]. A titre indicatif l'espèce de *Artemisia herba-alba* originaire de plusieurs pays a révélé de nombreux chémotypes; le Camphre est le composé principal de l'huile essentielle de Maroc (26,67%) et de l'Espagne (15%). Le β -thujone (30%) est le chémotype de Tunisie, alors que celui de l'Algérie (Djelfa) a révélé la Davanone comme composante principale (42,8 %) [23].

I.4. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles

De nombreux facteurs déterminent la qualité de l'huile essentielle. Par exemple, les espèces de plantes, les techniques d'extraction et même les conditions de croissance, y compris la qualité du sol, la couverture nuageuse et la température de l'environnement, peuvent affecter les plantes à partir desquelles les huiles essentielles sont extraites [24].

La présence ou l'absence de certains constituants dans une plante est en premier lieu en lien avec sa biosynthèse et donc son patrimoine génétique, c'est pourquoi une même espèce/variété peut présenter plusieurs chémotypes [24]. L'un des exemples le plus célèbre est celui de l'huile de *Thymus vulgaris* du sud de la France qui présente six chémotypes différents [25]. D'autre part, les paramètres environnementaux tel que les conditions climatiques (la température, l'humidité, la durée d'ensoleillement, le régime de vents), l'altitude, la nature de sol, l'âge, le cycle végétatif d'une espèce donner, l'organe végétal étudié, la période de récolte, ce sont tous des caractéristiques déterminant la composition et le rendement des huiles essentielles [26-29]. Par exemple, les huiles essentielles de *Calendula arvensis* de l'ouest d'Algérie a montré que la teneur en sesquiterpènes oxygénés (72%) a été plus élevée dans la zone littorale (faible altitude, climat humide) que les huiles d'origine montagnaise (haute altitude, climat froid et humide) qui ont été caractérisées par des teneur plus élevées en sesquiterpènes oxygénés (49.4%) et des teneurs plus faibles en sesquiterpènes hydrocarbonés (26.1%) [7].

Certains chercheurs se sont préoccupés d'autres facteurs notamment la méthode d'extraction ainsi que les caractéristiques physiques telles que le PH, la température et la durée d'extraction [30]. D'autre part, la durée de séchage et de stockage affecte beaucoup plus le rendement que la composition chimique [31].

I.5. Effet de synergisme et d'antagonisme

Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont été mené pour expliquer la synergie d'action des composants des huiles essentielles sur les

différentes sortes de cellules végétales ou animal qui présente un obstacle pour l'application de ces huiles en pharmacologie et dans les essais cliniques [32]

Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent affecter leur activité. Par exemple, l'activité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* contre la souche *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est due à la synergie entre les principaux composants comme le carvacrol et le thymol [33]. Une autre interaction synergique a été signalée entre le carvacrol et son précurseur le p-cymène sur *Bacillus cereus* [34]. Des effets antagonistes, ont été montrés sur l'activité antibactérienne entre les molécules actives et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité [35]. Cependant, la comparaison des performances de chaque huile brute avec sa fraction hydrocarbonée isolée ou avec sa fraction oxygénée permet la discussion la plus intéressante. L'huile essentielle de *Origanum vulgare* contenant 67% de thymol et de carvacrol et environ 14% de terpinène, offre un exemple de synergie entre les composants de l'huile essentielle. Alors que sa fraction hydrocarbonée isolée n'offrait aucune protection contre le saindoux et que la fraction oxygénée (contenant environ 94% de thymol+carvacrol) ne différait pas de celle du carvacrol ou du thymol isolé, l'ensemble de l'huile protégeait le saindoux de l'oxydation plus efficacement que toute fraction ou composant utilisé seul à la même concentration [36]. L'interaction synergique signifie que l'effet total du mélange des produits chimiques pris ensemble est supérieur à la somme des effets des composés individuels. Sachant qu'une interaction antagoniste signifie que l'effet du mélange des produits chimiques est inférieur à la somme des effets des composés individuels.

Différents aliments possèdent différents composés bioactifs aux capacités antioxydantes variées. Lorsque les aliments sont consommés ensemble, la capacité antioxydante totale des mélanges alimentaires peut être modifiée via des interactions synergiques, additives ou antagonistes entre ces composants, qui peuvent à leur tour modifier leurs impacts physiologiques [37]. De plus, plusieurs recherches ont étudié l'effet synergique des HEs avec d'autres composants, particulièrement des médicaments conventionnels.

Ces études restent plus ou moins bornées *in vitro*. Dans ce type de recherches, il y a des difficultés reliées à la rationalisation des effets obtenus car les HEs sont des mélanges de molécules complexes de structures organiques très variées. Malgré ces difficultés, ces études sont très importantes et devraient encourager les études liées essentiellement aux effets synergiques avec la chimiothérapie car ces mélanges peuvent être des sources attirantes de nouveaux agents antitumoraux [38].

I.6. Analyse des huiles essentielles.

I.6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode analytique chromatographique efficace, qui fournit d'excellentes séparations des mélanges quelque peu complexes dans un laps de temps raisonnable s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [39]. La CPG est définitivement l'outil de choix pour l'étude et le contrôle de la qualité des huiles essentielles et des extraits des hydrolats. D'autre part, la CPG permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. C'est une technique d'analyse quantitative qui fournit d'une part, le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé et qualitative sur la base des temps de rétention d'autre part [40]. Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Ces derniers demeurent constants dans la mesure où la programmation de température reste identique ; ils sont calculés sur colonne polaire (IRp) et apolaire (IRa) et sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou encore reportés dans la littérature [41].

I.6.2 Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM) :

Depuis les années 1950, cette méthode de couplage CPG-SM n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de

l'agroalimentaire, des produits pétroliers, parfumerie, cosmétique et médecine.

L'objectif de cette méthode est de permettre l'identification de divers constituants d'un mélange complexe par spectrométrie de masse, ces divers constituants étant séparés par chromatographie en phase gazeuse. CPG-SM est en général une excellente technique pour fournir une identité. Cependant, pour analyser les différents constituants des huiles essentielles ou des fractions isolées de manière efficace et précise, il est toujours nécessaire de choisir soigneusement les colonnes, les conditions d'injection, les conditions de température de la colonne, etc. La sélection des ions quantificateurs affecte directement l'identification et la limite de détection [42].

I.7. Études statistiques

La composition chimique des huiles essentielles est caractérisée par une grande variabilité en lien avec une série de facteurs notamment les facteurs génétiques, le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte ainsi que les paramètres environnementaux tel que la température, l'humidité, et l'altitude. Donc pour expliquer cette variabilité, il est important de réaliser une étude statistique des données qualitatives et/ou quantitative qui correspond aux pourcentages normalisés et standardisés des constituants des matrices étudiées. Pour ce faire, deux outils sont habituellement utilisés ; l'analyse en Composante Principale (ACP) et la classification Ascendante Hiérarchique (CAH) [43].

L'analyse en Composante Principale (ACP) c'est une méthode descriptive très efficace pour l'analyse des données quantitatives sous la forme de tableaux à M observations (individus) sur N variables (constituants). Dans notre étude les individus sont les différentes stations de récolte alors que les variables sont les pourcentages (%) des constituants des huiles essentielles.

La classification Ascendante Hiérarchique (CAH) fournit des données sous forme d'un dendrogramme (arbre). La méthode utilisée est celle de Ward de Clustering Hiérarchique qui est basée sur la distance euclidienne entre paires d'échantillons d'huile essentielle. Elle permet de regrouper les individus en

classe homogène en fonction de l'étude de certaines caractéristiques de ces individus.

I.8. Activités biologiques des huiles essentielles

I.8.1. Activités antioxydantes

Les espèces réactives oxygénées et azoté ERO/ERN tel que les radicaux libres sont produits en continu dans le corps humain qui sont contrôlés par les enzymes antioxydants endogènes. Dans le cas où il y a un excès de ces espèces, suite à une exposition à des substances oxydantes externes ou un déséquilibre dans les mécanismes de défense et/ou une diminution du taux d'antioxydant dans l'organisme, ces espèces sont capable de réagir et altérer diverses biomolécules comme l'ADN, les acides polyinsaturé, les protéines, les lipides, ainsi que sur le système immunitaire ce qui donne lieu au stress oxydatif. Celui-ci est impliqué dans certaines pathologies comme le cancer, le diabète, le vieillissement, la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et plusieurs d'autres maladies [44,45]. Dans ce cas-là, un apport d'antioxydants externe est indispensable pour rétablir l'équilibre entre les radicaux libre et les antioxydants de l'organisme.

Par définition, un antioxydant est toutes molécules endogène ou exogène présente en faible concentration par rapport au substrat oxydable, qui est capable de prévenir, de ralentir ou d'empêcher l'oxydation et la destruction des substrats biologiques [46]. Les antioxydants réagissent avec les radicaux libres et les rendent bénigne par conséquent protéger l'organisme contre les effets de stresse oxydatifs et réguler l'équilibre redox cellulaire. Selon leur mécanisme d'action, les systèmes de lutte contre les radicaux libre sont classés en deux groupes ; le 1^{er} dit primaire dont l'inhibition se fait par la libération d'atome d'hydrogène ou bien par transfère d'un ou plusieurs électrons. Le deuxième est dit secondaire ou préventif, d'où l'antioxydant inhibe l'oxydation des lipides par divers mécanisme incluant des désactivateurs de l'oxygène singlet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes.... [47-49].

Certains antioxydants sont à la fois produits en faibles quantités par l'organisme et apportés par l'alimentation telle que la cystéine et la

Coenzyme Q10 [50]. En revanche notre régime alimentaire joue également un rôle primordial dans la prévention contre ces pathologies néfastes provenant des espèces radicalaires dont l'apport des antioxydants particulièrement d'origine naturel tel que les polyphénols (acides phénolique, flavonoïdes), les vitamines (vitamine A, B et C), et les oligoéléments (cuivre, manganèse, et le zinc) vont jouer un rôle alternatif des antioxydants endogènes. A cet effet, les études canalisées sur l'effet antioxydant des plantes sont actuellement devenues un axe de recherche promoteur.

Dans le même axe, l'intérêt porté sur les antioxydants naturels est en accroissement, leur utilisation dans les aliments et les préparations pharmaceutiques représentent une alternative aux antioxydants synthétiques qui montrent des effets nocifs sur la santé de l'homme en causant des maladies dangereuses. A titre indicatif, les antioxydants synthétiques comme l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisolebutylé (BHA) sont des composés assez volatils et se décomposent rapidement sous l'effet de la chaleur, de plus ils sont strictement liés à une série de problèmes soit aux niveaux de leur métabolisme ou leur accumulation dans le corps. Ils sont suspectés également à long terme d'effets mutagènes et cancérogènes [1,50-52].

Certaines plantes médicinales, épices, et plus particulièrement les huiles essentielles, ont été signalées pour être efficace et présentent un fort pouvoir antiradicalaire. Ce pouvoir est en lien aux potentiels antioxydants de leurs composants à arrêter ou retarder l'oxydation de la matière organique. Plusieurs composés actifs ont été isolés et estimés comme étant des antioxydants, beaucoup plus les phénols. Ces molécules sont douées d'un effet oxydoréduction élevé, qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et des désactivateurs d'oxygène singlet [53].

Ainsi, le thymol et le carvacrol, deux composés phénoliques dotés d'un pouvoir antioxydants prouvés, et en raison de leur réactivité sur les radicaux peroxy, ils sont utilisés dans la lutte contre le processus de stress oxydant. L'huile essentielle de *T.vulgaris a* exprimé une bonne efficacité à piéger le radicale DPPH avec une IC₅₀ de 0.1 µg/ml, cette activité est due aux proportions élevées en thymol et en carvacrol [54].

Il existe néanmoins des huiles non phénoliques qui révèlent un comportement antioxydant de certains composants tel que les alcools, les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures, les éthers et des composés soufrés [55,56].

Il faut savoir que le pouvoir antioxydant d'une HE ne résulte pas exclusivement aux composés majoritaires, mais il est également attribuable aux d'autres composés minoritaires qui peuvent agir de manière synergique ou antagoniste pour créer un système efficace contre les radicaux libres [57]. A titre indicatif, l'activité antioxydante de l'HE de *A.millefolium* a été évaluée par la méthode de DPPH où l'HE s'est révélée être plus efficace ($IC_{50}=1.56 \mu\text{g/ml}$) que celle de BHT ($IC_{50}=19.30 \mu\text{g/ml}$). Dans cette étude l'activité antioxydante des composés majoritaires (1,8 cinéol, camphre, β -pinène, bornéol, trpinène-4-ol et α -pinène) ont été évalués individuellement, aucune activité n'a été détectée pour ces composés [58]. Cela veut dire, un effet antioxydant synergique résulte entre ces composés majoritaires et minoritaires.

Rappelons que les huiles essentielles sont également employées dans l'industrie alimentaire afin d'améliorer le goût des aliments et grâce aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de certains de leurs composants, ils sont utilisés également en tant qu'agents de conservation. Selon l'équipe du Laboratoire de Recherche Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESLA), l'utilisation directe des HEs sur les aliments telle que la viande hachée, légumes hachés, yaourts...ou la vaporisation sur la surface de l'aliment (viande, poulet, fruits et légumes entiers), les protège contre l'oxydation.

De même l'industrie alimentaire inclut des agents de conservation à base d'huiles essentielles, citons l'additif « DMC Base Natural », celui-ci réunit 50% des huiles essentielles de romarin, de sauge, et d'agrumes et 50% de glycérol [18,59].

1.8.2. Activités antimicrobiennes

Les médecins luttent contre les infections depuis la nuit des temps. Les substances antimicrobiennes sont classées comme germicides pour leur

capacité à détruire les microbes, tandis que d'autres sont antibactériens et inhibent la croissance bactérienne.

Bien que la plupart des agents antimicrobiens fabriqués aujourd'hui contiennent une variété de produits chimiques, les huiles essentielles antimicrobiennes sont complètement naturelles. Certaines des huiles essentielles antiseptiques les plus puissantes incluent l'huile de lavande, l'huile d'arbre à thé et l'huile de clou de girofle. Il existe de nombreuses façons différentes de mélanger des huiles essentielles antiseptiques pour améliorer l'efficacité, et il existe diverses méthodes pour les utiliser, notamment les infuser dans de l'eau du bain, les appliquer sur des blessures mineures ou les ajouter à des cataplasmes ou à des compresses.

Les huiles essentielles sont des agents antimicrobiens largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et dans la conservation des aliments ; elles empêchent la croissance des moisissures, levures et des bactéries. En effet elles agissent contre une large gamme de bactéries, notamment celles qui développent des résistances aux antibiotiques [60].

En outre les HES sont abondamment utilisés pour traiter certaines affections y compris l'infection d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux. En médecine dentaire, plusieurs HES ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries [61]. L'activité biologique d'une huile essentielle est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre. Elle est en dépendance à son profil chimique ainsi, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique [33, 60, 62,63].

De nombreux travaux de recherche ont été réalisés sur l'activité microbienne des huiles essentielles et démontrent que cette activité est directement liée aux composés terpénoïdes et les phénylpropanoïdes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur

squelette hydrocarbonée et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées [60]. Les HEs 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 [33,64-66]. 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 autres 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 : *Escherichia coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* [67,68].

Certaines études ont montré que les HE brutes avaient une activité antibactérienne supérieure à celle des composés majoritaires testés en mélange ou séparément, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et peuvent avoir un effet synergique ou potentialiser l'influence [18, 62,69]. D'autre part l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dépend également du type des microorganismes ciblés, elle est variable d'une souche bactérienne à une autre. Elles peuvent être bactéricides c'est-à-dire tuée la bactérie ou bactériostatiques et juste arrêtée la croissance des bactéries [60].

De manière générale, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif. Cela est directement lié à la nature de la paroi cellulaire des bactéries à Gram (-), qui est constituée principalement par des lipopolysaccharides, limite la diffusion des composés hydrophobes et évite l'accumulation des huiles essentielle [18]. Par exemple les deux souches bactériennes *P. aeruginosa* et *S. typhi* à Gram (-) manifeste une très grande résistance aux agents antimicrobiens [70]. Quoiqu'Il existe quelques exceptions, par référence la bactérie *A. shydrophila* a été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles [71].

Chapitre II

*Etude de la composition chimique des huiles
essentielles individuelles et des mélanges de
deux Lamiacées et une Apiacée :*

*Salvia argentea, Satureja candidissima et
Ammoides verticilatta*

II.1. Introduction

Le sol algérien est riche en plantes médicinales et aromatiques, il compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [72]. La famille des lamiacées et des apiécées ont été utilisées dans le monde entier dans l'ethnomédecine, et ils sont d'une importance horticole d'un point de vue économique. Non seulement ils fournissent des produits culinaires, mais ces espèces pourraient également être une nouvelle source de métabolites secondaires biologiquement actifs.

Dans cette première partie (A) nous présenterons successivement, l'étude bibliographique de deux (02) espèces de lamiacée et une apiécées puis l'étude de la composition chimique des huiles essentielles individuelles et des mélanges croisés de *Salvia argentea*, *Satureja candidissima* et de *Ammoides verticillata*. Il s'agit des plantes médicinale et aromatique poussant à l'état spontanée dans l'ouest algériens et connus pour leurs vertus thérapeutiques notamment leur utilisation dans des mélanges en infusion contre la grippe, le rhume, les maux de tête, la fièvre, asthme, et les maladies broncho-pulmonaires. De plus ils sont caractérisés par des odeurs caractéristiques qui les rendent des condiments alimentaires spécifiques.

II.1. *Ammoides verticillata*

II.1.1. Description botanique et travaux antérieurs

Le genre *Ammoides* regroupe 2 espèces, *Ammoïdes atiantica* (Coss. et Dur.) Wolf. (Plante bisannuelle); et *Ammoïdes verticillata* (Desf.) Briq (Plante annuelle) [72,73]. *Ammoïdes verticillata*, également connue sous le nom de *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr, *Psychotis ammoides* Koch, *Ptychotis verticillata*, et *Petroselinum ammoides* Rchb Fil [72, 74,75]; c'est une espèce herbacée annuelle qui fait partie de la famille des apiacées, elle pousse spontanément dans le nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie et Egypte) et de l'Asie (Iraq, Iran, Inde, Pakistan et Afghanistan), On la trouve souvent dans les champs, les pelouses, les montagnes et dans les forêts. Elle est cultivée beaucoup plus en Inde et dans d'autres pays tel que l'Egypte, l'Iran, Pakistan et Afghanistan [72, 73, 76,77]. Cette espèce est connue sous le nom vernaculaire Noukha ou bien « nûnkha » dérive du nom perse « nankhah » (Nan

et khah signifiant respectivement pain et gout) [76]. C'est une plante à souche filiforme, et à tige très ramifiée de 60-90 cm de haut [77], leurs feuilles basales possèdent de nombreux segments verticillés (figure 2).

L'inflorescence de cette plante est ombelliforme à fleurs blanches [78]. Elle est fortement aromatique d'odeurs très agréable, intense et diffusible, balsamique et persistante [73]. Sa floraison s'étant du mois de mai jusqu'au mois de juillet [78]. Les fruits ont la même forme et taille de ceux du persil [77].



Figure 2. *Ammoides verticillata*

Ammoïdes verticillata est une plante aromatique et médicinale largement employée en médecine traditionnelle algérienne et en particulier dans l'ouest Algérien pour traiter certaines maladies. Grâce à son arôme fort, elle est utilisée comme condiment alimentaire (pain, rôti, soupe et légumes) [73]. Il est à noter que les feuilles et les fleurs sont particulièrement très utilisées dans la préparation de la soupe aux escargots [79]. Ces fruits séchés sont utilisés comme épice. En outre, la partie arienne est employée comme conservateur alimentaire spécialement pour la conservation des olives [80].

Une enquête réalisée par Bekhechi et al en 2002 auprès des herboristes et des gens de la campagne de la région de Tlemcen a montré que cette plante présente des propriétés culinaires et surtout thérapeutiques [80]. Les feuilles et les fleurs sont utilisées en infusion contre l'irritation thermique, Abscess et furoncle, alors que les racines sont utilisées en décoction pour guérir la diarrhée et comme diurétique. La plante entière est très utilisée en infusion pour guérir les maux de tête, la fièvre, la grippe, le rhume, les maladies broncho-pulmonaires, l'asthme, la sinusite, migraine et les infections rénales.

II.1.2. Lieux de récolte et rendements

Les échantillons de *A. verticillata* ont été prélevés dans 8 stations de la région de Tlemcen et de Ain-Temouchent, réparties en deux zones principales. La première zone correspond aux lieux de récolte de Ain-Temouchent avec des altitudes qui varient entre 185 à 250 m (S1-S4). La deuxième zone correspond aux lieux de récolte montagnaise avec des altitudes allant de 835 à 1125 m, climats humides et plus froids (S5-S8). Certaines informations concernant les lieux de récolte sont présentées dans le (Tableau 1).

Les résultats ont montré que les rendements en huiles essentielles varient selon la provenance, allant de 2.1% à 3.1% (Tableau 1). Le rendement le plus élevé (3.1%) a été observé dans la région de Lalla Setti (S8) (une région humide située à 1000 m d'altitude), tandis que le plus faible (2.1%) a été observé dans la région de Beni-Saf (S4) (une région humide située à 185 m d'altitude).

Tableau 1. Répartition géographique et climatologique des huit échantillons de *A. verticillata*

Zones	Echantillons	Régions	Rendements	Altitudes	Climats
Zone 1	S1	Ain-Temouchent	2.3	250	Humide
	S2	Sidi Safi 1	2.8	220	
	S3	Sidi Safi 2	2.2	220	
	S4	Beni Saf	2.1	185	
Zone 2	S5	Zarifet	3.2	835	Humide et plus frais
	S6	Ain fettouh	2.9	1125	
	S7	Mafrouche (terny)	2.8	1100	
	S8	Lalla Setti	3.1	1000	

Sur la base de la différence entre les rendements en huiles essentielles, les 8 sites ont été classés en deux ordres.

Ordre 1 : Rendements en huiles essentielles plus faible (S1 à S4) dans les régions à faibles altitudes et un climat humide.

Ordre 2 : Rendement en huiles essentielles plus élevé (S5-S8) dans les régions à hautes altitudes et un climat humide et plus frais.

En comparant nos résultats avec ceux rapporté dans la littérature, nous remarquons que les rendements de nos huiles sont comparables à ceux rapportés précédemment [81, 82,9]. Néanmoins ces rendements restent moins faibles en comparaison avec l'HE de *A. verticillata* de la région d'Oran (4.97%) [79].

D'après nos résultats, nous remarquons que la différence d'altitude avait un effet sur les rendements des huiles essentielles. A cet effet, la culture de *A. verticillata* dans des sites à basse altitude et de climat humide semble être appropriée pour l'obtention de rendement optimaux en HE (Tableau 1).

II.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata* des différentes stations

Les huiles essentielles de *A. verticillata* obtenues à partir des parties aériennes ont été étudiées par CPG-IR et CPG/SM. L'analyse des huiles essentielles a permis l'identification de 12 composés (Tableau 2). Le profil chromatographique a montré que l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes a été constituée majoritairement par des monoterpènes hydrocarbonés (38.3-64.1%) et des monoterpènes oxygénés (34.0-54.7%).

Bien que le profil chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata* a été similaire dans les différentes stations, il y avait des différences dans le pourcentage d'abondance normalisé de leurs composants principaux. Une analyse en composantes principales (ACP) et une analyse en grappes (AC; dendrogrammes) ont été appliquées pour identifier les relations possibles entre la composition des huiles essentielles et les facteurs environnementaux, en particulier les origines géographiques des échantillons.

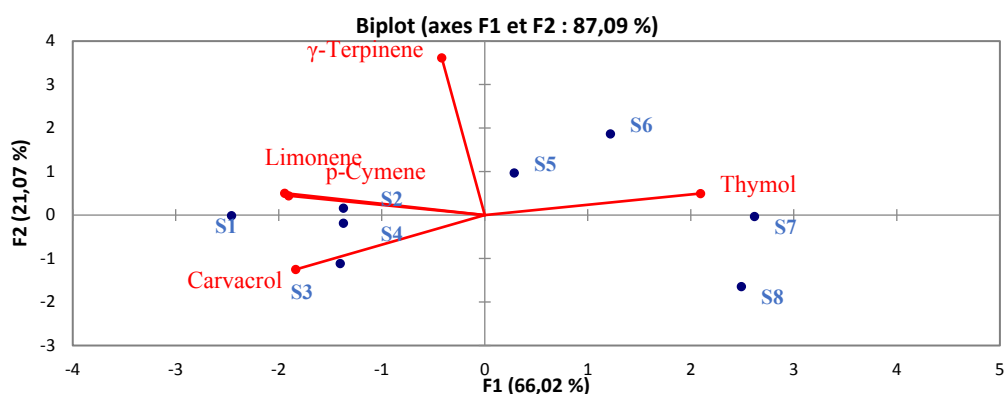


Figure 3 : Analyse en composantes principales (ACP) de la composition chimique de *A. verticillata*. S: Stations.

Les données présentées dans les figures 3 et 4 ont été obtenues à partir de la matrice de corrélation et de la matrice standardisée liant les compositions des huiles essentielles aux emplacements des échantillons.

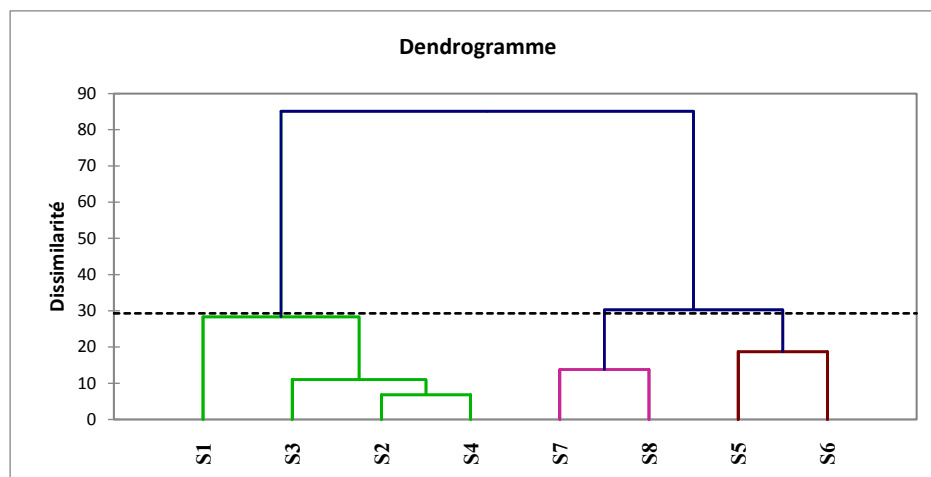


Figure 4 : Classification hiérarchique ascendante (CHA) : échantillons des huiles essentielles de *A. verticillata* de la région de Tlemcen.

Tableau 2. Variabilité chimique de *A. verticillata*

No. ^a	Compounds	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	Identification ^e
1	α -Thujène	932	925	1012	-	-	-	-	0.3	0.4	1.1	0.8	RI, MS
2	α -Pinène	931	932	1023	0.6	0.8	0.1	0.5	0.7	0.8	0.2	0.1	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	0.1	0.2	0.6	tr	0.2	0.1	tr	0.3	RI, MS
4	Myrcène	976	982	1159	0.5	0.7	1.2	0.6	0.7	4.1	6.5	8.1	RI, MS
5	p-Cymène	1010	1012	1259	25.2	19.2	22.1	17.5	19.5	17.5	12.5	13.5	RI, MS
6	Limonène	1020	1021	1195	28.1	19.3	16.5	21.5	19.3	12.5	10.4	9.5	RI, MS
7	γ -Terpinène	1047	1049	1237	9.6	11.1	8.6	10.5	11.1	13.1	9.5	6.5	RI, MS
8	Terpinène-4-ol	1161	1162	1583	0.8	1.1	2.1	0.6	0.8	0.5	0.8	1.2	RI, MS
9	Thymol	1266	1269	2189	tr	tr	tr	0.1	28.2	32.5	45.3	40.3	RI, MS
10	Carvacrol	1282	1278	2220	33.2	44.3	46.2	46.5	13.1	9.5	8.6	12.5	RI, MS
11	α -Humulène	1456	1456	1665	0.1	0.1	0.6	0.2	0.2	0.1	tr	0.5	RI, MS
12	γ -Muuroolène	1471	1469	1679	0.2	tr	0.1	0.3	tr	0.1	0.2	0.1	RI, MS
Identification %					98.4	96.8	98.1	98.3	94.1	91.2	95.1	93.4	
Monoterpènes hydrocarbonés					64.1	51.3	49.1	50.6	51.8	48.5	40.2	38.8	
Monoterpènes oxygénés					34.0	45.4	48.3	47.2	42.1	42.5	54.7	54.0	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					0.3	0.1	0.7	0.5	0.2	0.2	0.2	0.6	

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI_a) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a). ^dIndices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RI_p). ^e RI: Indices de rétention; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

Le dendrogramme et le graphique établis à l'aide des deux premiers axes suggèrent qu'il existe deux groupes principaux des huiles de *A. verticillata* (Fig. 3 et Fig. 4). Un groupe comprenant les échantillons des huiles de la zone 1 (Groupe 1) (S1-S4) et un groupe comprenant les échantillons de la zone 2 (groupe 2) (S5-S8). Le groupe 1 a montré des pourcentages différents de leurs composantes, où le carvacrol (isomère du thymol) a été le plus abondant (33.2-46.5%). D'autre part, le groupe II a montré que le thymol avait une abondance qui varie de 28.2 à 45.3% (Tableau 2).

Il ressort de cette étude que le carvacrol est plus abondant dans l'huile essentielle de *A. verticillata* dans les régions à faibles altitudes et un climat humide, alors que le thymol est le constituant le plus abondant dans les régions à hautes altitudes et un climat humide et plus frais. Les deux chémotypes sont représentés dans la figure 5.

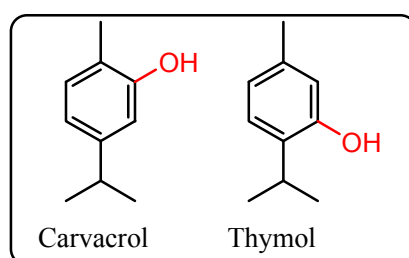


Figure 5 : Structure chimique des deux chémotypes de *A. verticillata*

Les différences observées dans la composition chimique de nos huiles essentielles peuvent être dues à des facteurs écologiques ou à de nombreux autres facteurs comme le type de sol, le stress hydrique et les conditions climatiques. Plusieurs facteurs comme, la situation géographique, l'espèce et l'âge de la plante sont responsables de la variation de la composition chimique des huiles essentielles et du changement des types et des quantités des constituants majeurs. Ainsi, la même espèce/variété est capable de produire des huiles essentielles de compositions différentes [27].

II.2. *Salvia argentea*

II.2.1. Description botanique et travaux antérieurs

Le genre *Salvia* est l'une des herbes les plus célèbres et les plus utilisées au monde avec un nombre d'espèces compris entre 700 et près de 1000 arbustes ou herbacées identifiées à travers le monde. Il existe cinq principales régions de rayonnement de *Salvia*: l'Amérique centrale, l'Amérique du Sud, avec environ 500 espèces; Asie centrale et la Méditerranée avec environ 250 espèces et l'Asie orientale avec environ 90 espèces [83]. Le nom *Salvia* vient du mot latin "Salvare" (signifie : Guérir), qui veut dire sauver, également appelé «Sauga et Sauge» en français puis devenu Sage en lien avec ces précieuses propriétés médicinales [84,85].

La flore Algérienne, compte (23) vingt-trois espèces et sous-espèces de ce genre y compris *Salvia argentea* L., (syn:*S. tmolea* Boiss.) [72]. La Sauge argentée, est une plante herbacée, bisannuelle de la famille des lamiacées, de nom vernaculaire Ferrache-Enneda, elle est originaire de la région méditerranéenne, située au nord-ouest de l'Afrique (Maroc, nord de l'Algérie, Tunisie), le sud d'Europe (Espagne, Portugal, sud d'Italie, Sicile, Malte, Albanie, Bulgarie, Slovénie, Croatie, Bosnie, Kosovo, Monténégro, Serbie, Macédoine et Grèce) et l'extrême ouest de l'Asie (Turquie) [86].

La Sauge argentée (Figure 6) a une large étendue de feuilles basales mesurant 1 m de large et 30 à 60 cm de hauteur. Les feuilles individuelles mesurent 20 à 30 cm de long et 15 cm de large. Les deux surfaces des feuilles sont fortement couvertes de poils soyeux qui lui donnent un aspect laineux [86]. Les feuilles sont douces au toucher, devenant d'abord un blanc argenté distinctif, puis virant au vert-gris après la floraison. Le temps frais en automne rend les feuilles argentées à nouveau [87]. Elle se trouve fréquemment dans les régions tempérées, souvent dans les prairies caillouteuses, les basaltes, les sols volcaniques et les falaises rocheuses [86].



Figure 6: *Salvia argentea* «Ferrache-Enneda» [88]

II.2.2. Travaux antérieurs

Le genre *Salvia* comprend des espèces précieuses utilisées dans les préparations culinaires, la phytothérapie et l'aromathérapie. Les huiles essentielles et les extraits de ces espèces possèdent d'importantes propriétés biologiques notamment les activités antimicrobiennes, antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses [88-96].

La sauge est employée fréquemment dans des mélanges de tisanes, recommandée pour les patients tuberculeux, en particulier pour le traitement de la bronchite aiguë et chronique, et vu leurs activités antimicrobiennes et astringentes, ces extraits entrent souvent dans la constitution des dentifrices [96]. Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées à l'espèce de *S. argentea*., Une bonne activité antioxydante a été démontrée à partir des extraits aqueux et méthanoliques [97-100]. De plus, cette espèce est douée de nombreuses autres activités biologiques à savoir antimicrobiennes, anti-inflammatoires et larvicides [88,99-101].

II.2.3. Lieux de récolte et rendements

Les échantillons de *S. argentea* ont été prélevés dans 6 stations de la région de Ain-Temouchent et Sidi Belabbes. Les résultats ont montré que les rendements en huiles essentielles des racines varient selon la provenance, allant de 0.06 à 0.09% (Tableau 3). Les rendements le plus élevés (0.08-0.09%) ont été observés dans les régions à basse altitude (535-544 m), tandis que les plus faibles (0.06%) ont été observés à haute altitude (820-891 m). L'hydrodistillation des racines de *S. argentea* a donné une huile rougeâtre. Au total, 26 composés ont été identifiés, représentant 91,1% de la composition totale de l'huile.

Tableau 3. Répartition géographique des échantillons de *S. argentea*

Echantillons	Régions	Rendements	Altitudes
S1	Sidi Belabbes (Tanezera) I	0.07	764
S2	Sidi Belabbes (Tanezera) II	0.06	891
S3	Ain Temouchent (Aghlal) I	0.09	535
S4	Ain Temouchent (Aghlal) II	0.08	544
S5	Sidi Belabbes (Sidi Ali Benyoub) I	0.06	820
S6	Sidi Belabbes (Sidi Ali Benyoub) II	0.06	852

II.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *S. argentea*

Les huiles essentielles extraites des parties aériennes et des racines de la plante étudiée ont été analysées par CPG et CPG/SM. Tous les composants ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque «Arômes» produite au laboratoire de Corse (Tableau 4).

L'analyse par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle des parties aériennes de *S. argentea* a permis l'identification de 19 constituants représentant 90.8% de l'huile essentielle totale (Tableau 4). L'huile a été constituée pratiquement par des composés sesquiterpéniques (86.8%).

Les principaux composants sesquiterpéniques oxygénés (74.7%) ont été caractérisés par le germacrène D-4-ol (29.3%), τ -muurolol (18.1%) et le τ -cadinol (13.2%) (Figure 7). Alors que les sesquiterpènes hydrocarbonés (12.1%) ont été représentés par le γ -cadinène (6.5%), germacrène D (1.8%), bicyclogermacrène (1.8%) et α -muurolène (1.5 %) (Tableau 4).

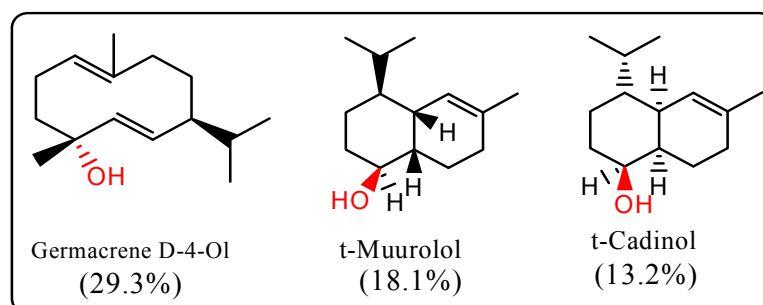


Figure 7: Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile essentielle de *S. argentea*

Les composants, énumérés dans le tableau 4 en fonction de leurs indices de rétention (IR), ont été divisés en six classes sur la base de leurs structures chimiques. En général, l'huile essentielle des racines a été composée principalement par les diterpènes oxygénés (48,3%) et des monoterpènes oxygénés (28.4%), tandis que les diterpènes hydrocarbonés (14.4%) ont été présents en quantités appréciables (10.9%) (Tableau 4).

Table 4. Composition chimique de l'huile essentielle de *S. argentea*

No. ^a	Composés	IR _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	P. aériennes	Racines	Identification ^e
1	α-Pinène	931	932	1023	-	tr	IR,SM
2	Camphène	943	944	1066	-	0,1	IR,SM
3	Sabinène	964	966	1118	-	0,1	IR,SM
4	β-Pinène	970	972	1108	-	tr	IR,SM
5	Limonène	1020	1021	1195	-	0,1	IR,SM
6	Linalool	1078	1075	1280	0,2	3,1	IR,SM
7	Menthone	1134	1135	1456	-	4,5	IR,SM
8	Bornéol	1148	1150	1690	-	1,8	IR,SM
9	α-Terpinéol	1179	1177	1688	-	0,5	IR,SM
10	Pulegone	1213	1216	1640	1,2	17,9	IR,SM
11	Thymol	1266	1259	1648	0,3	-	IR,SM
12	Piperitenone	1315	1313	1900	-	0,5	IR,SM
13	Piperitenone oxyde	1333	1335	1945	-	0,1	IR,SM
14	α-Copaène	1379	1366	1985	0,3	-	IR,SM
15	Trans-3-isopropyl-2-(3-methylcyclopent-2-enyle) tetrahydro furan	1394	1379	2007	2,3	-	IR,SM
16	E-β-Caryophyllene	1424	1418	1583	0,4	0,6	IR,SM
17	Cis-muurolo-4(14),5-diene	1455	1450	2112	0,5	-	IR,SM
18	Germacrene D	1480	1474	1692	1,8	0,3	IR,SM
19	Bicyclogermacrene	1494	1485	1725	1,8	-	IR,SM
20	α-Muurolene	1496	1492	1709	1,5	0,4	IR,SM
21	Cubebol	1509	1502	1823	6,1	-	IR,SM
22	γ-Cadinene	1507	1506	1750	6,5	0,3	IR,SM
23	trans-Calamenene	1512	1510	1810	0,8	tr	IR,SM
24	Spathulenol	1564	1568	2103	-	0,4	IR,SM
25	Germacrene D-4-ol	1573	1566	2156	29,3	-	IR,SM
26	Caryophyllene-oxide	1578	1580	1980	-	0,3	IR,SM
27	Veridiflorol	1591	1579	2144	3,8	-	IR,SM
28	Epi cubenol	1624	1597	2563	0,8	-	IR,SM
29	τ-Cadinol	1627	1627	2111	13,2	-	IR,SM
30	τ-Muurolol	1634	1641	2158	18,1	-	IR,SM
31	14-Hydroxy-δ-cadinene	1789	1780	2530	1,9	0,9	IR,SM
32	Abitatriene	2049	2049	2495	-	10,9	IR,SM
33	(Z)-Phytol	2076	2080	2574	-	1,5	IR,SM
34	(E)-Phytol	2103	2107	2615	-	13,5	IR,SM
35	6,7 Dihydro ferruginol	2208	2207	-	-	11,3	IR, SM
36	cis-Ferruginol	2286	2283	-	-	2,5	IR,SM
37	Ferruginol	2330	2329	2882	-	19,5	IR,SM
Identification %					90,8	91,1	
Monoterpènes hydrocarbonés					-	0,3	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					12.1	1,6	
Monoterpène oxygénés					4.0	28,4	
Sesquiterpènes oxygénés					74.7	1,6	
Diterpènes hydrocarbonés					-	10,9	

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRIa) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). ^d Indices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RIp). ^e RI: Indices de rétention; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique. Réf.: Composés identifiés à l'aide de données de la littérature reportés par Joulain et al., 2001 [37].

Les sesquiterpènes hydrocarbonés (1.6%) et sesquiterpènes oxygénés (1.6%) ont été présents en très faible quantité dans l'huile essentielle des racines. Le ferruginol (19,5%), le pulegone (17,9%), (E)-phytol (13,5%), 6,7 dihydro ferruginol (11,3%) et l'abitatriène (10,9%) ont été les principaux composants de l'huile essentielle de *S. argentea*, suivie de menthone (4.5%), linalol (3.1%) et le cis-ferruginol (2.5%) (Figure8) (Tableau 4).

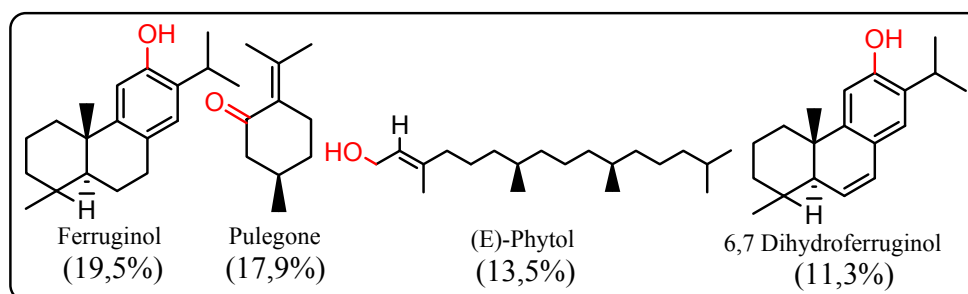


Figure 8: Structures chimiques des composés majoritaires des racines de l'huile essentielle de *S. argentea*

Plusieurs études ont été publiées sur la composition chimique de l'HE des parties aériennes de *S. argentea* cultivée au Maroc, Serbie, Macédoine, Tunisie et en Italie, mais à notre connaissance, aucune étude n'a été portée sur l'espèce Algérienne. Le composé majoritaire de l'huile Macédonienne a été l'oxyde de caryophyllène (37,6%), suivi de l' α -copaène (8,5%), l'époxyde d'humulène II (6,3) et le β -caryophyllène (6,1%) [102]. L'huile de Serbie a été caractérisée par une teneur élevée en composés sesquiterpéniques, tel que le viridiflorol (32,4%), le manool (14,6%), l' α -humulène (10,7%) et β -thujone (7,3%) [103]. Alors que le profil chimique des deux populations tunisiennes été similaire à celui de la Serbie [99]. Bien qu'ils soient plus riches en hydrocarbures monoterpènes (14,5% et 13,5%), les principaux constituants ont été le viridiflorol (26,9% et 18,7%), le manool (6,1% et 13,6%), l' α -thujone (7,3% et 8,1%) et α -humulène (4,1% et 5,3%). Par contre, l'échantillon d'huile obtenu à partir de *S. argentea* du Maroc [104] a été caractérisé par le camphre (45,1%), le camphène (19,4%), l' α -pinène (9,3%),

le bornéol (8.8%) et l' α -thuyone (7.5%). Le profil chimique de la partie aérienne (fleurs, feuilles et tiges) de l'huile essentielle de *S. argentea* de l'Italie s'est révélée être différent de la composition des autres régions étudiées jusqu'à présent. Cette huile a été caractérisée par la dominance du 14-hydroxy- α -humulène (40,1%), suivi par le 1,3,8-p-menthatriène (12,1%), le globulol (7,4%) et le β -sesquiphellandrene (5,8%) [86].

II.3. *Satureja candidissima* (Munby.) Briq.

II.3.1. Description botanique et Travaux antérieurs :

Le genre *Satureja* (sarriette) de la famille des lamiacées, comprend près de 200 espèces d'herbes et d'arbustes, qui sont distribuées beaucoup plus dans les régions méditerranéennes, sud-ouest de l'Asie et d'Amérique nordique [105]. La sarriette est caractérisée par des parties aériennes ayant une odeur et un goût spécifique, de ce fait ces espèces sont utilisées à des fins culinaires [106]. Les espèces de cette famille peuvent être également utilisées comme des plantes ornementales d'où le non «*satureja*» vient du mot latin «*satura*» pot à fleur ou bien «*saturare*» c'est-à-dire nourrir [107].

Satureja candidissima ou bien *Calamintha candidissima* (*Melissa candidissima*) est une plante médicinale et culinaire de la famille des Lamiacée, de nom vernaculaire arabe «Nabta elbida» ou bien «Zaater cheleuh». L'espèce est originaire de l'Algérie, elle se trouve entre les lauriers-roses et les pelouses rocailleuses, elle pousse spontanément à Oran et ses environs [1]. Ainsi dans la région de Ain-Temouchent à Sidi-Safi (lieu de récolte). *S. candidissima* est caractérisée par des feuilles ovales, couvertes sauf dans l'inflorescence d'un épais tomenteux velouté blanchâtre, avec des fleurs de couleur rossée de 8-12 mm de long [72] (figure 9). *S. candidissima* est une plante aromatique d'une odeur agréable très marqué, douce et balsamique.



Figure 9 : *Satureja candidissima* «Nabta elbida»

L'enquête ethnobotanique réalisée sur cette espèce montre que la population locale utilise cette plante en infusion contre la grippe, les problèmes du tube digestif, ainsi comme pansement pour les brûlures et les plaies. Elle est également utilisée en cuisine comme condiment alimentaire ou bien pour préparer un plat traditionnel de la région, nommé «RFISS» [108], ce dernier peut être aussi préparé en additionnant d'autres espèces telles que *S. calamintha nepta* et *Mentha pulegium*.

Des travaux antérieurs réalisés sur le contenu phytochimique des huiles essentielles des espèces de *Saturja* d'origine algérienne ont montré la pulegone (Blida, Tlemcen), menthone (Jijel) et l'oxyde de Piperitone (Annaba) comme composants majoritaires [109,73,110,111]. D'autre part, le contenu phytochimique de l'huile essentielle de *Saturja* des autres origines tel que *S. spinosa* de Turquie a été caractérisée par la présence du linalol [112]. *S. calamintha subsp nepta* du Portugal a montré que l'isomenthone, le 1,8-cinéole et le trans-isopulégone ont été les principaux composés [113].

La composition chimique de l'HE de *S. calamintha* (L) *Scheele* du Maroc a été caractérisée par la prédominance de thymol (34.9%), ρ -cymène (20.9%), de γ -terpinène (18.7%), sans dire que l'huile essentielle de *S. alpina* a été dominée par la présence de pulegone (25.1%), carvone (18%) et l'acétate de thymol (15.3%) [114].

L'examen de la composition chimique des 40 échantillons de l'huile de *S. calamintha* poussant à l'état sauvage en Corse, a permis de déterminer l'existence de trois chémotypes. La moitié des échantillons a été caractérisée par la dominance de menthone et pulegone, tandis que le reste des échantillons a été représenté par le pipéritone et l'oxyde de pipéritone, comme composants majoritaires [115].

Un seul travail rapporte la composition chimique de l'huile essentielle de *S. candidissima* originaire de Ain-Temouchent dans laquelle 12 composés ont été identifiés avec la pulegone (47.62%), menthone (24.50%), terpinen-4-ol (11.63%) et l'isomenthol (2.80%) comme principaux composants [108].

II.3.2. Lieux de récolte et rendements

Les échantillons de *S. candidissima* ont été prélevés dans la région de Sidi Safi (Ain-Temouchent). Les résultats montrent que les rendements en huile essentielle varient de 1.5 à 1.6%. Ce rendement est supérieur à celui donné par A. Attou en 2018[108].

II.3.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *S. candidissima*

Les analyses CPG-IR et CPG-SM de l'huile de *S. candidissima* a permis d'identifier 18 composés représentant 90,6% de l'huile totale. Tous les composants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (IR) et des spectres de masse (MS) avec ceux de la bibliothèque « Arômes », propre au laboratoire de Corse (voir Tableau 5).

L'huile essentielle des parties aériennes de *S. candidissima* a indiqué une prédominance en monoterpènes oxygénés (85.6%) suivie par une faible quantité de monoterpènes hydrocarbonés (3.8%) et des sesquiterpènes hydrocarbonés (3.2%). Les principaux composants de cette huile essentielle ont été la pulegone (70,4%), menthol (5,2%) et l'iso-menthone (4,5%) (Figure 10) (Tableau 5).

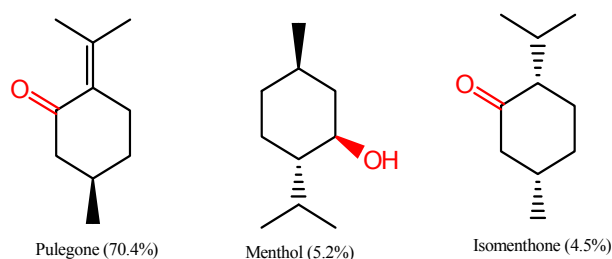


Figure 10: Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile essentielle de *S. candidissima*

Tableau 5. Composition chimique de l'huile essentielle de *S. candidissima*

No. ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	<i>S. candidissima</i>	Identification ^e
1	α-Pinène	931	932	1023	0,8	RI, MS
2	Camphène	943	944	1066	0,9	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	0,3	RI, MS
4	β-Pinène	970	972	1108	0,6	RI, MS
5	(Z)-β-Ocimène	1024	1025	1225	1,1	RI, MS
6	(E)-β-Ocimène	1034	1036	1241	0,1	RI, MS
7	Iso-Menthone	1143	1142	1490	4,5	RI, MS
8	Neo-Menthol	1156	1157	1637	0,6	RI, MS
9	Terpinène-4-ol	1161	1162	1583	2,3	RI, MS
10	Menthol	1164	1163	1629	5,2	RI, MS
11	Iso-Menthol	1174	1173	1660	0,1	RI, MS
12	Pulégone	1213	1216	1640	70,4	RI, MS
13	Piperitenoneoxide	1333	1335	1945	2,5	RI, MS
14	E-β-Caryophyllene	1424	1418	1583	1,5	RI, MS
15	α-Humulène	1456	1456	1665	0,1	RI, MS
16	γ-Muurolene	1471	1469	1679	0,8	RI, MS
17	Germacrene D	1480	1474	1692	0,5	RI, MS
18	α-Muurolene	1496	1492	1709	0,3	RI, MS
Identification %					92,6	
Monoterpène hydrocarbonés					3,8	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					3,2	
Monoterpènes oxygénés					85,6	

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI_a) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a). ^d Indices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RI_p). ^e RI: Indices de rétention; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique. Réf: Composés identifiés à l'aide de données de la littérature reportés par Joulain et al., 2001 [37]

Discussion

Bien que de nombreuses études phytochimiques rapportent la composition chimique de l'huile essentielle de *S. argentea*, aucune étude n'a été effectuée jusqu'à ce jour à fortiori sur l'huile essentielle des racines. Nous avons identifié 19 et 26 constituants représentant, respectivement 90.8% et 91.1% de la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes et des racines. La composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes a été largement dominée par la fraction des sesquiterpènes oxygénées représentant 74.7% de l'huile essentielle. Cette huile constitue une bonne

source de composants sesquiterpéniques oxygénés tels que le germacrene D-4-ol, τ -muurolol et le τ -cadinol. La présence des diterpènes oxygénés tels que le ferruginol, le dihydro ferruginol, le cis-ferruginol et l'abitatriène à des proportions importantes est tout à fait remarquable dans les huiles essentielles des racines. Il est à noter que ces composés sont doués d'un spectre d'activité biologique important notamment une forte activité antioxydante [117,118] et sont carrément absent dans l'huile des parties aérienne. En revanche une seule étude phytochimique a été réalisé sur l'extrait méthanolique des racines de *salvia argentea* et a révélé la présence des diterpènes comme le ferruginol [119]. La composition chimique de l'huile essentielle de *S. argentea* collectée en Algérie s'est révélée très différente de la composition des huiles des autres populations étudiées jusqu'à présent. Les études précédentes ont montré que les huiles essentielles obtenues à partir de *S. argentea* du Maroc ont été caractérisées par le camphre (45,1%) et le camphène (19,4%) [104].

D'autre part, la composition chimique des huiles essentielles de *S. argentea* de différentes régions comme la Macédoine, la Tunisie, la Serbie et l'Italie ont été caractérisée respectivement par l'oxyde de caryphyllène (37,6%), l' α -copaène (8,5%), l'époxyde d'humulène II (6,3%) et le β -caryophyllène (6,1%) [102]; le viridiflorol (18,7-26,9%), le manool (6,1-13,6%) et α -thujone (7,3-8,1%) [99]; le viridiflorol (32,4%), le manool (14,6%) et l' α -humulène (10,7%) [103]; le 14-hydroxy- α -humulène (40,1%), 1, 3,8-p-menthatriène (12,1%), le globulol (7,4%) et le β -sesquiphellandrène (5,8%) [86]. Par rapport aux études rapportées précédemment dans la littérature, la composition chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata* présenté le même profil que celle des autres origines. Le thymol a été signalé comme constituant principal de l'huile en provenance de la Turquie (61,3%), de l'Inde (55,7%), de l'Egypte (41,0%), l'Iran (72.3%)[120-123], et l'ouest algérien (51,6%) [125]. D'autres études réalisées au Maroc, et Turquie ont identifié le carvacrol (44.6%) et le γ -terpinène (55.75%) respectivement comme composés majoritaires [75,124], alors que l'isothymol a été signalé comme constituant principal de l'huile de la région d'Oron [79]. Les études antérieures réalisées sur le contenu phytochimique des huiles essentielles du genre

Satureja originaire de plusieurs pays ont montré une variabilité chimique importante dont les auteurs avancent la présence de la pulegone, menthone, linalol, l'isomenthone et le thymol comme composants majoritaires [109-116]. En Algérie, à notre connaissance, il y a peu d'informations chimiques et biologiques sur l'espèce *S. candidissima*. Le profil chromatographique de notre huile essentielle extraite de l'espèce *S. candidissima* a été caractérisé par la forte présence de pulegone (70,4%), suivi par le menthol (5,2%) et l'iso-menthone (4,5%). Ce contenu est comparable à ceux trouvés par Attou [108] avec quelques différences d'un point de vue quantitatif.

II.4. Composition chimique des mélanges des huiles essentielles de *Salvia argentea*, *Satureja candidissima* et *Ammoides verticillata*.

II.4.1. Introduction

Les huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées en monothérapie, mais elles sont également utilisées en combinaison depuis de nombreuses années et peuvent avoir un effet plus puissant que celles-ci, si elles sont utilisées seules [13]. Les huiles essentielles peuvent être utilisées en synergie pour élargir le spectre de leurs actions et augmenter leurs bénéfices. L'effet synergique possible produit par la combinaison des huiles essentielles de plantes a été qualifié de stratégie efficace de lutte contre le développement des maladies [126-129].

II.4.2. Etude de la composition chimique des mélanges

La composition chimique des mélanges croisés des huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticillata* et de *S. candidissima* a été déterminée par CPG et (CPG/SM) dans un rapport de volume **1:1**. Les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles combinées sont présentés dans le tableau 6. Les principaux composants du mélange des huiles essentielles de *A. verticillata* et *S. argentea* (A.v/S.a) ont été caractérisés par un pourcentage élevé de monoterpènes oxygénés (43.5%) et de monoterpènes hydrocarbonés (33.3%). Les principaux composants de ce mélange ont été le carvacrol (27,9%), limonène (12,7%), pulegon (12,6%) et le p-cymène (12,6%), suivi par des quantités appréciables de γ -terpinène (7,5%), (E)-phytol (5.1%), abietatriène (3.6%) et ferruginol (2.1%).

Tableau 6. Composition chimique des mélanges croisés des huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticillata* et de *S. candidissima*

No. ^a	Composés	Mélange des huiles							Identification ^f
		IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	A.v/S.a	S.a/S.c	A.v/S.c	A.v/S.c/S.a	
1	α-Pinène	931	932	1023	0,1	0,2	0,2	0,9	RI, MS
2	Camphène	943	944	1066	tr	0,3	-	0,4	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	tr	0,3	-	0,3	RI, MS
4	β-Pinène	970	972	1108	tr	0,1	-	0,3	RI, MS
5	Myrcène	976	982	1159	0,4	0,2	-	1,1	RI, MS
6	p-Cymène	1010	1012	1259	12,6	1,2	11,8	9,8	RI, MS
7	Limonène	1020	1021	1195	12,7	1,6	12,2	10,7	RI, MS
8	(Z)-β-Ocimène	1024	1025	1225	-	-	3,8	tr	RI, MS
9	γ-Terpinène	1047	1049	1237	7,5	0,6	2,2	0,1	RI, MS
10	Linalool	1078	1075	1280	tr	-	-	0,3	RI, MS
11	Menthone	1134	1135	1456	1,1	-	-	2,2	RI, MS
12	Iso-Menthone	1143	1142	1490	-	-	0,7	0,1	RI, MS
13	Bornéol	1148	1150	1690	0,2	-	0,5	tr	RI, MS
14	Neo-Menthol	1156	1157	1637	-	-	-	1,1	RI, MS
15	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	0,8	1,3	0,1	1,1	RI, MS
16	Menthol	1164	1163	1629	-	3,8	-	1,2	RI, MS
17	Iso-Menthol	1174	1173	1660	-	-	-	tr	RI, MS
18	α-Terpinéol	1179	1177	1688	0,1	-	-	tr	RI, MS
19	Pulegone	1213	1216	1640	12,6	44,5	33,8	32,1	RI, MS
20	Carvacrol	1282	1278	2220	27,9	-	28,4	19,1	RI, MS
21	Piperitenone	1315	1313	1900	tr	-	0,4	1,3	RI, MS
22	Eugénol	1330	1332	2135	0,8	-	0,5	0,2	RI, MS
23	Piperitenoneoxyde	1333	1335	1945	-	-	0,1	0,2	RI, MS
24	E-β-Caryophyllène	1424	1418	1583	0,3	1,2	0,3	0,8	RI, MS
25	α-Humulène	1456	1456	1665	-	0,1	-	0,1	RI, MS
26	γ-Muuroolène	1471	1469	1679	tr	0,1	-	0,1	RI, MS
27	Germacrène D	1480	1474	1692	tr	0,9	0,3	0,9	RI, MS

28	α -Muuroolène	1496	1492	1709	-	-	-	0,1	RI, MS
29	δ -Cadinène	1516	1515	1748	tr	-	-	tr	RI, MS
30	Spathuléol	1564	1568	2103	tr	-	-	0,1	RI, MS
31	Caryophylleneoxyde	1578	1580	1980	tr	-	-	tr	RI, MS
32	14-Hydroxy- δ -cadinène	1789	1780	2530	0,8	-	-	tr	RI, MS
33	Abitatriène	2049	2049	2495	3,6	6,1	-	2,2	RI, MS
34	(Z)-Phytol	2076	2080	2574	0,1	7,2	-	tr	RI, MS
35	(E)-Phytol	2103	2107	2615	5,1	4,8	-	0,9	RI, MS
36	6,7 Dihydroferruginol	2208	2207	-	3	7,5	-	0,8	RI, MS, Ref
37	cis-Ferruginol	2286	2283	-	0,9	2,1	-	0,5	RI, MS, Ref
38	Ferruginol	2330	2329	2882	2,1	7,3	-	5,6	RI, MS
Identification %					92,7	91,4	95,3	94,6	
Monoterpènes hydrocarbonés					33,3	4,5	30,2	23,6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					0,3	2,3	0,6	2,0	
Monoterpène oxygénés					43,5	49,6	64,5	58,9	
Sesquiterpènes oxygénés					0,8	-	-	0,1	
Diterpènes hydrocarbonés					3,6	6,1	-	2,2	
Diterpènes oxygénés					11,2	28,9	-	7,8	

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRIa) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). ^dIndices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RIp); ^eA.v/S.a.: mélange d'*A. verticulata* et *S. argentea* (1:1); S.a/S.c: mélange de *S. Argentea* et *S. candidissima* (1:1); A.v/S.c: mélange d'*A. verticulata* et *S. Candidissima* (1:1); A.v/S.c/S.a: mélange de *S. argentea*, *A. verticulata* et *S. Candidissima* (1:1); ^fRI: Indices de rétention; SM: Spectrométrie de Masse en mode impact électronique; Réf: Composés identifiés à l'aide de données de la littérature reportés par König et al., 2001 [37].

Le mélange des huiles essentielles de *S. argentea* et de *S. candidissima* (S.a/S.c) a été caractérisé principalement par un pourcentage élevé de monoterpènes oxygénés (49.6%) et des diterpènes oxygénés (28.9%). Ce mélange a été caractérisé par un pourcentage élevé de pulegone (41,3%), 6,7 dihydro ferruginol (7,5%), ferruginol (7,3%), (Z)-phytol (7,2%) et l'abitatriène (6,1%). Cependant, le menthol (3.8%), (E)-phytol (4.8%), le cis-ferruginol (2.1%) ont été présents en faible quantité.

D'autre part, les constituants chimiques les plus importants du mélange des huiles essentielles de *A. verticulata* et de *S. candidissima* ont été la pulegone (33,8%), carvacrol (28,4%), limonène (12,2%) et le p-cymène (11,8%). Alors que le mélange des trois huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et de *S. candidissima* (A.V/S.A/S.C) a été caractérisé par une grande quantité de monoterpènes oxygénés (58.9%), suivi par les monoterpènes hydrocarbonés (23.6%) et des diterpènes oxygénés (7.8%).

Les principaux constituants de ce mélange ont été la pulegone (32,1%), carvacrol (19,1%), limonène (10,7%) et le p-cymène (9,8%), suivis d'une quantité appréciable de ferruginol (5,6%), abitatriène (2.2%) et de menthone (2.2%) (Figure 11).

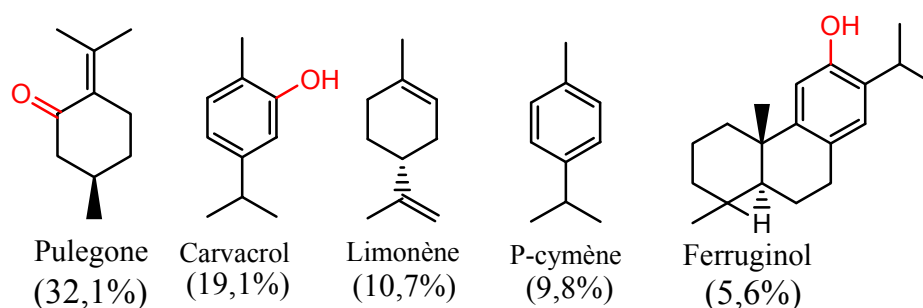


Figure 11: Composés majoritaires du mélange de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima*

Chapitre II

Partie B

***Etude de la composition chimique des huiles
essentielles individuelles et des mélanges de deux
Lamiacées et une Astéracée :***

***Thymus fontanesii, Rosmarinus officinalis
et Artemisia herba-alba***

Introduction

Afin poursuivre notre investigation sur la valorisation des huiles essentielles, de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à la composition chimique des huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* et *Rosmarinus officinalis*, ainsi qu'à leurs fractions oxygénées. C'est pourquoi, nous avons mis en œuvre l'association de la CPG et le couplage CPG-SM ainsi qu'une technique de séparation : la chromatographie sur colonne.

II.5. *Rosmarinus officinalis*

II.5.1. Description botanique et travaux antérieurs

Le romarin ou le genre *Rosmarinus* de nom vernaculaire arabe Iklil eldjebel, est l'un des plus anciens remèdes connus également en Algérie. *R. officinalis* (Figure 12) fait partie de la famille des labiées ; c'est l'une des plantes les plus populaires en Algérie. On la trouve dans tous les jardins et les parcs [130,131]. C'est une plante originaire du bassin méditerranéen (faible altitude) et pousse spontanément dans le sud de l'Europe [132].

Le Romarin est un arbrisseau touffu, vert, très aromatique, d'environ 1m ou plus de hauteur, à tiges ligneuses avec des feuilles persistantes sessiles, opposées, étroites et coriaces. Les fleurs d'un bleu pâle, maculée intérieurement de violet, sont groupées en grappes courtes. Ces inflorescences spiciformes portent presque tout au long de l'année des fleurs [131,132].



Figure12 : *Rosmarinus officinalis* L.

Le romarin est l'une des herbes culinaires très utilisées pour leur arôme caractéristique dans la cuisine. Il est également employé comme tisane et comme agent antioxydant naturel pour la conservation des aliments. Son histoire thérapeutique est très diversifiée et connue depuis longtemps dans les médications traditionnelles. C'est une source riche en molécules bioactifs tels que l'acide carnosique, l'acide caféique et ses dérivés notamment l'acide rosmarinique, celui-ci montre un large éventail d'activités biologiques, il est connu comme antioxydant, antiviral, antibactérien et antimutagène [133,134]. Ce composé pourrait également être utilisé comme un traitement contre la maladie d'Alzheimer [135]. D'ailleurs l'acide carnosique et son dérivé hydroxylé oxydatif carnosol, ont montré des effets anti-inflammatoires et antimoraux [136]. L'importance de cette plante ainsi que son huile essentielle dans la médecine traditionnelle a été vérifiée dans de nombreuses recherches et révéler des effets biologiques puissants notamment comme antimicrobienne, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antioxydante, anti-ulcère, antispasmodique et antiseptique [131,137-143].

II.5.2. Lieux de récolte et Rendement

Le matériel végétal a été collecté au plateau de Lala Seti (Parc national de Tlemcen). Les huiles essentielles de couleur jaune pâle ont été obtenues à partir des parties aériennes par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger avec des rendements variant de 0,3 à 0,4% (m/m). En comparant nos résultats avec ceux rapportés précédemment, nous avons remarqué que nos échantillons possèdent des rendements en huiles essentielles inférieurs à ceux rapportés dans la littérature [131,144-147].

II.5.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

La composition chimique des constituants volatils de l'huile essentielle de *R. officinalis* récolté dans la région de Tlemcen est présentée dans le tableau 7. Les résultats de la composition chimique obtenus par l'analyse chromatographique (CPG/SM) de la partie aérienne de *R. officinalis*, montrent que l'huile essentielle a été constituée de 19 composants chimiques. Celle-ci a été caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oxygénés représentant 65.9% de la composition totale de l'huile. Le 1.8-cineole (18.3%), le camphre

(15.4%), le α -pinène (12.8%), le borneol (12.7%) et le verbenone (12.7%) ont été les principaux composés présents, suivis par une faible quantité de terpinen-4-ol (1.2%) (Tableau 7 et Figure13).

Tableau7:Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis*

No ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	L'huile essentielle	
					<i>R. officinalis</i>	Identification ^e
1	α -Pinene	936	931	1028	12.8	RI. MS
2	Camphene	950	945	1071	0.2	RI. MS
3	β -Pinene	978	972	1113	0.2	RI. MS
4	Myrcenes	987	982	1160	0.1	RI. MS
5	α -Phellandrene	1002	999	1161	0.2	RI. MS
6	<i>p</i> -Cymene	1015	1015	1270	1.5	RI. MS
7	1.8-Cineole	1024	1021	1211	18.3	RI. MS
8	Limonene	1039	1031	1967	4.2	RI. MS
9	γ -Terpinene	1051	1050	1245	3.8	RI. MS
10	α -Pinocarvone	1135	1139	1632	1.4	RI. MS
11	Camphre	1144	1145	1532	15.4	RI. MS
12	Borneol	1148	1150	1688	12.7	RI. MS
13	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1.2	RI. MS
14	α -Terpineol	1176	1176	1690	1.6	RI. MS
15	Verbenone	1183	1184	1723	12.7	RI. MS
16	Bornylacetate	1285	1280	1600	2.6	RI. MS
17	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1421	1416	1591	0.2	RI. MS
18	α -Humulene	1455	1448	1668	0.6	RI. MS
19	oxyde de Caryophyllene	1578	1567	1969	1.4	RI. MS
Identification %					91.1	
Monoterpènes hydrocarbonés %					21.5	
Sesquiterpènes hydrocarbonés %					0.8	
Monoterpène oxygénés %					65.9	
Sesquiterpènes oxygénés%					1.4	
Composés aromatiques %					1.5	

tr. trace.^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI_a) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a).^d Indices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RI_p).^e RI: Indices de rétention;SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

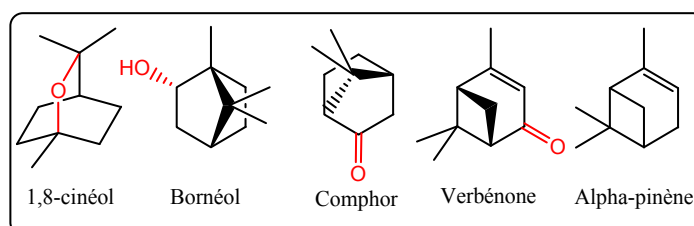


Figure13: Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'HE de *R. officinalis*

Les monoterpènes hydrocarbonés (21.5%) ont été représentés majoritairement par l' α -pinène (12.8%), tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés ont été présents en faible quantité (0.8%) (Tableau 7).

Par rapport aux résultats obtenus, l'analyse chimique des constituants volatils de l'huile de *R. officinalis* cultivée dans la région de Tlemcen (Honaine) [130] a révélé que l' α -pinène (23.1%) été le composé majoritaire, avec quelques différences d'un point de vue quantitatif. Ainsi de nombreux chémotypes ont été signalés et répertoriés par Lawrence [131] à savoir :

- Cinéole supérieur à 40% (Maroc, Tunisie, Turquie, Grèce, Yougoslavie, Italie, France)
- α -Pinène, 1,8-cinéole et le camphre en proportions voisines (Espagne, France, Italie, Grèce, Bulgarie)
- Myrcène à une teneur élevée (Espagne, Portugal, Argentine),
- Camphre, cinéole, bornéol (Cuba)
- Cinéole, bornéol, p-cymène (Turquie)
- α -Pinène, verbénone, acétate de bornyle (Corse, Sardaigne).

En ce qui concerne l'huile essentielle de romarin des différentes régions de notre pays a également révélé l'existence des différents chémotypes. Le romarin de la région de Tébessa de l'Est algérien a montré le chémotype 1,8-cinéole avec des pourcentages variant de 32.6% à 72.9% [148]. Le romarin de Bibans (Alger) a montré que le composé majoritaire été le 1,8-cinéole (52.4%), suivi du camphre (12.6%) [149], alors que la composition chimique des huiles de romarin de 5 stations de l'Est algérien a été dominée par le camphre (42.7%) [150]. Or, l'huile essentielle de la région de Tlemcen, a montré l' α -pinène (23.1%) comme un chémotype, suivi par le camphre (15.3%) et le β -pinène (12.2%) [131]. L' α -pinène a été le principal composé de l'huile de Corse et de la Sardaigne [147].

Les variations, rencontrées dans la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif de nos échantillons comparés à certains travaux antérieurs, peuvent être dues à certains facteurs écologiques tel que le climat, le sol et l'origine géographique, la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, à des facteurs intrinsèques (génétiques, sous-espèces), ou même à la méthode d'extraction [27].

II.6. *Thymus fontanesii*

II.6.1. Description botanique et travaux antérieurs

Le thym ou le genre *Thymus*, est l'un des genres les plus diversifiés de la famille des lamiacées, il comprend près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerrané [151]. En effet, ce genre de plante est très répandu dans les régions ensoleillées du bassin méditerranéen à climats tropicaux, en plaine ou en montagne, dans les rocailles, les garrigues, les pelouses ou les broussailles. Vu leur propriétés aromatiques et médicinales, le thym est considéré comme l'une des plantes les plus populaires dans le monde dont la majorité de ses espèces sont utilisées à des fins diverses : aliments, médicaments, parfums et produits cosmétiques. Il est habituellement utilisé sous forme de tisane et comme condiment ou épice [152].

Les huiles essentielles de thym sont assez utilisées comme agents antiseptiques dans différents domaines pharmaceutiques et comme aromatisants pour plusieurs types de produits alimentaires [153]. La composition chimique de l'huile de plusieurs espèces de thym a été étudiée pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques [154-90]. La région méditerranéenne a été considérée comme le centre de ce genre [152] où la flore Algérienne, compte une variété importante d'espèces de ce genre, parmi lesquelles on peut citer; *T. pallescens*, *T. capitatus*, *T. commutatus*, *T. algériensis*, *T. vulgaris*, *T. piperella*, *T. capitatus*, *T. fontanessi*...etc.

T. fontanesii est une plante vivace fortement aromatique appartenant à la famille des lamiacées. Elle est particulièrement abondante en Algérie et en Tunisie [72]. Elle est communément appelée «Zaater», c'est une plante qui se trouve à l'état spontané sous forme d'un petit sous-arbrisseau très ramifié à la base et très feuillue de 10-12 cm de haut, à tiges dressées et robustes et à fleurs blanches ou pales [72,158] (Figure 14).



Figure14 : *Thymus fontanesii*

Le thym est très utilisé par les populations locales pour ses vertus médicinales [158]. Il est souvent utilisé dans la médecine traditionnelle contre les maladies respiratoires, tels que l'asthme, la toux et la bronchite, ainsi que contre les maux de dents et l'infection des voies urinaires. La plante entière est aussi connue pour ses propriétés antispasmodiques et carminatifs [159]. Cette espèce est très commercialisée dans le marché algérien comme un condiment alimentaire, à la fois pour guérir certaines maladies et aromatiser les sauces, les légumes et plusieurs plats traditionnels. De nombreuses propriétés biologiques ont été attribuées pour l'HE de cette plante notamment l'activité antioxydante, antibactérienne, antimicrobienne, et anti-inflammatoire [160-163, 11].

II.6.2. Lieux de récolte et Rendements

Le matériel végétal a été collecté à Sebdou (Tlemcen). L'HE est d'une odeur aromatique, fortement piquante et de couleur jaune sombre. L'huile a été obtenue à partir des parties aériennes par hydrodistillation. Les rendements varient entre 3.2 à 3.9% (m/m). Ces rendements ont été supérieurs à ceux trouvés dans la littérature [158-160] et inférieurs à ceux cités par N. Nabet et al et C. Bekhechiet al [161,162].

II.6.3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes

L'HE de *T. fontanesii* a été analysé par CPG et CPG/SM. Un total de 31 composés, représentant 99.3% de l'huile essentielle totale, a été identifié par leurs indices de rétention et leurs données spectrales de masse.

Tableau8.Composition chimique de l'huile essentielle de *T. Fontanesii*

No ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Huile essentielle	
					<i>T. fantenezii</i>	Identification ^e
1	α -Thujène	932	924	1028	0.2	RI. MS
2	α -Pinène	936	931	1028	0.9	RI. MS
3	Camphène	950	945	1071	0.2	RI. MS
4	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0.5	RI. MS
5	β -Pinène	978	972	1113	0.1	RI. MS
6	Myrcènes	987	982	1160	2.1	RI. MS
7	α -Phellandrène	1002	999	1161	0.2	RI. MS
8	3-Carene	1005	1006	1149	0.1	RI. MS
9	α -Terpinène	1008	1011	1270	1.7	RI. MS
10	<i>p</i> -Cymène	1015	1015	1270	7.4	RI. MS
11	(<i>Z</i>)- β -Ocimène	1029	1022	1234	0.6	RI. MS
12	γ -Terpinène	1051	1050	1245	2.3	RI. MS
13	trans-Sabinène hydrate	1051	1054	1445	0.1	RI. MS
14	Terpinolène	1082	1079	1281	0.2	RI. MS
15	Linalool	1083	1085	1538	1.7	RI. MS
16	Camphor	1123	1124	1506	0.1	RI. MS
17	Bornéol	1148	1150	1688	0.3	RI. MS
18	Terpinèn-4-ol	1164	1162	1591	1.1	RI. MS
19	α -Terpinéol	1176	1176	1690	0.1	RI. MS
20	Thymol	1266	1263	2181	76.6	RI. MS
21	Carvacrol	1278	1286	2193	0.6	RI. MS
22	Eugénol	1330	1329	2164	0.1	RI. MS
23	cis-Carvylacétate	1343	1345	1858	0.1	RI. MS
24	(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1421	1416	1591	1.6	RI. MS
25	(<i>E</i>)- α -Bergamotène	1434	1435	1573	tr	RI. MS
26	α -Humulène	1455	1448	1668	0.1	RI. MS
27	γ -Humulène	1483	1480	1702	tr	RI. MS
28	β -Bisabolène	1503	1499	1721	0.1	RI. MS
29	δ -Cadinène	1520	1511	1760	tr	RI. MS
30	(<i>E</i>)- α -Bisabolne	1530	1531	1755	0.1	RI. MS
31	oxide de Caryophyllène	1578	1567	1969	0.1	RI. MS
Identification %					99.3	
Monoterpènes hydrocarbonés %					8.6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés %					1.9	
Monoterpène oxygénés %					3.6	
Sesquiterpènes oxygénés %					0.1	
Composés oxygénés non terpénique %					0.5	
Composés aromatiques %					84.7	

tr. trace.^a L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI_a) reportés par König et coll[26]. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a). ^d Indices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RI_p).^e RI: Indices de rétention;SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *T. fantenesii* a montré une prédominance des composés aromatiques (84.7%) et des monoterpènes

hydrocarbonés (8.6%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés ont été respectivement présents avec des pourcentages de 1.9% et 0.1% (Tableau 8). Le thymol (76.6 %) et le p-cymène (7.4%) sont les principaux composants. Les structures chimiques de ces deux composés sont présentées dans la figure 15.

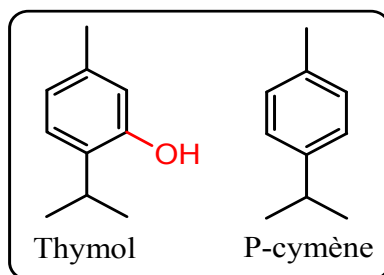


Figure15: Structures chimiques des composés majoritaires de la partie aérienne de l'HE de *T. fantenesii*

Les recherches effectuées sur la composition chimique de cette plante ont montré la présence de deux chémotypes. Les résultats d'une étude sur la composition chimique de l'huile de *T. fontanesii* dans différentes régions de la willaya de Tlemcen ont montré que le composé majoritaire de l'huile a été le carvacrol avec un pourcentage variant de 67% à 69.5% [162]. Le même composé majoritaire a été mentionné dans la recherche de Nabet et al [94] avec un pourcentage de carvacrol de 67.5%. Ghannadi et al, [159], ont pu identifier 15 composés dans l'huile essentielle de la partie aérienne de *T. fontanesii* de la région de Sétif. Le thymol (67.8%) a été le composant majoritaire, suivi de γ -terpinene (15.9%) et p-cymene (13.0%). Le thymol a été aussi le composé majoritaire dans l'huile de la région de Djelfa mais avec un pourcentage moins important (29.3%) [160] et à Bouira avec un pourcentage de 77.7% [164].

Des études antérieures sur la composition chimique de l'huile essentielle des espèces de genre thym tels que *T. vulgaris*, *T. numidicus*, et *T. ciliatus*; ont confirmé la prédominance de thymol [154, 155, 165,166].

II.7. *Artemisia herba-alba*

II.7.1. Description botanique et travaux antérieurs

L'armoise ou *Artemisia* est considéré parmi les plus largement distribués des genres de la famille des Astéracées, elle comprend plus de 300 petites herbes et arbustes [167,168] réparties sur les cinq continents. L'industrie pharmaceutique à exploité plusieurs molécules extraites des différentes armoises telles que les thujones, l'artémisinine et la verlotorine. En Algérie, ce genre est représenté par 11 espèces spontanées y compris l'armoise blanche [72,168]. L'armoise blanche ou *Artemisia herba-alba* (subgen. *Seriphidium*, famille d'Asteraceae), communément appelé «Chih», c'est une plante vivace steppique qui pousse spontanément dans les régions semi-aride et les steppes arides de l'Afrique du nord, du nord-ouest de l'Himalaya, et au Moyen-Orient ainsi qu'en Espagne [168,169]. Elle est très répandue dans les zones désertiques, elle s'adapte bien à un climat sec et chaud. Cette espèce joue un rôle fondamental dans la structure et le fonctionnement de l'écosystème steppique.

L'armoise blanche se présente sous forme d'un sous-arbrisseau buissonnant à tiges ligneuses très ramifiées, de 30 à 80 cm de haut, très feuillée avec un aspect argenté et les fleurs sont de couleur jaune à rougeâtre groupées en grappes [72,169] (Figure 16).



Figure 16. *Artemisia herba-alba* [169] «Chih »

L'armoise blanche a été utilisée comme aromatisant dans le thé et le café, C'est une panacée dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane [169]. En médecine populaire, *Artemisia herba-alba* est connue pour ses propriétés diurétiques, vermifuge, antispasmodiques, antiseptiques. Elle est utilisée pour guérir certaines maladies, y compris le diabète, la bronchite, l'abcès, l'hypertension, les troubles intestinaux, les morsures de scorpion, et les infections parasites. En outre, l'armoise blanche est utilisée sous forme de tisane comme un remède pour calmer les douleurs abdominales [169-173].

L'efficacité de l'armoise blanche a été vérifiée dans plusieurs enquêtes ethnopharmacologie où des études phytopharmacologiques menées dans différentes régions du monde montrent que cette espèce est dotée d'effets thérapeutiques intenses tels que antidiabétique, antioxydant, antimicrobien, anti-acétylcholinestérase, antimutagène et insecticide [173-178]

II.7.2. Rendements des huiles essentielles

Le matériel végétal a été collecté à El Gor, Sebdou dans la wilaya de Tlemcen. Les huiles essentielles de couleur jaunâtre ont été obtenues à partir des parties aériennes par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger avec un rendement de 0.8% (m/m). Ce rendement est comparable avec les travaux réalisés dans les différentes région de l'Algérie ainsi que d'autres pays tels que la Tunisie et l'Espagne [168,103,169,23,179,180].

II.7.1. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *A. herba-alba*

L'huile essentielle d'*A. herba-alba* a été analysé par CPG et CPG/SM. Vingt constituants (20), représentant environ 93.4 % de la composition totale ont été identifiés (Tableau 9). Cette huile été caractérisée par un taux élevé en monoterpènes oxygénés (80.2%), suivie par les hydrocarbures monoterpéniques (10.8%).

Tableau 9. Composition chimique des huiles essentielles de *A. herba-alba*

No ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Huile essentielle	
					<i>A. herba-alba</i>	Identification ^e
1	α -Pinène	936	931	1028	0.3	RI. MS
2	Camphene	950	945	1071	10.3	RI. MS
3	1.8-Cineole	1024	1021	1211	8.4	RI. MS
4	γ -Terpinène	1051	1050	1245	0.2	RI. MS
5	trans-Sabinène hydrate	1051	1054	1445	0.1	RI. MS
6	Linalool	1083	1085	1538	0.5	RI. MS
7	Chrysanthénone	1110	1106	1504	25.6	RI. MS
8	Camphor	1123	1124	1506	32.3	RI. MS
9	Bornéol	1148	1150	1688	4.5	RI. MS
10	Terpinèn-4-ol	1164	1162	1591	3.2	RI. MS
11	α -Terpinéol	1176	1176	1690	2.1	RI. MS
12	Carvone	1214	1215	1278	3.5	RI. MS
13	(<i>E</i>)- α -Bergamotène	1434	1435	1573	0.1	RI. MS
14	α -Humulène	1455	1448	1668	0.1	RI. MS
15	γ -Humulène	1483	1480	1702	0.1	RI. MS
16	β -Bisabolène	1503	1499	1721	0.2	RI. MS
17	δ -Cadinène	1520	1511	1760	0.5	RI. MS
18	(<i>E</i>)- α -Bisabolne	1530	1531	1755	0.3	RI. MS
19	Spathuléol	1572	1560	2120	0.5	RI. MS
20	Globulol	1589	1578	2067	0.6	RI. MS
Identification %					93.4	
Monoterpènes hydrocarbonés%					10.8	
Sesquiterpènes hydrocarbonés %					1.3	
Monoterpène oxygénés %					80.2	
Sesquiterpènes oxygénés%					1.1	

^a L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^bIndices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI_a) reportés par König et coll. ^cIndices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a). ^d Indices de rétention sur colonne polaire Rtx -wax (RI_p). ^e RI: Indices de rétention; SM : Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

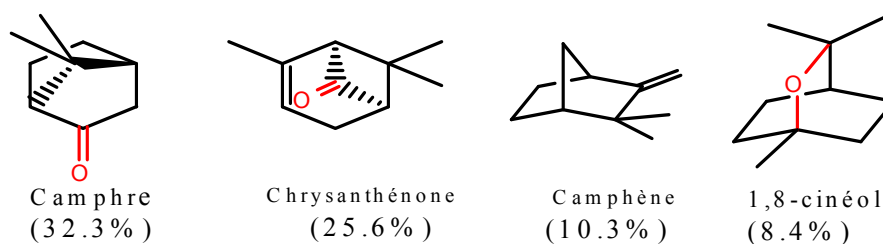


Figure 17: Structures chimiques des composés majoritaires des parties aériennes de l'huile de *A. herba-alba*

Les hydrocarbures sesquiterpéniques (1.3%), et les sesquiterpènes oxygénés (1.1%) ont été présents en faibles quantités. Les principaux composants ont été le camphre (32.3%) et le chrysanthénone (25.6%), suivis

du camphène (10.3%), le 1,8-cinéole (8.4%), le bornéol (4.5%), la carvone (3.5%) et le terpinen-4-ol (3.2%) (Tableau 9, figure 15).

Les résultats de la composition chimique de nos échantillons ont été comparables qualitativement, à ceux obtenus précédemment avec un pourcentage de camphre variant de 15% à 59.8% [179,181-183]

Le profil chimique de l'huile essentielle de cette espèce Algérienne diffère d'une région à une autre; la composition chimique de *A. herba-alba* de Biskra a montré divers composants dominés par l'acétate cis-chrysanthényle (25.1%), alors que celle de Djelfa a révélé la Davanone comme composant principal (36.1%), par ailleurs l' α -thujone constitue le chymotype de la région de Laghouat (66.7%), Ghardaia (47.1%), Biskra (31.5%) et Bordj Bou-Argeridj (54.5%)[23]. Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de la composition chimique de *A. herba-alba* à travers le monde, et ont révélés un haut niveau de polymorphisme [23,178,179]. Ces variations qualitatives et quantitatives peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à des facteurs intrinsèques, ou même à la méthode d'extraction [27].

- le camphre a été signalé comme composant majoritaire en Algérie, en Maroc et en Espagne [179,183].

- Les principaux composants de l'huile de l'armoise blanche de l'Arabie Saudia ont été la piperitone, le (E)-éthylcinnamate, le (Z)-éthylcinnamate, le thymol et l'isoprène [178].

- α -Thujone (16,2%) a été enregistrée comme composé majoritaire en Jordanie (16%) [120], au Maroc [179], ainsi que dans quatre stations différentes de l'Algérie [185].

La composition chimique de l'huile essentielle de *A. herba alba* de Tunisie a été dominée par le β -thujone (41.9%) [173]. L'huile de sud de l'Espagne a révélé différents chénotypes représentés par la davanone, la chrysanthenone, le cis-chrysanthenol, le cis-chrysanthényle acétate et le 1,8-cinéol [186], ce dernier a été signalé comme composé dominant de l'huile essentielle de l'Egypte [177].

II.8. Fractionnement et isolement de la fraction oxygénée de l'huile essentielle de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis*

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés aux fractions oxygénées des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis* afin d'étudier l'approche complémentaire qui permet de lier le domaine de la biologie à la chimie, en d'autres termes, de déterminer leur pouvoir antioxydant et antimicrobien. Nous avons soumis 2g de chaque huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte à gel de silice fine avec du pentane puis de l'éther d'éthylique comme éluant. Le schéma du fractionnement est donné sur la figure 10. Les fractions oxygénées sont récupérées et analysées dans le but d'identifier leurs profils chimiques et par la suite l'évaluation des activités biologiques.

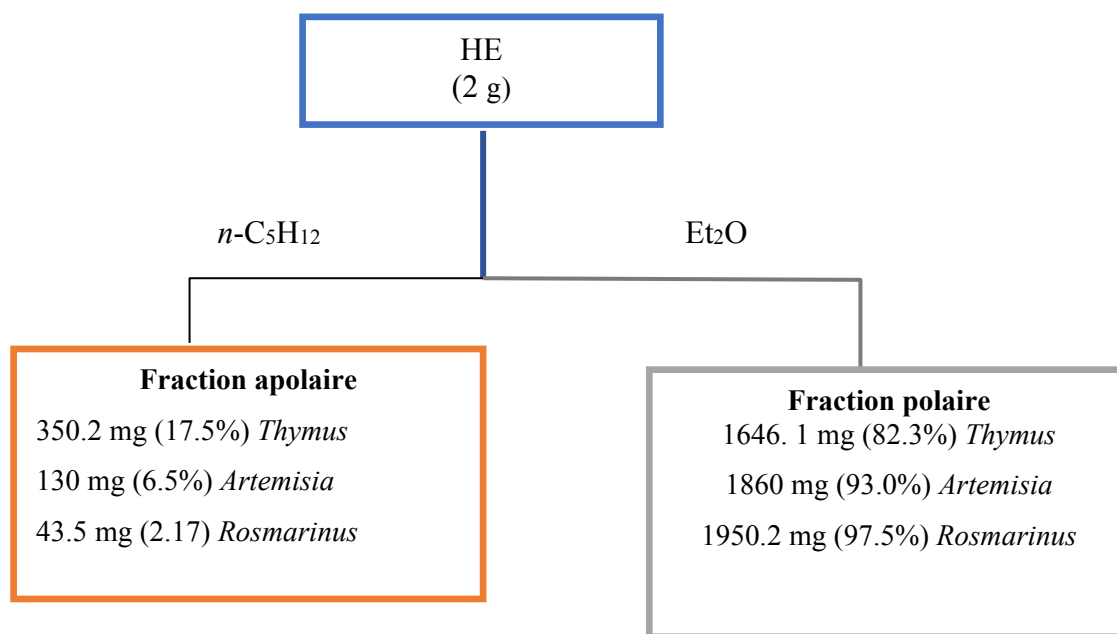


Figure 18. Schéma de fractionnement des huiles essentielles

II.8.1. Composition chimique des fractions oxygénées de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis*

L'analyse des fractions oxygénées des trois huiles essentielles de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis* a conduit respectivement à l'identification de 9, 7 et 14 constituants (Tableau 11). La fraction oxygénée (1646.1 mg) de l'huile de *T. fontanesii* analysée par CPG et CPG-SM a permis

l'identification de 2 composés supplémentaires par rapport à l'huile essentielle : (E)-2-héxanal et décanal

Tableau 10. Composition chimique de fractions oxygénées des trois huiles essentielles

No	Composés	IR _{apoliitt}	IR _{apol}	IR _{pol}	<i>T.</i> <i>fontanesii</i>	<i>A.</i> <i>herba-</i> <i>alba</i>	<i>R.</i> <i>officinalis</i>	Identification
1	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0,5	-	-	RI, MS
2	(E)-2-Héxanal	762	768	1216	1,2	-	-	RI, MS
3	1,8-Cineole	1024	1021	1211	-	13,8	46,2	RI, MS
4	trans-Sabinène hydrate	1051	1054	1445	-	0,8	-	RI, MS
5	Linalool	1083	1085	1538	1,7	1,2	-	RI, MS
6	Chrysanthénone	1110	1106	1504	-	33,8	-	RI, MS
7	Camphre	1123	1124	1506	-	40,2	17,1	RI, MS
8	α -pinocarvone	1135	1139	1632	-	-	1,4	RI, MS
10	Bornéol	1148	1150	1688	-	-	5,2	RI, MS
11	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	3,2	-	6,5	RI, MS
12	α -Terpinéol	1176	1176	1690	0,6	-	-	RI, MS
13	<i>trans</i> -dihydro Carvone	1180	1182	1607	-	2,1	-	RI, MS
14	Verbénone	1183	1184	1723	-	-	3,7	RI, MS
15	Décanal	1195	1201	1795	1,8	-	-	RI, MS
16	Carvone	1214	1215	1278	-	0,1	-	RI, MS
17	<i>trans</i> -Myrtanol	1241	1242	1859	-	-	0,6	RI, MS
18	Thymol	1266	1263	2181	84,3	-	0,6	RI, MS
19	Acétate de bornyl	1285	1280	1600	-	-	8,2	RI, MS
20	Eugénol	1330	1329	2164	2,1	-	0,5	RI, MS
21	cis-Carvyl acétate	1343	1345	1858	-	-	0,2	RI, MS
22	Spathuléol	1572	1560	2120	-	-	0,3	RI, MS
23	Globulol	1589	1578	2067	-	-	0,3	RI, MS
24	Oxyde de Caryophyllène	1578	1567	1969	1,3	-	1,4	RI, MS
Identification %					96,7	92	92,2	

D'autre part, sept composants supplémentaires ont été identifiés dans la fraction oxygénée (1950.2 mg) de l'huile essentielle de *R. officinalis*, il s'agit du trans-myrtanol, du thymol, de l'acétate de bornyl, de l'eugénol, du cis-carvyl acétate, du spathuléol et du globulol (Tableau 11). Enfin, un composé supplémentaire a été trouvé dans la fraction oxygénée (1860 mg) de l'huile de *A. herba-alba*, il s'agit du trans-dihydro carvone.

Chapitre III
Evaluation Des Activités
Biologiques

III.1. Evaluation des activités antioxydantes des huiles essentielles individuelles et croisées des plantes

III.1.1. Introduction

Les huiles essentielles ont été utilisées pendant des millénaires pour leurs bienfaits pour la santé. Certaines des propriétés bénéfiques supposées, par exemple, antiseptique, antioxydante, antimicrobiennes et anti-inflammatoire, ont été soutenues par des recherches scientifiques récentes [7-11,187]. D'autre part, plusieurs huiles essentielles possèdent de bonnes propriétés antioxydantes, qui peuvent être exploitées pour protéger d'autres matériaux, tels que les aliments et leur rancissement [188-190]. Ces attributs sont dus à la capacité inhérente de certains de leurs composants, en particulier les phénols.

Cependant, il existe des huiles essentielles non phénoliques qui expriment un comportement antioxydant, ceci est dû à la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et d'autres constituants volatils.

La recherche d'antioxydants naturels avec la vertu d'être non toxique a donné lieu à un grand nombre d'études sur le potentiel antioxydant des huiles essentielles. Ceci est particulièrement pertinent car la plupart des antioxydants synthétiques courants tels que l'hydroxy anisole butylé (BHA) ou le butyle hydroxy toluène (BHT) sont soupçonnés d'être potentiellement dangereux à long terme pour la santé humaine [1,51,52].

D'autre part, les huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées en monothérapie, mais en combinaison depuis de nombreuses années [13]. Elles sont utilisées pour agir en synergie afin d'améliorer leurs effets. L'effet synergique possible produit par la combinaison des huiles essentielles de plantes a été qualifié de stratégie efficace pour lutter contre le développement microbien [127,128,191] et inhiber ou réduire le processus naturel d'oxydation des aliments [192].

III.1.2. Activités antioxydantes

A notre connaissance, aucun travail relatif aux activités antioxydantes des mélanges croisés des huiles essentielles des plantes étudiées n'a été rapporté dans la littérature. Il s'agit dans ce travail d'étudier les propriétés antioxydantes des huiles essentielles individuelles et croisées de *S. argentea*, *S. candidissima*, *A. verticilatta*, *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba* à l'aide de deux méthodes différentes : l'activité de piégeage radicalaire (DPPH) et le pouvoir réducteur (FRAP).

III.1.3. Matrice individuelle des huiles essentielles par la méthode de DPPH

L'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes étudiées, leurs mélanges et des antioxydants standards vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH^{*}) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires. Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque résultat a été calculé et les essais ont été réalisés en triplicata.

Les tests ont montré que les huiles essentielles de *T. fontanesii* et *R. officinalis* ont respectivement la capacité de réduire le radical DPPH^{*} à 72.1% et 62.4% lorsqu'on les utilise à des faibles concentrations (de l'ordre de 20 et 30 mg/ml respectivement) (Tableau 11). En revanche, l'huile essentielle de *A. herba alba* nécessite d'être employée à des concentrations plus élevées (90 mg/ml) pour obtenir un pourcentage d'inhibition de 50.4% (Tableau 11).

L'inhibition radicalaire de DPPH est généralement présentée par la valeur IC₅₀, celle-ci est la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH^{*} présent dans le milieu réactionnel. Une faible valeur de la IC₅₀ indique une activité antioxydante forte. Cette valeur a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons préparés (Figure 19).

Tableau 11. % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles et du BHT.

Echantillons	Activité antioxydante							IC ₅₀
	Concentration (mg/ml)	0.2	1	5	10	15	20	
<i>T. fon</i>	Concentration (mg/ml)	0.2	1	5	10	15	20	
	(%) D'inhibition	3.1	5.8	19.8	37.2	54.6	72.1	13.7±1.1
<i>R. off</i>	Concentration (mg/ml)	5	10	15	20	25	30	
	(%) D'inhibition	5.9	17.2	28.5	39.8	51.1	62.4	24.5±2.1
<i>A. alb</i>	Concentration (mg/ml)	10	20	30	50	70	90	
	(%) D'inhibition	10.1	15.8	21.6	38.8	44.6	50.4	79.4±2.8
BHT	Concentration (mg/ml)	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
	(%) D'inhibition	28.4	35.6	47.9	71.9	85.1	86.6	2.3±0.8

T. fon : *Thymus fontanesii* ; *R. off*: *Rosmarinus officinalis*; *A. alb*: *Artemisia herba-alba*

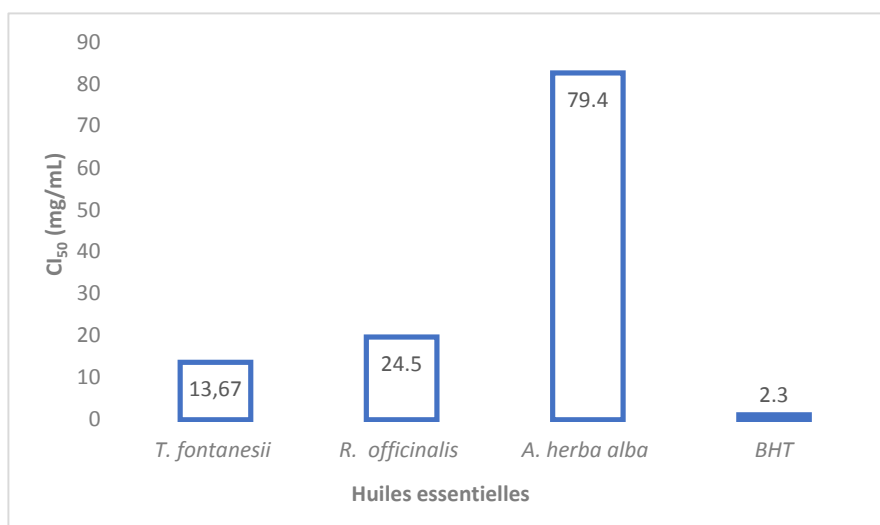


Figure 19. IC₅₀ des huiles essentielles individuelles déterminées par la méthode DPPH.

Nous remarquons que l'huile essentielle de *T. fontanesii* a chénotype thymol à montrer une activité antioxydante notable avec une IC₅₀ de 13.7 mg/ml, alors que l'HE de *R. officinalis* a montré un pouvoir antioxydant modéré avec une CI₅₀ de 24.5 mg/ml. L'activité antioxydante la plus faible a été observée pour l'huile essentielle de *A. herba alba* avec une CI₅₀ de 79.4 mg/ml, qui été largement supérieure à celle du témoin BHT (CI₅₀ = 2.3 mg/ml) (Figure 19).

D'après les résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles de *A. verticillata*, *S. argentea* et *S. candidissima* regroupées dans le tableau 12, on remarque que les huiles essentielles de *A. verticillata* et *S. Argentea* ont présentées les activités antioxydantes les plus fortes avec respectivement des pourcentages d'inhibition supérieurs à 90% et 80% à des concentrations de l'ordre de 1 mg/ml.

Tableau 12. % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles et du BHT.

Echantillons		Activité antioxydante					
<i>A. verticillata</i>	Concentration (mg/ml)	0.025	0.05	0.2	0.5	1.0	
	DPPH (%)	2.5	13.6	38.0	75.6	97.3	
<i>S. candidissima</i>	Concentration (mg/ml)	0.1	1.0	5.0	10	15	20
	DPPH (%)	19.7	30.1	38.5	50.4	74.2	81.9
<i>S. argentea</i>	Concentration (mg/ml)	0.06	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0
	DPPH (%)	18.1	34.9	35.8	56.9	86.0	87.5
A. ascorbique	Concentration (mg/ml)	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
	DPPH (%)	28.4	35.6	47.9	71.9	85.1	86.6

Cependant, l'huile essentielle de *S. candidissima* a exprimée l'activité la moins importante avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 80% à une concentration de 20 mg/ml.

D'après les résultats des CI₅₀s (Figure 20), nous remarquons que les huiles essentielles de *A. verticillata* à chénotype carvacrol et *S. argentea* à chénotype ferruginol ont présentées le pouvoir antioxydant le plus élevé avec une IC₅₀ de l'ordre 0.4 mg/ml et 0.7 mg/ml respectivement, mais qui reste inférieur celui de

l'acide ascorbique ($CI_{50} = 0.12$ mg/ml), alors que *S. candidissima* semble être l'huile essentielle la moins active avec une CI_{50} de 8.8 mg/ml.

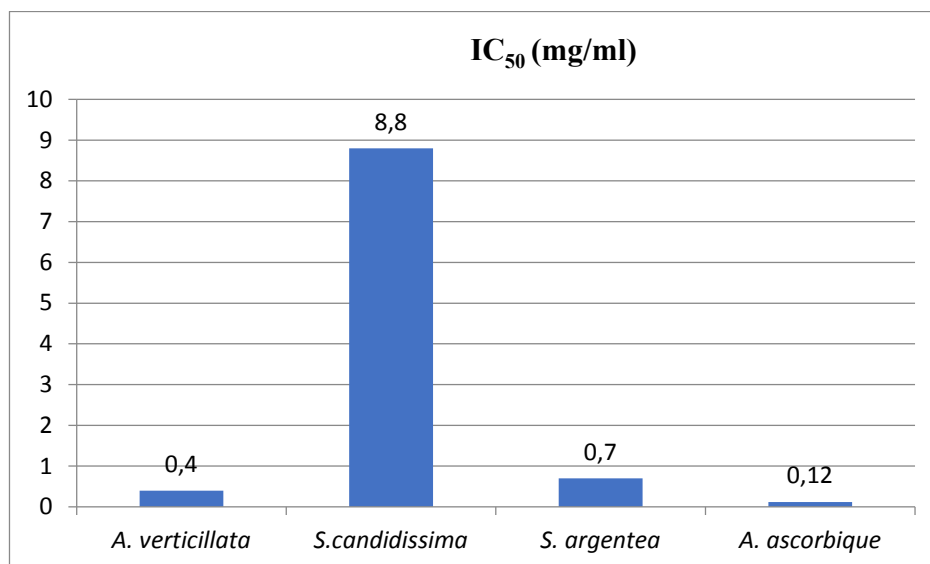


Figure 20. CI_{50} des huiles essentielles individuelles déterminées par la méthode DPPH.

III.1.4. Matrice croisée des huiles essentielles des plantes par la méthode DPPH

L'étude du pouvoir antioxydant des mélanges des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba* vis-à-vis du BHT par la méthode de DPPH a montré que les mélanges des huiles ont présenté de très bonnes activités antioxydantes (Tableau 13).

D'après les résultats des CI_{50} (Figure 21), nous remarquons que l'effet synergique le plus important a été observé avec le mélange des trois huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba*, avec une CI_{50} de 2.6 mg/ml, très proche de celle du témoin BHT ($CI_{50} = 2.3$ mg/ml) et qui dépasse celle exprimée pour chaque huile testée individuellement. Le mélange des huiles essentielles de *T. fontanesii* et *R. officinalis*, a exprimé un effet antioxydant

synergique remarquable avec une CI_{50} de 7.2 mg/ml mais qui reste moins importante que celui de l'antioxydant synthétique BHT (CI_{50} =2.3 mg/ml).

Enfin, l'activité antioxydante la plus faible a été observée pour les mélanges des huiles essentielles de *T. fontanesii*/A. *herba alba* et *R. officinalis*/A. *herba alba* avec respectivement des CI_{50} s de 23.9 et 39.2 mg/ml largement supérieures au témoin (BHT) (Tableau 13).

Tableau 13. % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et A. *herba alba* et du BHT

Echan- tillons	Activité Antioxydante	IC_{50}						
<i>T. fan/R. off</i>	Concentration (mg/mL)	0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	
	(%) d'inhibition	4.1	7.8	29.8	38.1	52.5	62.1	7.2±1.8
<i>T. fan/A. alb</i>	Concentration (mg/mL)	5.0	10	15	20	25	30	
	(%) d'inhibition	6.8	18.3	29.5	40.4	53.2	63.4	23.9±2.3
<i>A. alb/R. off</i>	Concentration (mg/mL)	5.0	10	15	20	30	40	
	(%) d'inhibition	12.1	17.5	24.6	40.8	46.2	50.5	39.2±3.1
<i>T. fan/R. off/A. alb</i>	Concentration (mg/mL)	0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	
	(%) d'inhibition	20.5	34.5	59.9	65.3	80.7	93.7	2.6±0.4
BHT	Concentration (mg/mL)	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	
	(%) d'inhibition	28.4	35.6	47.9	71.9	85.1	86.3	2.3±0.6

T. fan/R. off: Thymus fantenezii/ Rosmarinus officinalis; T. fan/A. alb: Thymus fantenezii/ Artemisia herba-alba; A. alb/R. off: Artemisia herba-alba/Rosmarinus officinalis; A. alb: T. fan/R. off/A. alb: Thymus fantenezii/ Rosmarinus officinalis/Artemisia herba-alba.

Il apparait que l'effet synergique des mélanges des trois huiles essentielles est approximativement 30 fois plus actif que l'huile de A. *herba alba*, 9 fois plus active que l'huile de *R. officinalis* et 5 fois plus active que l'huile de *T. fontanesii*.

En comparant nos résultats avec les huiles essentielles individuelles, le mélange entre les huiles essentielles de *T. fontanesii* et *R. officinalis*, a donné

une CI_{50} de 7.2 mg/ml qui a été 2 fois plus forte que l'huile essentielle de *T. fontanesii* et 3 fois plus forte que l'huile de *R. officinalis*. En revanche, le mélange entre les huiles essentielles de *R. officinalis* et *A. herba alba* présenté un effet antagoniste par rapport à l'huile de *R. officinalis* qui a perdu un petit pourcentage d'inhibition et un effet synergique par rapport à l'huile de *A. herba alba* qui est devenu 2 fois plus fort. Il en est de même pour le mélange des huiles essentielles de *T. fontanesii* et *A. herba alba* dont la CI_{50} été plus élevée que celle de l'huile de *T. fontanesii* et plus faible par rapport à la CI_{50} de l'huile de *R. officinalis* (Figure 21).

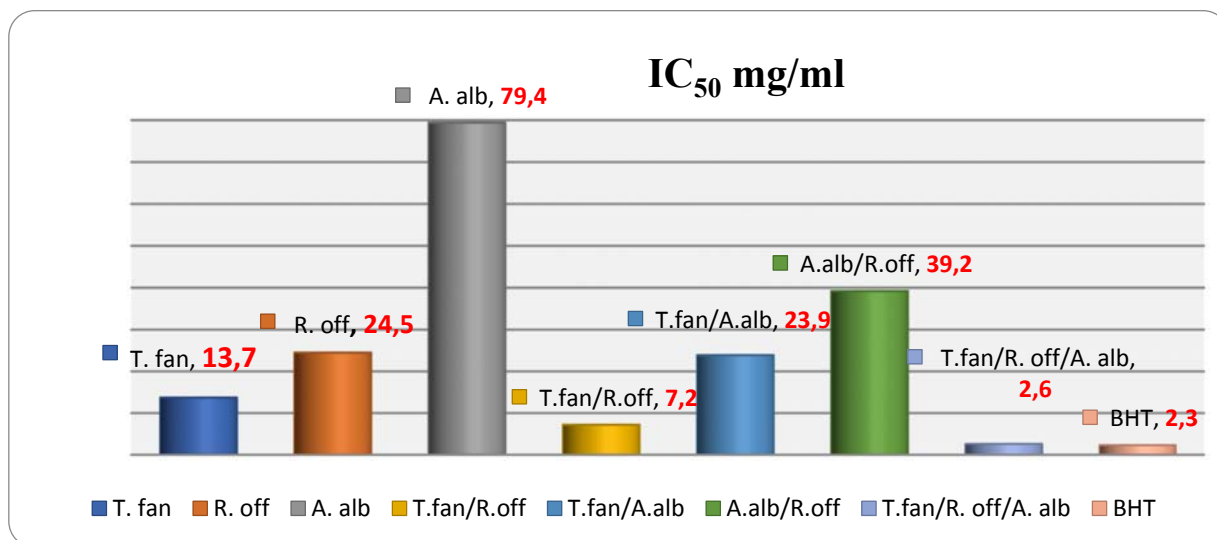


Figure 21. IC_{50} des huiles essentielles individuelles et des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba* par la méthode DPPH.

- ✓ Les résultats de l'activité antioxydante des mélanges croisés des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* par la méthode DPPH sont représentés dans la figure 22.

Des effets antioxydants synergiques intéressants ont été observés auprès des mélanges des huiles essentielles. En comparant les résultats avec les huiles individuelles (Figure 20), les mélanges des huiles essentielles se sont avérés très efficaces par rapport aux huiles essentielles individuelles (Figure 22).

L'huile essentielle de *A. verticillata* associée à l'huile de *S. candidissima* a présenté un effet antioxydant synergique remarquable avec une CI_{50} de 0.17 mg/ml, très proche de celle du témoin acide ascorbique ($CI_{50} = 0.12$ mg/ml) et qui dépassent celle exprimé pour chaque huile testée individuellement. Ainsi la combinaison de l'huile essentielle de *S. argentea* avec celle de *S. candidissima* ($IC_{50} = 0.31$ mg/ml) a été dotée d'une très forte inhibition du radical DPPH.

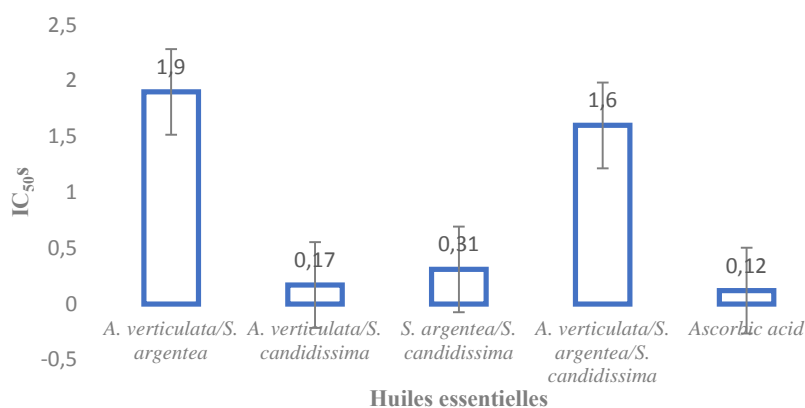


Figure 22. Activité antioxydante des mélanges des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* par la méthode DPPH

Alors que les mélanges de l'huile de *A. verticillata* avec celle de *S. argentea* et des trois huiles de *A. verticulata*/*S. argentea*/*S. candidissima* ont été les moins actifs avec respectivement des CI_{50} s de 1.9 et 1.6 mg/ml (Figure 22).

III.1.5. Etude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction des ions ferreux (FRAP)

Cette méthode colorimétrique est couramment utilisée pour étudier le pouvoir antiradicalaire, elle consiste à mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux Fe^{2+} en donnant un électron. Par la suite la teneur en ions Fe^{2+} peut être contrôlée et mesurée par la formation du bleu de Perl à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance (DO) indique une augmentation de la capacité réductrice

III.1.5.1. Matrice individuelle et croisée des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *A. herba alba*

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles individuelles des trois huiles essentielles, ainsi que leurs mélanges croisés vis-à-vis de l'antioxydant standard BHT a été évalué en utilisant la méthode FRAP. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 23.

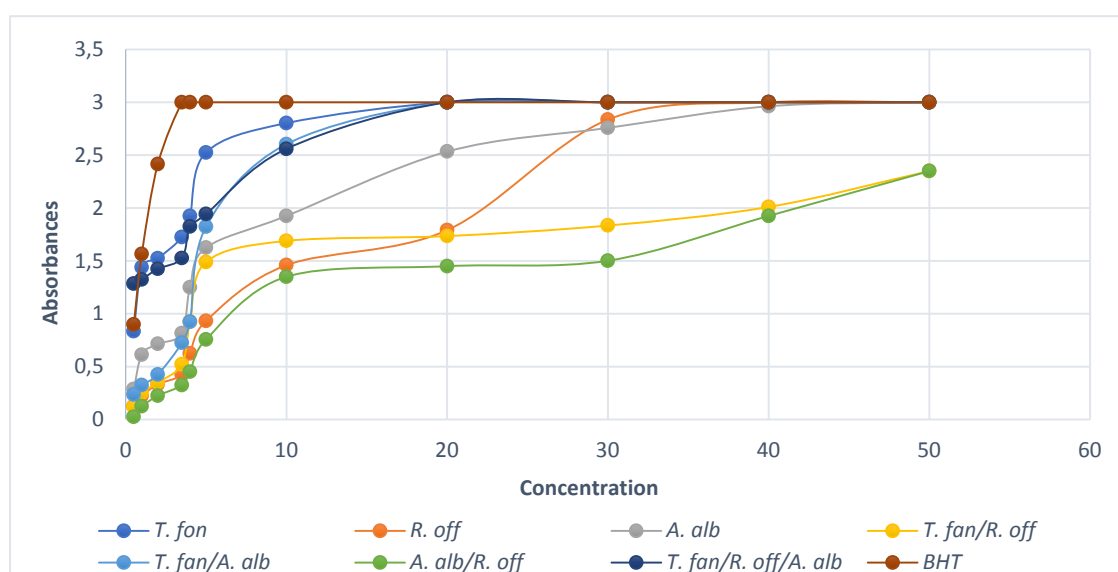


Figure 23. Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis*, *A. herba alba* et du contrôle positif (BHT).

De nombreuses similitudes ont été trouvées entre les résultats du test FRAP et ceux du test de DPPH. Les résultats obtenus (Figure 23), révèlent que toutes les huiles essentielles individuelles et combinées des trois plantes étudiées ont présenté la capacité à réduire le fer présent dans le milieu réactionnel.

Par ailleurs nous avons observé que le pouvoir réducteur du fer été proportionnel à l'augmentation de la concentration des échantillons. Il est à noter que le pouvoir antioxydant le plus élevé a été exposé par l'huile de *T. fontanesii* qui a été meilleur que celui de *R. officinalis* et *A. herba alba*, mais qui reste inférieur au témoin (BHT). Le pouvoir réducteur (FRAP) des mélanges des huiles essentielles (Figure 23) a augmenté avec la concentration et a atteint un plateau à partir de 20 mg/ml pour le mélange thym / armoise.

D'autre part, le mélange de *T. fontanesii* et *A. herba alba* s'est révélé être le mélange le plus active par rapport aux autres mélanges suivi par le mélange des 3 huiles essentielles. Le mélange le moins important été celui des huiles essentielles de *R. officinalis*/*A. herba alba* (Figure 23). Si nous classons nos huiles essentielles individuellement et des mélanges selon la puissance de réduction de fer par rapport au BHT, nous obtiendrons l'ordre suivant : BHT > *T. fontanesii* > *T. fontanesii*/*A. herba alba* > *T. fontanesii*/*R. officinalis*/*A. herba alba* > *R. officinalis* > *A. herba alba* > *T. fontanesii*/*R. officinalis* > *R. officinalis*/*A. herba alba* (Figure 23).

III.1.5.2. Matrice individuelle et croisée des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima*

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles individuelles et des mélanges des trois plantes étudiées vis-à-vis de l'antioxydant standard l'acide ascorbique a été évalué en utilisant la méthode FRAP. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 24.

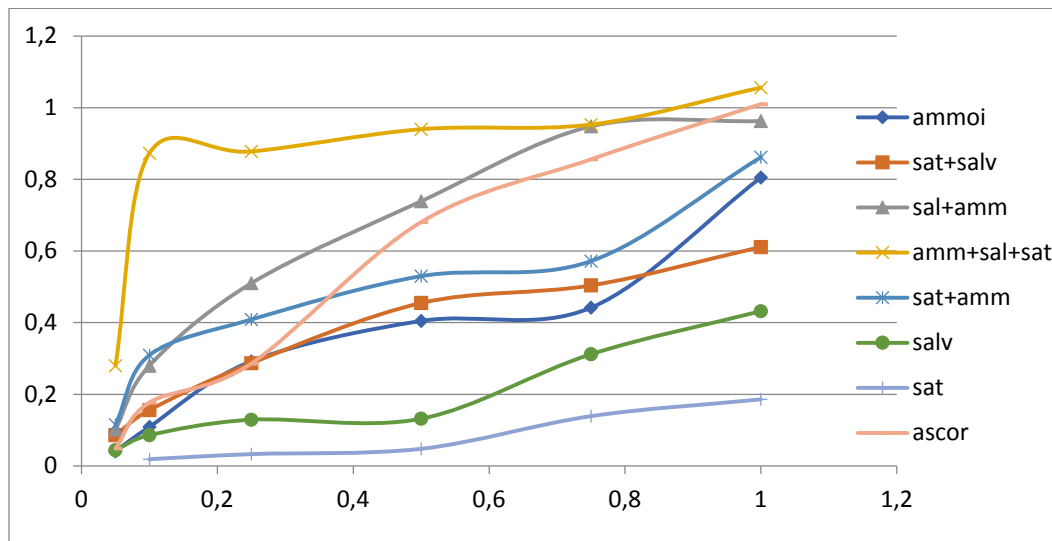


Figure 24. Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* ainsi leurs mélanges croisés.

D'après les résultats cités dans la figure ci-dessus, pour les différentes concentrations des huiles essentielles individuelles et croisés on constate que

l'acide ascorbique ainsi que les huiles essentielles testés ont la capacité à réduire le fer présent dans le milieu réactionnel. L'HE de *A. verticulata* possède un pouvoir réducteur plus élevé que celui de l'HE de *S. argentea* et de l'HE de *S. candidissima*, qui est en accord avec les résultats du test DPPH.

De plus, des effets synergiques ont été observés pour les différents mélanges étudiés. Il apparaît que le mélange des trois huiles essentielles présente la capacité réductrice la plus élevée et qui a été meilleur que celui du témoin l'acide ascorbique.

Si nous classons nos huiles essentielles individuellement et des mélanges selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, nous obtiendrons l'ordre suivant : *A. verticulata*/*S. argentea*/*S. candidissima*>acide ascorbique>*A. verticulata*/*S. argentea*>*A. verticulata*/*S. candidissima*>*A. verticulata*>*S. argentea*/*S. candidissima*> *S. argentea*> *S. candidissima* (Figure 24).

III.1.6. Etude de l'activité antioxydante des fractions oxygénées des huiles essentielles individuelles et combinées de *T. fontanesii* et *R. officinalis* par la méthode DPPH

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à étudier la capacité antioxydante des composés oxygénés des huiles essentielles individuelles et combinées de *T. fontanesii* et *R. officinalis* par deux méthodes, la méthode de piégeage du radical libre DPPH• et la méthode de FRAP, afin d'évaluer leurs effets synergiques ou antagonistes. Les résultats du test DPPH sont présentés dans la figure 25. La méthode de piégeage du radical libre DPPH• nous a permis de déterminer les valeurs des CI₅₀s relatives à nos huiles et nos fractions oxygénées que nous avons comparé à celui du BHT (contrôle positif).

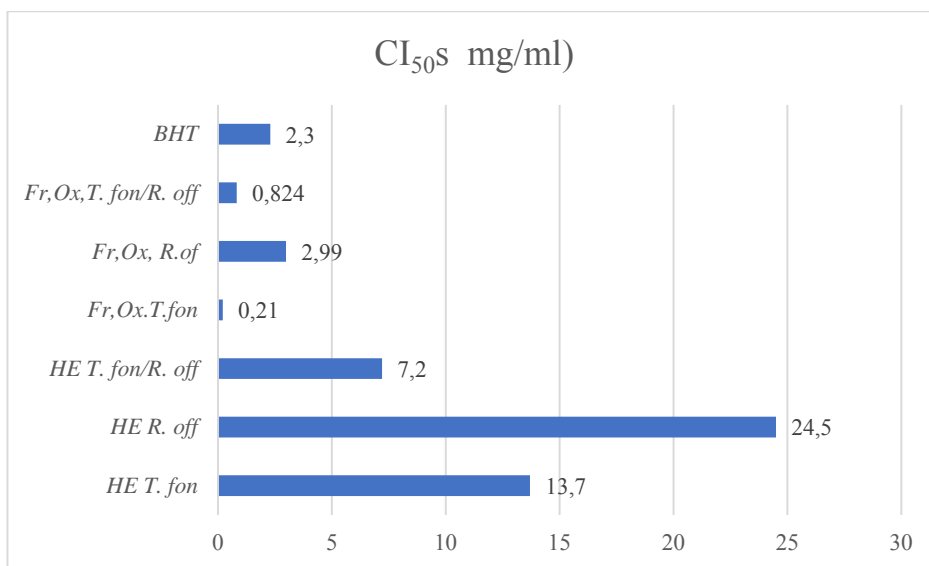


Figure 25 : Concentrations inhibitrices demi-maximales (CI₅₀s) des huiles essentielles ainsi que des fractions oxygénées individuelles et combinées.

D'après les résultats cités ci-dessus, la fraction oxygénée de l'huile de *T. fontanesii* a exprimé une très forte activité antioxydante avec une CI₅₀ de 0.21 mg/ml largement supérieure à celle de l'HE de thym brut et 10 fois supérieure au BHT (CI₅₀=2.3 mg/ml), cette activité a été suivie par la combinaison des deux fractions oxygénées de romarin et de thym avec une CI₅₀ de 0.824 mg/ml qui a été 3 fois presque supérieure que le BHT. La fraction oxygénée de *R. officinalis* a enregistré une CI₅₀ de 2.99 mg/ml qui a été 8 fois supérieure à celle de l'huile de romarin brute et plus proche de BHT (2.3 mg/ml).

III.1.7. Etude de l'activité antioxydante des composés oxygénés des huiles essentielles individuelles et combinées de *T. fontanesii* et *R. officinalis* par la méthode FRAP

Le pouvoir antioxydant des composés oxygénés des huiles essentielles individuelles de *T. fontanesii* et *R. officinalis*, ainsi que le mélange croisé de ces deux fractions vis-à-vis de l'antioxydant standard acide ascorbique a été évaluée en utilisant la méthode FRAP. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 26.

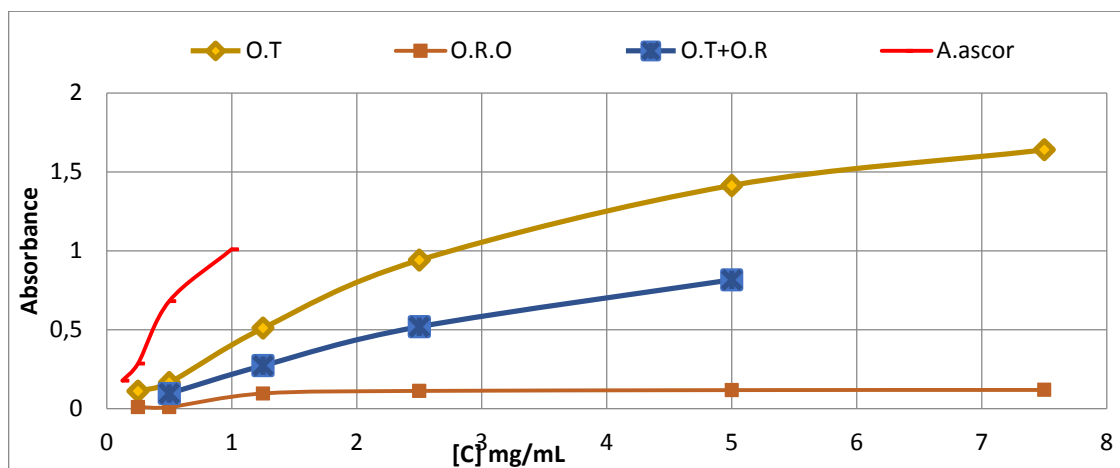


Figure 26. Pouvoir réducteur des composés oxygénés des huiles individuelles et combinées de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et de l'acide ascorbique

Selon les résultats illustrés dans la figure 26, le pouvoir antioxydant le plus élevée a été attribué aux composées oxygénées de l'HE de *T. fontanesii* et qui a été même meilleur que l'acide ascorbique, tandis que la fraction oxygénée de l'huile de *R. officinalis* ne présentait presque aucune capacité réductrice.

Discussion

Dans la présente étude, toutes les huiles essentielles étudiées ont montré une activité antioxydante en piégeant le radical DPPH• et la capacité de réduire les ions ferriques Fe^{3+} . Les huiles essentielles de *A. verticillata* riche en carvacrol, de *S. argentea* riche en ferruginol, et de *T. fontanesii* riche en thymol ont présentées des effets antioxydants plus élevés, probablement lié à leurs profils chimiques, en particulier au pourcentage relativement élevé en composés phénoliques. En effet, le carvacrol est le constituant le plus fréquent des huiles essentielles obtenues à partir d'espèces de *A. verticillata*, et qui agit comme un antioxydant très fort (piégeur de radicaux libres, agent peroxydant anti-lipide, etc.) [16-22]. De plus, le thymol est un monoterpène oxygéné avec une structure phénolique et des propriétés antioxydantes prouvées [56,193-197]. La capacité antioxydante de ces huiles est due à l'effet synergique des constituants majeurs et mineurs.

Il est à noter que l'huile essentielle de *A. verticillata* à chémotype carvacrol à exercer une excellente activité inhibitrice du radical DPPH avec une IC₅₀ de l'ordre 0.4 mg/ml, néanmoins elle reste moins importante à celle trouver par El Ouariachi et al (0.018mg/ml) [75]. L'HE de *T. fontanesii* riche en thymol a enregistré une très bonne activité antioxydante avec une IC₅₀ de l'ordre 13.7 mg/ml qui est nettement plus forte que celle obtenue par Nabet et al (IC₅₀=51.6mg/ml) [161].

Ces différences peuvent être dues aux profils chimiques de ces huiles, notamment leurs composés majoritaires, ainsi que l'effet synergique entre les composants majeurs et mineurs.

Le diterpène ferruginol de type abiétane est un composant des plantes herbacées et ligneuses qui est considéré comme un produit naturel utile en raison de ses divers effets biologiques, notamment de son activité antioxydante [198,117]. D'ailleurs, Saijo et al ont rapporté que le ferruginol avait une activité antioxydante comparativement élevée à celle de l' α -tocophérol [118]. Ce qui explique le bon effet antioxydant observé pour l'HE des racines de *S. argentea* (riche en ferruginol) vis-à-vis du radical libre DPPH avec une IC₅₀ de l'ordre de 0.7 mg/ml. Nos résultats ont donné une efficacité antioxydante nettement meilleure que celle trouver pour les HEs des feuilles et fleurs de *S. argentea* avec des IC₅₀ de 9.25 et 9.34 mg/ml respectivement [199].

L'huile essentielle de *S.candidissima* (riche en pulégone) a montré aussi un effet antioxydant notable. Ceci peut s'expliquer par le pourcentage relativement élevé des composés oxygénés tels que la pulégone.

D'autre part, la pulegone est un monoterpène cétonique naturel obtenu à partir de l'huile essentielle d'une variété des plantes telles que les espèces *Nepeta calamintha* et *Mentha pulegium*, qui aurait des propriétés antioxydantes [109, 200,201].

L'activité antioxydante modérée obtenue à partir de l'huile essentielle de *R. officinalis* peut-être due à une teneur appréciable en 1,8-cinéole, et le camphre qui représente plus de 57% de l'huile totale.

Il a été prouvé que le 1,8 cinéole naturellement présent dans de nombreuses plantes aromatiques présente une activité antioxydante modéré [140,203].

L'activité antioxydante la plus faible a été enregistrée pour l'huile de *A. herba-alba* où le camphre et le chrysanthénone qui représente plus de 58% de l'huile totale. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Dawidowicz et al où ils ont montré que le camphre, l'un des composés majoritaires de l'HE de *salvia hispanica* à une faible capacité antioxydante [204]. En revanche, il n'y a aucune information bibliographique sur l'effet antioxydant de chrysanthénone.

D'autre part, des effets synergiques ont été observés pour la majorité des mélanges des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima*. Les mélanges des huiles essentielles ont été très efficaces par rapport aux huiles essentielles individuelles.

La CI₅₀ du mélange des huiles essentielles de *S. candidissima* et de *A. verticulata* évaluée par le test DPPH présente une activité plus importante (0.17 mg/ml) que la CI₅₀ du mélange l'huile de *S. candidissima/S. argentea* (0.31 mg/ml) et qui a été plus proche de témoin l'acide ascorbique (0.12 mg/ml). Cela peut être expliqué par l'effet synergique résultant des principaux constituants du mélange de *S. candidissima* et de *A. verticulata* c'est-à-dire entre la pulegone (33,8%), le carvacrol (28,4%), le limonène (12,2%) et le p-cymène (11,8%).

Ces résultats ont montré que les combinaisons des huiles essentielles ont présenté des effets antioxydants synergiques prometteurs en diminuant la concentration inhibitrice demi-maximale.

Il est à noter que, l'HE de *S. candidissima* associée à l'HE de *S. argentea* semble être peu efficace que son association avec l'HE de *A. verticulata*, du fait de l'absence de carvacrol et l'augmentation du pourcentage de pulegone (41,3%), 6,7 dihydroferruginol (7,5%), ferruginol (7,3%), (Z)-phytol (7,2%) et l'abitatriène (6,1%). Dans une étude réalisée par Mazumder et al en 2014, il a été prouvé que l'association de l'HE d'ajowan et de caraway à présenter une capacité antioxydante plus importante dépassant celle exprimer pour chaque

huile testée seule, cela veut dire qu'il y a eu une synergie entre les composés présents dans ces deux huiles réunies [205].

Les potentiels antioxydants du mélange de l'HE de *A. verticulata* et de *S. argentea* par la méthode FRAP peut être reliés à l'association de carvacrol (27,9%), le limonène (12,7%), la pulegone (12,6%) et le p-cymène (12,6%).

Les résultats des mélanges croisés des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis* obtenus, ont montré que les combinaisons ont appliquées des effets antioxydants synergiques en diminuant la concentration inhibitrice demi-maximale. Le puissant effet synergique a été trouvé en combinant les huiles essentielles de *T. fontanesii*, *A. herba-alba* et *R. officinalis* avec une IC₅₀ de l'ordre de 2.6 mg/ml qui été très proche de témoin BHT (IC₅₀=2.3mg/ml). Il semble aussi que l'association du thymol, du p-cymène au chrysanthénone, 1,8-cinéole, camphre, bornéol et verbénone augmente considérablement l'activité antioxydante.

De plus, le mélange des huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* a également montré une bonne capacité antioxydante (IC₅₀=7.2mg/ml) et qui dépasse celle exprimer pour chaque huile testée individuellement. Il est évident que cet effet synergique a été trouvé lorsque le thymol et le p-cymène ont été associés au 1,8-cinéole, au camphre, au bornéol et à la verbénone.

Cependant, les mélanges des huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *A. herba-alba*, ainsi que des huiles essentielles de *A. herba-alba* et de *R. officinalis* ont présenté des activités antioxydantes moins importants.

Il semble que la combinaison de thymol et de p-cymène avec le chrysanthénone, du camphre et du 1,8-cinéole produit un faible pouvoir antioxydant. Alors que l'absence de thymol et de p-cymène dans le mélange de *A. herba-alba* et de *R. officinali* diminue considérablement ce pouvoir.

Concernant l'examen de l'activité antioxydants des fractions oxygénées des huiles essentielle de *T. fontanesii* et de *R. officinalis* individuelles et combinées ils ont exprimé également une forte capacité antioxydante que celles des huiles correspondantes et qui est largement importante que les témoins acide ascorbique et le BHT.

Ces résultats peuvent être expliqués par la richesse de ces fractions par la présence du thymol, le 1,8-cinéol et/ou des composés oxygénés.

En conclusion, les huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticillata*, *S. candidissima*, et *T. fontanesii* ont présenté les meilleures activités antioxydantes. Tandis que les huiles essentielles de *R. officinallis* et *A. herba-alba*, riches en monoterpènes oxygénés, ont montré les activités antioxydantes les plus faibles par le biais de leurs valeurs des CI_{50} s. De plus, l'importance de l'activité antioxydante peut être liée à l'effet provoqué par l'interaction des constituants présents dans l'huile, que ceux en grandes proportions ou en quantités mineures. Les activités antioxydantes présentées par les huiles essentielles, leurs mélanges croisés ainsi que les fractions oxygénées sont des résultats très prometteurs pour des applications de conservation des aliments utilisant ces différentes fractions, puisque les effets secondaires indésirables des antioxydants synthétiques sont largement connus, à savoir les dommages au foie ou la cancérogenèse [206].

III.2. Evaluation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles individuelles et croisées des plantes

Introduction

Les bactéries sont responsables de nombreuses maladies dangereuses pour la santé humaine, telles que la méningite à méningocoque ou la tuberculose, ou d'autres maladies relativement bénignes comme les infections gastro-intestinales et les infections nosocomiales. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* *Enterococcus sp*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* font partie des principales bactéries présentant une multirésistance aux médicaments et font partie de la catégorie des agents pathogènes communautaires et hospitaliers [207]. Avec la résistance accrue de ces microorganismes aux antibiotiques, les constituants des produits à base de biomasse apparaissent comme des substituts très intéressants. En tant que stimulants, de nombreuses huiles essentielles peuvent aider à augmenter le taux de guérison dans tout le corps [208].

Les propriétés antimicrobiennes de certaines huiles essentielles protègent également le corps durant ces étapes de la guérison. Les huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées en monothérapie, elles sont également associées depuis plusieurs années et peuvent avoir un effet plus puissant que celles-ci, si elles sont utilisées seules [13]. Les huiles essentielles peuvent être utilisées en synergie pour élargir le spectre de leurs actions et augmenter leurs bénéfices.

L'effet synergique possible produit par la combinaison des huiles essentielles de plantes a été qualifié de stratégie efficace de lutte contre le développement microbien [127,128,191]. *Ammoides verticulata*, *Salvia argentea*, *Satureja candidissimas*, *Thymus fontanesii* et *Rosmarinus officinalis* sont récoltés par la population locale pour leurs utilisations potentielles comme remèdes alternatifs pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses.

De nombreuses activités biologiques de ces espèces ont été rapportées dans la littérature, notamment pour leurs effets antimicrobiens, anti-inflammatoires,

stimulants et diurétiques [9,11,161,88,108,144]. L'enquête ethnobotanique menée sur ces espèces montre que la population locale de la région de l'ouest utilise ces plantes contre la grippe, les problèmes des vers intestinaux, les infections et comme pansement pour les brûlures et les plaies.

Dans le cadre de notre recherche sur les produits naturels actifs pour lutter contre les infections microbiennes, la présente étude a pour objectif de déterminer les effets antimicrobiens de chaque huile essentielle contre un panel de microorganismes pathogènes d'importance clinique et les éventuels effets synergiques de la combinaison des différentes huiles essentielles étudiées.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été étudiée contre neuf souches bactériennes: trois à Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Salmonella typhi* (ATCC 14028), six à Gram positif: *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7314), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) et *Bacillus cereus* (ATCC 14579) et deux levures fongiques *C. albicans* (ATCC 10231) et *C. albicans* (ATCC 4226).

III.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles individuelles et combinées de *Ammoides verticulata*, *Salvia argentea* et *Satureja candidissima*.

III.2.1.1. Etude de l'activité antimicrobienne par la Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion sur disque également nommé aromatoگرامme, c'est un procédé qualitatif qui nous permettra de tester la sensibilité ou la résistance des microorganismes aux huiles essentielles. Le tableau 14 présente les résultats de sensibilité des souches microbiennes (les diamètres d'inhibition) vis-à-vis des huiles étudiées individuellement et en combinaisons par la méthode de disque.

Comme le montre le tableau 14, les huiles essentielles individuelles et les mélanges croisés des huiles essentielles de *A. verticulata*, *S. argentea* et *S. candidissima* ont montré des effets inhibiteurs contre les agents pathogènes testés avec des diamètres variés. *S. typhi* (26 mm), *S. aureus* (25 mm), *C. sporogenes* (23 mm), *B. subtilis* (27 mm), *E. faecalis* (24 mm), *L. rhamnosus* (23 mm) et *C. albicans* (30-32 mm). Ils se sont avérés être les agents pathogènes les plus inhibés par l'huile essentielle de *A. verticillata*. On remarque également que cette huile a été extrêmement sensible contre les bactéries à Gram(+) que les Gram(-) et très efficace contre les souches fongiques (30-32 mm).

L'huile essentielle des parties aériennes de *S. candidissima* a montré des effets inhibiteurs plus remarquables contre *S. aureus* (20 mm) et *C. albicans* (22-31mm) (Tableau 14).

L'huile essentielle de *S. argentea* a montré une sensibilité importante vis-à-vis de la majorité des souches testées, notamment contre *B. subtilis* et *B. cereus* avec respectivement des diamètres des zones d'inhibition de 41 et 28 mm. Cette huile s'est avérée la moins sensible vis-à-vis des deux souches fongiques.

D'autre part, des effets synergiques importants ont été observés auprès des mélanges croisés des huiles vis-à-vis de la majorité des souches testées, notamment à partir des mélanges des huiles essentielles de *A. verticulatae/S. argentea* et *A. verticulata/S. argentea/S. candidissima*. La combinaison des deux huiles de *A. verticulata/S. argentea* a provoqué une augmentation considérable de l'activité antimicrobienne contre toutes les bactéries à gram-positives et négatives avec des zones d'inhibition allant de 33 à 53 mm. Alors qu'un effet antagoniste a été observé pour les levures *C. albicans* (30-32 versus 14-16 mm). Il est à noter que la combinaison des trois huiles a montré une augmentation considérable de l'activité contre l'ensemble des souches à gram-positives avec des zones d'inhibition allant de 34 à 58 mm et la souche à gram-négative *E. coli* de 43 mm.

Tableau 14. Activité antimicrobienne (zones d'inhibition) des huiles essentielles et leur effet synergique.

Microorganismes	Méthode de diffusion de disque (mm) (10 µL)						
	Huiles essentielles (Disque)			Mélange des huiles (disque)			
	A. <i>verticulata</i>	S. <i>candidissima</i>	S. <i>argentea</i>	A.v/S.c	A.v/S.a	S.c/ S.a	A.v/S.c/S.a
Gram-négative bactéries							
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13 ± 1,5	15 ± 0,8	15 ± 0,6	21 ± 1,5	50 ± 2,3	38 ± 1,3	43 ± 1,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13 ± 1,0	20 ± 0,5	13 ± 1,2	18 ± 2,5	33 ± 0,4	15 ± 0,5	17 ± 0,2
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	26 ± 2,1	19 ± 0,9	11 ± 1,0	15 ± 1,1	49 ± 3,2	28 ± 1,6	19 ± 1,8
Gram-positive bactérie							
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	25 ± 0,0	20 ± 1,5	10 ± 0,0	33 ± 1,2	53 ± 2,6	27 ± 1,3	39 ± 2,4
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	23 ± 0,6	14 ± 1,0	14 ± 1,0	16 ± 2,1	39 ± 3,1	29 ± 2,0	36 ± 2,0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	27 ± 1,2	18 ± 1,6	41 ± 2,0	44 ± 4,0	40 ± 3,6	46 ± 3,0	42 ± 5,6
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	24 ± 1,3	16 ± 2,1	09 ± 0,9	13 ± 1,0	42 ± 4,2	30 ± 1,0	34 ± 3,2
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	23 ± 0,6	14 ± 1,0	14 ± 1,0	31 ± 2,1	39 ± 3,1	29 ± 2,0	36 ± 2,0
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	22 ± 1,2	16 ± 0,0	28 ± 0,33	30 ± 1,3	50 ± 2,1	38 ± 1,4	58 ± 3,0
Levures							
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	30 ± 2,6	22 ± 2,6	14 ± 1,0	22 ± 1,2	16 ± 1,0	08 ± 0,1	16 ± 1,6
<i>C. albicans</i> ATCC 4226	32 ± 3,6	31 ± 3,0	14 ± 1,0	12 ± 1,0	14 ± 0,8	13 ± 1,0	18 ± 1,8

Les valeurs sont représentées comme moyennes ± SEM; S: Synergie; A.v/S.c: mélange d'A. verticulata et S. candidissima (1/1); A.v/S.a: mélange d'A. verticulata et S. Argentea (1/1); S.c/ S.a: mélange de S. Candidissima et S. argentea (1/1); A.v/S.c/S.a: mélange d'A. verticulata, S. candidissima et S. argentea (1/1/1)

Il est à noter que la combinaison des huiles essentielles de *A. verticulata* et *S. candidissima* a présentée des effets synergiques très intéressants sur *S. aureus* (33 mm) et *B. subtilis* (44 mm). Alors que, le mélange des huiles essentielles de *S. candidissima* et *S. argentea* présenté un effet synergique important contre *B. subtilis* (46 mm), *E. coli* (38 mm) et *B. cereus* (38 mm) (Tableau 14).

III.2.1.2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de micro-dilution (CMI et de CMB)

La méthode de micro-dilution sur microplaque du Mueller Hinton liquide a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide. Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles déterminés à l'aide de la méthode de dilution-gélose contre les onze souches microbiennes sont mentionnés dans les tableaux 15 et 16. Dans cette étude, les huiles essentielles de *S. argentea* et *A. verticillata* ont présenté les meilleures activités antibactériennes.

Les CMI et CMB les plus remarquables ont été observées par l'huile de *S. argentea* sur six souches : *L. rhamnosus* (0.02 et 0.1 mg/ml, respectivement), *B. cereus* (0.09 et 0.2 mg/ml, respectivement), *B. subtilis* (0.05 et 0.2 mg/ml, respectivement), *S. aureus* (0.2 et 0.2 mg/ml, respectivement), *E. coli* (0.4 et 1.5 mg/ml, respectivement) et *P. aeruginosa* (0.8 et 3.1 mg/ml, respectivement). La plus faible activité examinée pour cette huile essentielle a été observée contre *E. faecalis* (3.1 et 3.1 mg/ml, respectivement), *C. sporogenes* (3.1 et 3.1 mg/ml, respectivement) et *C. albicans* (1.2 mg/ml).

L'huile essentielle de *A. verticillata* a présenté un pouvoir antimicrobien contre six souches. Les CMI et CMB les plus faibles ont été observées chez *E. coli* (0,2 et 0,2 mg/ml, respectivement), *L. rhamnosus* (0,4 et 1,6 mg/ml, respectivement), *B. cereus* (0,2 et 0,8 mg/ml, respectivement), *S. Typhi* (0,2 et 1,5 mg/ml, respectivement), *C. albicans* ATCC 10231 (0.4 et 1.2, respectivement) et *C. albicans* ATCC 4226 (0.8 et 1.5 mg/ml, respectivement).

Table 15. Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association

Microorganismes	CMI (mg/ml)						
	A. <i>verticulata</i>	S. <i>candidissima</i>	S. <i>argentea</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>candidissima</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>argentea</i>	S. <i>candidissima</i> / S. <i>argentea</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>candidissima</i> / S. <i>argentea</i>
	Huiles individuelles			1:1 Combinaisons			
Gram-négative							
<i>E. coli</i>	0.2 ± 00	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 00	0.1 ± 0.0	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
<i>P. aeruginosa</i>	3.1 ± 06	3.1 ± 0.6	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.6	6.2 ± 1.1	6.2 ± 1.0	6.2 ± 1.2
<i>S. Typhi</i>	0.8 ± 0.1	6.2 ± 0.9	1.5 ± 0.6	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1	6.2 ± 0.8	6.2 ± 0.8
Gram-positive							
<i>S. aureus</i>	1.5 ± 0.2	6.2 ± 1.1	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.6	3.2 ± 0.8
<i>C. sporogenes</i>	3.1 ± 0.5	3.1 ± 0.8	3.1 ± 0.5	1.5 ± 0.9	0.8 ± 0.2	3.1 ± 1.1	3.1 ± 0.4
<i>B. subtilis</i>	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.6	0.05 ± 0.01	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.3 ± 0.1
<i>E. faecalis</i>	1.5 ± 0.3	6.2 ± 0.9	3.1 ± 0.8	1.5 ± 0.8	0.7 ± 0.08	1.5 ± 0.4	3.2 ± 0.4
<i>L. rhamnosus</i>	0.4 ± 0.1	3.1 ± 0.6	0.02 ± 0.01	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.01	1.5 ± 0.2	3.1 ± 0.6
<i>B. cereus</i>	0.4 ± 0.1	6.2 ± 1.2	0.09 ± 0.01	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.06	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.2
Levures							
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.4 ± 0.1	3.1 ± 0.2	1.2 ± 0.6	0.4 ± 0.1	6.2 ± 0.8	0.8 ± 0.1	3.1 ± 0.6
<i>C. albicans</i> ATCC 4226	0.8 ± 0.1	3.1 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.4	12.5 ± 1.1	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2

Table 16. Concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association

Microorganismes	CMB (mg/ml)						
	A. verticulata	S. candidissima	S. argentea	A. verticulata/ S. candidissima	A. verticulata/ S. argentea	S. candidissima/ S. argentea	A. verticulata/ S. candidissima/ S. argentea
	Huiles individuelles			1:1 Combinaisons			
Gram-négative							
<i>E. coli</i>	0.2 ± 0.0	6.2 ± 1.1	1.5 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.01	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
<i>P. aeruginosa</i>	6.2 ± 1.1	6.2 ± 0.9	3.1 ± 0.8	3.1 ± 0.8	12.5 ± 1.1	12.5 ± 1.1	6.2 ± 1.1
<i>S. Typhi</i>	1.5 ± 0.6	12.5 ± 1.5	1.5 ± 0.6	3.1 ± 0.9	1.5 ± 0.2	12.5 ± 0.8	6.2 ± 1.2
Gram-positive							
<i>S. aureus</i>	6.2 ± 0.9	6.2 ± 0.6	0.2 ± 0.01	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.1	12.5 ± 0.8	3.1 ± 0.6
<i>C. sporogenes</i>	3.1 ± 0.9	6.2 ± 0.8	3.1 ± 0.8	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2
<i>B. subtilis</i>	3.1 ± 0.6	6.2 ± 1.1	0.2 ± 0.01	1.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.2 ± 1.0
<i>E. faecalis</i>	3.1 ± 0.2	12.5 ± 1.6	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.6	1.5 ± 0.3	6.2 ± 0.4	3.1 ± 0.1
<i>L. rhamnosus</i>	1.6 ± 0.8	6.2 ± 0.9	0.1 ± 0.01	3.1 ± 0.4	0.2 ± 0.01	6.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1
<i>B. cereus</i>	0.8 ± 0.1	12.5 ± 2.0	0.2 ± 0.01	6.2 ± 0.7	0.4 ± 0.1	6.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1
Levures							
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1.2	3.1	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.02	12.5 ± 1.4	0.8 ± 0.2	6.2 ± 1.1
<i>C. albicans</i> ATCC 4226	1.5	3.1	1.5 ± 0.1	6.2 ± 1.2	25.0 ± 2.1	0.8 ± 0.1	3.1 ± 0.8

Rappelons que le ratio CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle, si ce rapport est inférieur ou égale à 4, l'extrait est alors bactéricide ou fongicide et s'il est supérieur à 4 on dit que l'extrait est bactériostatique ou fongistatique [209].

Selon le tableau 17, le rapport CMB/CMI obtenu a montré que l'huile essentielle de *A. verticillata* a présenté des effets bactéricides et fongicides sur l'ensemble des souches testées.

L'huile essentielle de *S. candidissima* a présenté une activité antimicrobienne plus ou moins faible par rapport aux autres huiles testées, avec des valeurs de CMI et CMB comprises entre 1,5 et 6,2 mg/ml et entre 3.1 et 12,5 mg/ml, respectivement (Tableaux 15 et 16). Cette HE a également exprimé des effets bactéricides et fongicides sur la majorité des bactéries et levures à l'exception de la bactérie à gram-négative *E. coli* qui a présenté un effet bactériostatique (Tableau 17).

L'huile essentielle de *S. argentea* a présenté des effets bactéricides et fongicides sur l'ensemble des souches testées à l'exception de la bactérie à gram-positive *L. rhamnosus* qui a présenté un effet bactériostatique (Tableau 17).

Table 17. Effets bactéricides et bactériostatiques des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association

Microorganismes	CMB/ CMI						
	A. <i>verticulata</i>	S. <i>candidissima</i>	S. <i>argentea</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>candidissima</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>argentea</i>	S. <i>candidissima</i> / S. <i>argentea</i>	A. <i>verticulata</i> / S. <i>candidissima</i> / S. <i>argentea</i>
	Huiles individuelles			1:1 Combinaisons			
Gram-négative							
<i>E. coli</i>	1	5	4	1	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	4	4	2	2	1
<i>S. Typhi</i>	2	2	1	2	2	2	1
Gram-positive							
<i>S. aureus</i>	4	2	1	1	1	4	1
<i>C. sporogenes</i>	1	2	1	2	1	2	1
<i>B. subtilis</i>	3	2	4	4	4	64	16
<i>E. faecalis</i>	2	2	1	2	2	4	1
<i>L. rhamnosus</i>	4	2	5	4	1	4	1
<i>B. cereus</i>	2	2	2	8	2	8	5
Levures							
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3	2	2	1	2	1	2
<i>C. albicans</i> ATCC 4226	2	1	2	4	2	4	2

- **Mélanges croisés des huiles essentielles**

L'activité antimicrobienne des mélanges des huiles essentielles examinées dans cette étude sont présentées dans les tableaux 15 et 16. Le mélange des huiles essentielles de *A. verticillata* et de *S. candidissima* a montré un effet synergique important contre *C. albicans ATCC 10231* et *C. sporogenes* avec respectivement des CMI et CMB variant de 0,4 à 1,5 mg/ml et de 0,4 à 1.5 mg/ml.

Le mélange des huiles essentielle de *A. verticulata* et *S. argentea* a montré un effet synergique plus important en fonction de leur CMI et CMB contre *E. coli* (0.1 et 0.1 mg/ml, respectivement), *S. Typhi* (0.7 et 1.5 mg/ml, respectivement), *C. sporogenes* (0.8 et 0.8 mg/ml, respectivement) et *E. faecalis* (0.7 et 1.5 mg/ml, respectivement). Cependant, les mélanges des huiles essentielles de *S. candidissima/S. argentea* et *A. verticulata/S. candidissima/ S. argentea* ont présenté des effets antagonistes en comparant les valeurs de CMI et de CMB (Tableaux 15 et 16).

D'autre part, le rapport CMB/CMI obtenu, a montré que les différents mélanges des trois huiles essentielles ont présenté des effets bactéricides et fongicides sur toutes les espèces microbiennes testées, à l'exception *B. subtilis* et *B. cereus* qui ont montré des effets bactériostatiques.

III.2.2.1. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles individuelles et combinées de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea*,

III.2.2.1. Etude de l'activité antibactérienne par la Méthode de diffusion sur disque

Le tableau 18 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries choisies vis-à-vis des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea*. Comme le montre le tableau 18, les huiles essentielles individuelles ainsi que les mélanges de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* ont montré des effets inhibiteurs contre les différentes bactéries testées.

L'huile essentielle de *T. fontanesii* a exercé un très bon effet inhibiteur sur la majorité des souches étudiées avec un intervalle des diamètres des zones d'inhibition variant de 12 à 47 mm. Les souches les plus sensibles ont été *E. coli* (47mm), *S. typhi* (27mm) et *S. aureus* (28mm), alors que, l'huile de *R. officinalis* s'est révélée être la moins importante. L'effet inhibiteur le plus intéressant a été enregistré contre *L. rhamnosus* (24 mm). Tandis que les souches les plus sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle de *S. argentea* sont *B. Subtilis* (41 mm) et *S. aureus* (28 mm) (Tableau 18).

- **Mélanges croisés des huiles essentielles**

Le mélange des trois huiles essentielles de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* a montré un effet synergique plus important en fonction de leurs diamètres d'inhibition contre les deux souches bactériennes *C. sporogenes* et *S. aureus* avec respectivement des zones d'inhibition de 23 et 30 mm. Alors que la combinaison des deux huiles de *R. officinalis/S. argentea* a provoqué une augmentation considérable de l'activité antibactérienne contre les deux souches de *C. sporogenes* (17 mm) et *L. rhamnosus* (29 mm).

Le mélange de *T. fontanesii* et *S. argentea*, a présenté un effet synergique très intéressant contre *S. aureus* (33 mm), *C. sporogenes* (21mm) et *E. faecalis* (27 mm) et des effets antagonistes sur le reste des bactéries. La combinaison des deux huiles de *T. fontanesii*, et *R. officinalis* à montrer un effet antagoniste sur la majorité des souches bactériennes. En revanche un effet additif a été observé pour ce mélange contre la souche pathogène *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 18 mm (Tableau 18).

Tableau18 : Activités antimicrobiennes (zones d'inhibition) des huiles essentielles et des mélanges croisés

Microorganismes	Test de diffusion sur disque (mm) (100 mg/L)						
	Huiles essentielles (Disque)			Mélange des huiles (disque)			
	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/R.o /S.a</i>
Gram-négative							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	47 ±1.3	17 ±2.5	15 ± 0,5	19 ± 1.1	11 ±1.0	8 ±0.9	7 ±1.1
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	18 ±0.9	18 ±2.0	12 ± 1,1	18± 0.5	6±0.5	6± 0.0	8±0.7
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	27 ±2.1	11 ± 1.0	11 ± 1,0	13 ±1.3	7 ±0.9	14 ± 1.1	6 ± 0
Gram-positive							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	28 ±1.2	14 ±1.1	28 ± 0,33	18 ±0.0	33 ±3.2	19 ±2.1	30 ±1.2
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	15 ±0.8	10 ±0.9	14 ± 1,0	7 ± 0.7	21 ±1.8	17 ±1.3	23 ±0.0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24 ±0.0	11 ±1.3	41 ± 2,0	15 ± 1.0	13 ±1.6	17 ±0.9	6 ± 00
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	25 ±1.1	17 ±2.1	09 ± 0.9	16 ±0.5	27 ±2.00	7 ± 0.1	11 ±1.0
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	12 ±1.0	24 ±1.2	14 ± 1,0	12 ± 0.1	11 ± 0.8	29 ±0.3	5 ± 0.0

Les valeurs sont représentées comme moyennes ± SEM; S: Synergie; *T.f/R.o*: mélange de *T. fontanesii* et *R. Officinalis* (1/1); *T.f/S.a*: mélange de *T. fontanesii* et *S. argentea* (1/1); *R.o/S.a*: mélange de *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1) ; *T.f /R.o /S.a*: mélange de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1/1)

III.2.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne par la méthode de dilution CMI et CMB

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles déterminés à l'aide de la méthode de dilution-gélose contre les huit souches bactériennes testées sont mentionnés dans les tableaux 19 et 20. Dans cette étude, les huiles essentielles de *S. argentea* et *T. fontanesii* ont présenté les meilleures activités antibactériennes. Les CMI et CMB les plus faibles pour *S. argentea* ont été observées chez cinq souches. Les souches les plus sensibles sont *L. rhamnosus* (0.02 et 0.1 mg/ml, respectivement), *B. subtilis* (0.05 et 0.2 mg/ml, respectivement), *S. aureus* (0.2 et 0.2 mg/ml, respectivement), *E. coli* (0.4 et 1.5 mg/ml, respectivement) et *P. aeruginosa* (0.8 et 3.1 mg/ml, respectivement).

La plus faible activité observée pour ces huiles essentielles été contre *E. faecalis* (3.1 et 3.1 mg/ml, respectivement) et *C. sporogenes* (3.1 et 3.1 mg/ml, respectivement). En effet, l'huile essentielle de *S. argentea* a montré des effets bactéricides sur la majorité des souches testées à l'exception de la bactérie à gram-positif *L. rhamnosus* qui a noté un effet bactériostatique (Tableaux 21).

A la lecture des résultats obtenus on remarque aussi que l'huile essentielle de *T. fontanesii* a présenté une bonne activité sur l'ensemble des souches. On note également une activité antibactérienne plus prononcée sur les deux bactéries à Gram positif ; *S. aureus* (CMI= 1.56 et CMB= 3.12 mg/ml), *E. faecalis* (CMI= 1.56 et CMB =1.56 mg/ml) et une bactérie à Gram négatif ; *S. typhi* (CMI =1.56 et CMB =3.12 mg/ml).

Alors que, les CMI et CMB les plus élevées ont été observées chez *L. rhamnosus*, *E. coli*, *C. sporogenes*, *P. aeruginosa* avec des valeurs de CMI allant de 3.12 à 12.5mg/ml et de CMB allant de 3,12 à 50 mg/ml. D'autre part, l'huile essentielle de *T. fontanesii* a montré des effets bactéricides sur l'ensemble des souches testées (Tableaux 21).

L'huile essentielle de *R. officinalis* a présenté une activité antibactérienne plus faible, avec des valeurs de CMI et de CMB comprises entre 1,5 et 25 mg/ml et entre 6,2 et 25 mg/ml, respectivement (Tableaux 20 et 21).

Cette huile a également présenté des effets bactéricides sur l'ensemble des souches testées (Tableaux 21).

Les résultats de l'activité antimicrobienne des mélanges des huiles essentielles sont résumés dans les tableaux 20 et 21. Le mélange des 3 huiles essentielles de *T. fontanesii* /*S. argentea*/*R. officinalis* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries. Ainsi, *S. aureus*, *C. sporogenes* et *P. aeruginos* se sont montrés les plus sensibles avec des CMI de 0.09 mg/ml, 0.19 mg/ml et 0.4 mg/ml, respectivement et CMB de 0.19 mg/ml, 3.12 mg/ml et 1.56 mg/ml, respectivement, exerçant ainsi un effet synergique important sur ces trois souches. De plus, des effets bactéricides ont été observés sur l'ensemble des espèces bactériennes testées à l'exception de la bactérie à gram-positif *S. typhi* et la bactérie à gram-négatif *C. sporogenes* qui ont noté un effet bactériostatique (Tableau 21).

Le mélange des huiles essentielles de *S. argentea* et de *R. officinalis* a montré un effet antagoniste sur la majorité des souches testées. Le mélange des huiles essentielles de *T. fontanesii* et de *S. argentea* a montré un effet synergique plus important contre *S. aureus*, *C. sporogenes* et *E. faecalis* avec des CMI et CMB allant, respectivement de 0.098 à 0,781 mg/ml et de 0,781 à 6.25 mg/ml avec des effets variant entre bactéricides et bactériostatiques sur l'ensemble des souches testées.

Tableau19. Concentration inhibitrice minimale (CMI) des huiles essentielles étudiées individuellement et en association

Microorganismes	CMI (mg/ml)						
	Huiles essentielles			Mélange des huiles			
	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/R.o /S.a</i>
Gram-négative bactéries							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	6.25 ±0.1	25 ± 0.1	0.4 ± 0.1	12.5 ± 0.9	0.781± 0.2	5 ± 0.3	3.125±0.9
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	3.125 ± 0.6	12.5±	0.8 ± 0.1	12.5 ± 0.9	3.125 ± 0.3	1.25 ±0.1	0.4 ± 0.1
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	1.563 ±0.1	12.5 ±0.5	1.5 ± 0.6	12.5 ±0.9	6.25 ± 0.1	2.5 ± 00	1.563 ± 0.5
Gram-positive bactérie							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.563 ± 0.1	12.5 ± 0.5	0.2 ± 0.0	12.5 ± 0.9	0.098 ±0.1	0.625 ±0.2	0.09 ± 0.0
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	3.125 ±0.6	12.5± 0.5	3.1 ± 0.5	12.5 ± 0.9	0.098 ± 0.1	2.5 ± 00	0.19 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3.125±0.6	12.5±0.5	0.05 ± 0.01	12.5 ± 0.9	6.25 ± 0.1	1.25 ± 0.1	1.56 ± 0.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	1.563 ± 0.1	1.563± 0.1	3.1 ± 0.8	12.5 ±0.9	0.781 ± 0.2	5 ± 0.3	3.125 ±0.9
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	12.5 ± 0.9	25 ± 0.1	0.02 ± 0.01	6.25 ± 0.1	6.25 ± 0.1	1.25 ± 0.1	6.25 ± 0.2

Les valeurs sont représentées comme moyennes ± SEM; S: Synergie; *T.f/R.o*: mélange de *T. fontanesii* et *R. Officinalis* (1/1); *T.f/S.a*: mélange de *T. fontanesii* et *S. argentea* (1/1); *R.o/S.a*: mélange de *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1); *T.f /R.o /S.a*: mélange de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1/1)

Tableau 20. Concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association

Microorganismes	CMB (mg/ml)						
	Huiles essentielles			Mélange des huiles			
	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/R.o /S.a</i>
Gram-négative bactéries							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	12.5 ± 0.9	25 ± 1.5	1.5 ± 0.4	12.5 ± 1.5	6.25 ± 0.05	20 ± 1.5	3.12 ± 0.01
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	3.12 ± 0.6	25 ± 0.9	3.1 ± 0.8	12.5 ± 0.9	12.5 ± 0.9	20 ± 0.9	1.56 ± 0.01
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	3.12 ± 0.1	25 ± 1.5	1.5 ± 0.6	12.5 ± 0.9	6.25 ± 0.8	10 ± 0.6	12.5 ± 0.9
Gram-positive bactérie							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.12 ± 0.6	25 ± 1.5	0.2 ± 0.01	12.5 ± 1.5	0.781 ± 0.01	2.5 ± 0.01	0.195 ± 0.01
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	6.25 ± 0.05	25 ± 0.9	3.1 ± 0.8	50 ± 1.5	3.125 ± 0.05	2.5 ± 0.4	3.12 ± 0.01
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	6.25 ± 0.9	25 ± 0.6	0.2 ± 0.01	12.5 ± 0.6	6.25 ± 0.9	5 ± 0.4	6.25 ± 0.4
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	1.56 ± 0.01	6.25 ± 0.6	3.1 ± 0.4	12.5 ± 0.1	6.25 ± 0.6	5 ± 0.05	3.12 ± 0.6
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	50 ± 1.5	25 ± 1.5	0.1 ± 0.01	50 ± 1.5	6.25 ± 0.6	2.5 ± 0.01	6.25 ± 0.6

Les valeurs sont représentées comme moyennes ± SEM; S: Synergie *T.f/R.o*: mélange de *T. fontanesii* et *R. Officinalis* (1/1); *T.f/S.a*: mélange de *T. fontanesii* et *S. argentea* (1/1); *R.o/S.a*: mélange de *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1); *T.f/R.o /S.a*: mélange de *T. fontanesii*, *R. officinalis* et *S. argentea* (1/1/1)

Tableau21. Effets bactéricides et bactériostatiques des huiles essentielles étudiées individuellement ou en association

Microorganismes	CMB/ CMI						
	Huiles essentielles			Mélange des huiles			
	<i>T. fontanesii</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>S. argentea</i>	<i>T.f/R.o</i>	<i>T.f/S.a</i>	<i>R.o/S.a</i>	<i>T.f/R.o /S.a</i>
Gram-négative bactéries							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2	1	4	1	8	4	1
<i>P. aeruginosa</i> Cip A22	1	2	4	1	4	16	4
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	2	2	1	1	1	4	8
Gram-positive bactérie							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	2	1	1	8	4	2
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	2	2	1	4	32	1	16
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	2	2	4	1	1	4	4
<i>E. faecalis</i> ATCC 7314	1	4	1	1	8	1	1
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	4	1	5	2	1	2	1
Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm SEM; S: Synergie; <i>T.f/R.o</i> : mélange de <i>T. fontanesii</i> et <i>R. Officinalis</i> (1/1); <i>T.f/S.a</i> : mélange de <i>T. fontanesii</i> et <i>S. argentea</i> (1/1); <i>R.o/S.a</i> : mélange de <i>R. officinalis</i> et <i>S. argentea</i> (1/1) ; <i>T.f /R.o /S.a</i> : mélange de <i>T. fontanesii</i> , <i>R. officinalis</i> et <i>S. argentea</i> (1/1/1)							

Discussion

De nombreux travaux rapportés que l'activité biologique d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires, plus particulièrement la nature de leurs groupements fonctionnels et les possibles effets synergiques entre les constituants [63], cette activité est encore attribuable à une ou plusieurs molécules actives présentes même en faible proportion dans les huiles essentielles qui peuvent agir de manière synergique [60,62].

Ainsi la plupart des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont dues à la présence de terpénoïdes oxygénés, en particulier de terpènes phénoliques, de phénylpropanoïdes et d'alcools. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées [60].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles dépend également du type des microorganismes ciblés, elle est variable d'une souche bactérienne à une autre. Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques [63]. En effet dans cette étude, toutes les huiles essentielles examinées ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées. D'après les zones d'inhibition générées par les huiles essentielles étudiées, les huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticulata* et *T. fontanesii* ont présenté les meilleures activités sur l'ensemble des souches testées. Tandis que celles de *S. candidissima* et *R. officinalis* ont affichées une activité modérée si non moyennement faible vis-à-vis de toutes les bactéries testées. Le potentiel inhibiteur des huiles essentielles a été confirmé par les tests de la détermination des CMI.

L'huile essentielle de *S. argentea* a affiché des effets inhibiteurs remarquables contre la majorité des souches y compris *L. rhamnosus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* avec des CMI allant de 0.02 à 0.8mg/ml. Cette activité antibactérienne peut être expliquée par la richesse de cette huile en diterpènes oxygénés (48,3%) tels que le ferruginol (19,5%), le dihydroferruginol, le cis-ferruginol et l'abitatriène qui sont

présents à des proportions importantes. Selon quelques études réalisées sur les diterpènes de type abiétane tel que le ferruginol, qui montrent que ces composés renferment diverses activités biologiques notamment antifongiques et antibactériennes [198, 210,211].

Une corrélation entre l'efficacité antibactérienne obtenue dans les huiles essentielles et leur composition chimique suggère que cette activité peut être attribuée à la présence de la concentration relativement élevée en carvacrol et en thymol. Plusieurs rapports ont montré que le carvacrol et le thymol exercés un effet antibactérien important, ces deux molécules semblent capables de libérer les lipo-polysaccharides et d'augmenter la perméabilité membranaire en désintégrant la membrane externe des bactéries [33,64,212,213].

En effet, les huiles essentielles de *A. verticillata* riche en carvacrol a présenté des effets antimicrobiens important contre les deux souches fongiques *C. albicans ATCC 10231* (CMI=0.4mg/ml) et *C. albicans ATCC 4226* (CMI=0.8mg/ml). Tandis que les CMI les plus faibles vis-à-vis des souches bactériennes ont été observées chez *E. coli* (0,2 mg/ml), *L. rhamnosus* (0,4 mg/ml), *B. cereus* (0,2 mg/ml) et *S. Typhi* (0,2 et mg/ml). Selon l'étude réalisée par Attou et al, les HEs de *A. verticillata* ont montré une forte activité antimicrobienne contre cinq souches bactériennes et une souche fongique avec des CMI allant de 0.78 à 2.34 mg/ml [82].

La présence d'une quantité importante de carvacrol et de p-cymène dans l'HE de *A. verticillata* explique aussi bien sa forte activité antimicrobienne due à l'effet synergique remarquable résultant entre ces deux molécules [34].

Il est intéressant de noter que les deux huiles essentielles de *A. verticillata* et de *S. argentea* testées ont enregistré des résultats de CMI très efficaces ainsi des effets bactéricides contre la souche bactérienne *Salmonelle typhi* sachant que plusieurs recherches ont montré que cette bactérie a Gram-négatif à présenter une très grande résistance aux agents antimicrobiens. En effet, pour les différentes huiles testées, la souche *Pseudomonas aeruginosa* à Gram (-) semble être la plus résistant avec des CMI variant entre 0.4 à 12.5 mg/ml. Ceci est en relation avec la nature de sa membrane externe. En parallèle les bactéries à Gram positif ont été un peu plus sensibles que les souches à Gram négatif.

L'importance microbienne de l'huile essentielle de *T. fontanesii* est en relation avec sa teneur élevée en thymol (76.6 %). Les deux bactéries à Gram (+) ; *S. aureus* et *E. faecalis*, et la bactérie à Gram (-) ; *S. typhi* se sont avérées être les agents pathogènes les plus inhibés par l'huile essentielle de *T. fontanesii* avec une CMI de l'ordre de 1.56 mg/ml et des CMB allant de 1.56 à 3.12 mg/ml avec des effets bactéricides sur l'ensemble des souches testées. Cependant, plusieurs auteurs avancent que les huiles essentielles riches en dérivé phénolique tel que le thymol, possèdent des activités antimicrobiennes intéressantes [33,64,70].

Selon l'étude réalisée par Dob et al, l'huile de *T. fontanesii* a exercé une forte activité antifongique et antibactérienne notamment contre les bactéries à Gram positif [160].

L'huile essentielle de *S. candidissima* a présenté une activité antimicrobienne modérée sur la majorité des souches testées, la souche la plus sensible a été *E. coli* avec une CMI de 1.5 mg/ml, cette activité peut être due par la teneur élevée du pulegone (32,1%). En effet les propriétés antimicrobiennes de l'huile de *Calamintha nepeta* et son chémotype la pulégone a été déjà étudiée et a prouvé son efficacité [116, 214,215].

D'autre par les CMI enregistrées par la combinaison des huiles de *S. argentea* et de *A. verticulata* semblent présenter les meilleurs effets inhibiteurs sur *E. coli*, *S. Typhi*, *C. sporogenes* et *E. faecalis* avec respectivement des CMI de 0.1 mg/ml, 0.7 mg/l, 0.8 mg/ml et 0.7 mg/ml, cela peut être expliqué par l'effet synergique exercé par les composés qui sont présents dans le mélange, c'est-à-dire l'association de carvacrol (27,9%), le limonène (12,7%), la pulegone (12,6%), le p-cymène(12,6%), de γ -terpinène (7,5%), (E)-phytol (5.1%), abietatriène (3.6%) et ferruginol (2.1%).

Cependant la combinaison des 3 huiles essentielles de *S. argentea*, *A. verticulata* et *S. candidissima* été efficace contre les souches de *E. Coli* et *B. cereus* avec respectivement des CMI de 0.4 mg/l et 0.7 mg/ml, cette activité peut être due par l'augmentation du pourcentage du pulegone (32,1%).

Le mélange des 3 huiles essentielles de *T. fontanesii* /*S. argentea*/*R. officinalis* présente l'effet inhibiteur le plus important vis-à-vis de la souche

P. aeruginosa à Gram(-) (CMI=0.4mg/ml). Il s'avère que l'association du thymol, ferruginol et du p-cymène, augmente considérablement l'activité antimicrobienne, c'est à dire un effet synergique important.

Certains chercheurs ont étudié l'effet synergique ou antagoniste des mélanges des huiles essentielles tel que : (*Thymus vulgaris* et *Pimpinella anisum*), et (Fennel, coriander, Ajowan et Caraway) [205,216]. D'autres mélanges des huiles essentielles ont également prouvé leur efficacité y compris l'origan et le thym, l'origan et la marjolaine, le thym et la sauge qui ont exercé un fort pouvoir antibactérien contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* [191]

De façon générale le mode d'action des huiles essentielles dépend du type et des caractéristiques des composants actifs, notamment 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 des enzymes de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺): ce mécanisme a été prouvé contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* [217].

IV. MATERIELS ET METHODES

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1. Matériel végétal

La matière végétale de *Ammoides verticillata*, *Satureja candidissima*, *Salvia argentea*, *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba-alba* ont été identifiées conjointement avec le Professeur BNABADJI NOURY du Laboratoire de botanique d'Ecologie et gestion des écosystèmes de l'Université de Tlemcen et le Docteur HASSANI CHOUKRI du laboratoire de botanique, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

Pour chaque espèce étudiée, le matériel végétal a été prélevé sur plusieurs endroits réparties dans la wilaya de Tlemcen, Ain Témouchent et Sidi Bel Abbès. Les campagnes d'échantillonnage se sont déroulées sur diverses périodes de l'année en fonction de l'état végétatif (Tableau 22). Les parties utilisées ont été coupées en petit morceaux, séchées dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter toute modification ou dégradation des constituants présents.

Les coordonnées GPS des différentes stations sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 23 : Répartition géographique des différents échantillons étudiés

Echantillons	Régions	Altitudes (m)	CordonnéesGPS
<i>A. verticillata</i>			
S1	Sidi Safi 1	250	35°16'26.89"N
S2	Sidi Safi 2	220	35°16'36.01"N
S3	Sidi Safi 3	200	35°15'53.11"N
S4	Beni saf	185	35°15'59.41"N
S5	Zarifet	835	34°51'8.37"N
S6	Ain fettouh	1125	34°50'8.77"N
S7	Mafrouche (Terny)	1100	34°47'46.41"N
S8	Lalla Setti	1000	34°51'57.59"N
<i>S. argentea</i>			
S1	Sidi Belabbes (Tanezera) I	764	34°58'18.73"N
S2	Sidi Belabbes (Tanezera) II	891	34°58'32.16"N
S3	Ain Témouchent (Aghlal) I	535	35°12'26.13"N
S4	Ain Témouchent (Aghlal) II	544	35°12'8.33"N
S5	Sidi Belabbes (Sidi Ali Benyoub) I	820	34°54'59.06"N
S6	Sidi Belabbes (Sidi Ali Benyoub) II	852	34°55'46.58"N
<i>S. candidissima</i>			
S1	Sidi Safi 1	215	35°16'46.74"N
S2	Sidi Safi 2	222	35°16'43.96"N

S3	Sidi Safi 3	263	35°16'22.58"N
<i>T. fontanesiia</i>			
S1	Sebdou	1157	34°39'33.3"N
<i>A. herba-alba</i>			
S1	Sebdou (Gor)	1257	34°42'01.7"N
<i>R. officinalis</i>			
S1	Plateau Lalla Setti (parc notionnel de Tlemcen)	1026	34°38'00.0"N

IV.2. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type clevenger dans le respect du procédé validé par la pharmacopée européenne. La matière végétale (500-700g) a été distillée pendant 5h. Les huiles essentielles récupérées ont été conservées dans des flacons en verre ambré à une température de 4°C.



Figure 27 : Dispositif de l'extraction des huiles essentielles de type Clevenger

IV.3. Rendement

Le rendement en huile essentielle est défini par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage (%), et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1/P2) \times 100 \quad (\text{AFNOR 1986}).$$

P1: poids du de l'huile essentiel extraite

P2: poids de la matière végétale séché de départ.

IV.4. Fractionnement des huiles essentielles par chromatographie sur colonne

C'est une méthode de séparation et de purification des constituants d'un mélange par migration dans une colonne qui est constituée de deux phases ; une phase stationnaire (gel de silice) et une phase mobile (éluant). Cette technique exploite la différence de polarité entre les composés, ce qui permet la séparation des molécules.

Le fractionnement des huiles essentielles a été réalisé sur une colonne chromatographique frittée, celle-ci a été remplie par un mélange de silice-pentane qui constitue la phase stationnaire. On a introduit 2g de notre échantillon. L'élution a été effectuée par gradients de polarité dans le but de séparer les hydrocarbonés des oxygénés. En premier nous avons utilisé le pentane (moins polaire) pour récupérer la fraction hydrocarbonée. En seconde lieu, nous avons utilisé de l'éther afin de récupérer les fractions oxygénées.



Figure 28 : Fractionnement des huiles essentielles

Les fractions oxygénées ont été récupérées et analysées dans le but d'identifier leurs profils chimiques et par la suite l'évaluation des activités biologiques.

IV.5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles, leur mélange ainsi que les deux fractions oxygénées.

L'analyse des huiles essentielles, c'est une étape importante qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, pour en contrôler la qualité et la régularité en vue de sa valorisation. Pour déterminer la nature des constituants d'un mélange complexe l'analyse s'effectue

habituellement par le couplage d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la SM. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine des huiles essentielles c'est-à-dire les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification.

IV.5.1. Analyse par CPG/FID

Les analyses CPG ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600 GC (Walhton, MA, USA) équipé d'un seul injecteur et d'un système de détection d'ionisation à double flamme (FID). L'appareil est doté simultanément de deux colonnes capillaires en silice fondue (60m x 0,22 mm ID, épaisseur du film 0,25 µm) avec différentes phases stationnaires : apolaire Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et polaire Rtx-Wax (polyéthylène glycol). La température a été programmée de 60°C à 230°C à 2 °C/min et ensuite maintenue isothermiquement à 230°C pendant 30 minutes. La température de l'injecteur et du détecteur a été maintenue à 280 °C.

Les échantillons ont été injectés en mode split avec un rapport de fraction de 1/80. L'élution est assurée par un gaz vecteur de l'hydrogène, avec un débit de 0,7 ml/ min. Le volume injecté est de 0,1 µL. Les indices de rétentions (IR) des composés ont été déterminés à partir du logiciel Perkin-Elmer.

IV.5.2. Conditions CPG-SM

Les huiles essentielles ont été analysées à l'aide d'un analyseur quadripolaire Perkin Elmer Turbo Mass, directement couplé à un Perkin Elmer Autosystem XL doté de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 µm), apolaire Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et polaire RtxWax (polyéthylène glycol). Les autres conditions de GPC (programmation de température, gaz vecteur, etc.) sont les mêmes que celles décrites ci-dessus. Les spectres de masse obtenus par impact électronique (EI) ont été acquis avec une plage de masses de 35 à 350 Da, un temps de balayage de 1s. la température de la source d'ions est de 150 °C avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Le volume injecté d'huile était de 0,1 µL et le volume de fraction injectée de 0,2 µL.

IV.6. Identification des composés

L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison :

(i) Des indices de rétention, calculés respectivement sur colonne polaire et apolaire avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux rapportés dans la littérature

(ii) Des spectres de masse (impact électronique) avec ceux de composés standards (bibliothèque laboratoire) ou ceux présents dans les banques informatisées.

IV.7. Quantification des composés

La quantification des constituants a été réalisée à l'aide d'un Détecteur à Ionisation de Flamme par normalisation interne des aires des pics à l'aide des facteurs de réponses calculés par rapport au tridécane utilisé comme étalon interne, selon la méthode décrite par [218] et adaptée au sein du laboratoire CPN [219].

IV.8. Outil statistique

Les études statistiques ont été menées avec le logiciel R (R Foundation – Institute for Statistics and Mathematics, Autriche). Les Analyses en Composante Principale (ACP) ont été réalisées avec des matrices de type Pearson en utilisant la fonction « PCA ». Les Classifications Ascendante Hierarchique (CAH) et les dendrogrammes résultants ont été effectuées avec des matrices de dissimilarités calculées en distance euclidienne et la méthode d'agrégation choisie systématiquement est le lien moyen (package « classif »).

IV.9. Activités biologiques

IV.9.1. Activité antioxydante

IV.9.1.1. Piégeage du radical libre DPPH

Une solution éthanolique de 0,06 mM de DPPH \cdot est mélangée avec différentes concentrations des huiles essentielles. Mettre 1mL de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1mL de solution éthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur. Répéter les mêmes opérations, en remplaçant les

extraits par le BHT (control positif) et l'éthanol pur (control négatif). Toutes les opérations sont réalisées en triplicata [220].

$$I\% = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC: Absorbance du contrôle ; **AT:** Absorbance des échantillons tester

- Calcul des IC₅₀ : IC₅₀ ou concentration inhibitrice à 50% est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°.



Figure 29 : Réduction du radical DPPH du violet au jaune.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

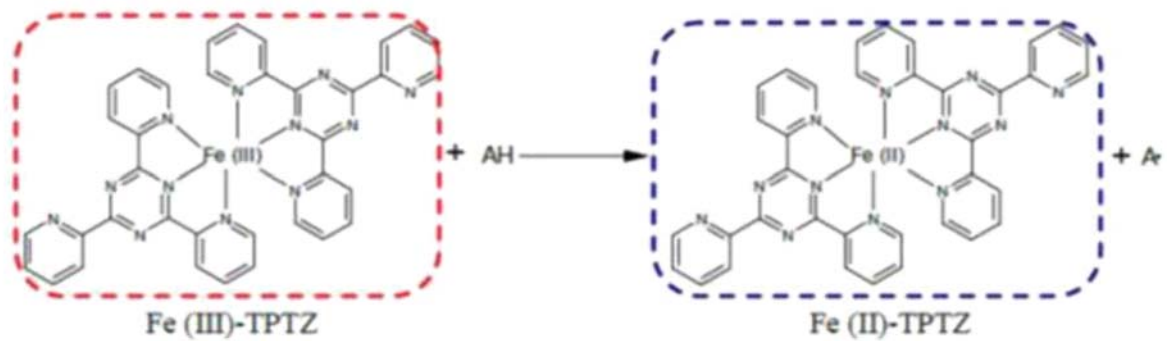
IV.9.1.2. Réduction du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP)

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu (1986) [221]. Les différentes concentrations des extraits dans l'éthanol (1 ml) sont mélangées avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium [K₃ Fe(CN)₆] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml de l'eau distillée et 0,5 ml de FeCl₃, 6H₂O (0.1%).

Après 30 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 700 nm en utilisant un spectrophotomètre à double faisceaux visible. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. Les analyses ont été réalisées en triple. Une absorbance accrue de la réaction signifie une

puissance réductrice accrue et comparée à celle de l'acide ascorbique comme référence. Activité chélatant des ions ferreux est testée pour évaluer l'interaction composé-fer, nous avons réalisé le test de Ferrozine qui évalue la capacité d'interaction avec le fer, empêchent la formation du complexe entre la forme métallique réduite et le ferrozine (Figure 30).

Figure 30. Mécanisme réactionnelle de la méthode FRAP



IV.9.2. Activité antimicrobienne

IV.9.2. 1. Matériel biologique

L'examen de l'activité antimicrobienne a été testé pour leur effet inhibiteur sur 11 souches bactériennes et 2 souches fongique. Les souches utilisées dans les tests c'est des souches de références font parties des microorganismes qui sont des pathogènes et des contaminants. Leur croissance est réalisée à 37°C en milieu liquide Mueller-Hinton Broth (MHB) et sur gélose Mueller-Hinton. La solubilisation des huiles essentielles a été réalisée dans DMSO (sulfoxyde de diméthyle, Sigma-Aldrich). L'activité antimicrobienne de ces solvants a été préalablement testée : aux concentrations utilisées, ils sont sans effet sur la croissance bactérienne. Le support microbien est composé selon le tableau suivant :

Tableau 23: Origines des souches utilisées dans les différents tests de l'activité antibactérienne.

	Microorganismes	Gram	code
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	Negatives	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
	<i>Salmonella typhi</i>		ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positives	ATCC 43300
	<i>Clostridium sporogenes</i>		ATCC 19404
	<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i> ()		ATCC 7314
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		ATCC 53103
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	
	Levures	<i>C. albicans</i>	
<i>C. albicans</i>			ATCC 4226

IV.9.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par disque.

Cette méthode reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance. Les boîtes de Pétri sont déposées à 4°C pendant 02 heures pour permettre une diffusion des huiles essentielles. Après incubation à 37°C pendant 24h la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition où les bactéries n'ont pas pu se développer. Pour chaque essai 3 tests ont été réalisés [222].

Des disques des antibiotiques ont été utilisés : ampicilline (10µg) comme une molécule de référence.

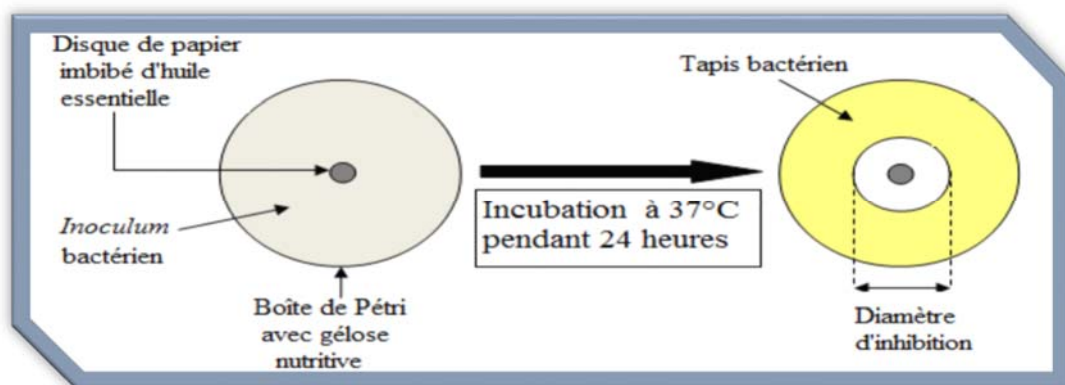


Figure31 : Principe de la méthode de diffusion par disque

Lecture des résultats :

L'Effet des huiles se traduit par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance dont la mesure de la distance de la zone est interprétée comme étant : sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [223]

- (-) souche résistante ($D < 8$ mm)
- (+) souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- (+ +) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)

- (+ + +) extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

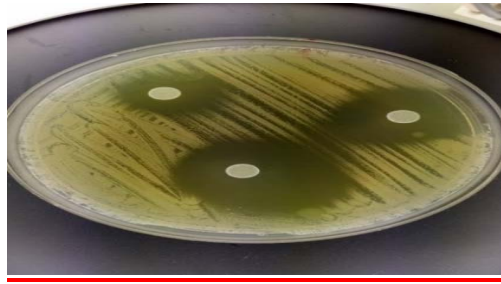


Figure 32 : Exemple d'une zone d'inhibition correspondant à l'absence de la croissance des bactéries

IV.9.2. 3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Technique de microdilution en milieu liquide

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

L'huile essentielle à tester est dissoute dans DMSO versé dans des microtube stériles, contenant du Mueller-Hinton Broth (MHB). La gamme de concentration est reproduite dans une microplaque à 96 puits, après 18 heures d'incubation à 37°C, la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne, Chaque test a été réalisé trois fois au cours de trois expériences successives [222].



Figure 33: Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)
Par la Technique de microdilution en milieu liquide.

IV.9.2. 4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB et CMF) en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

Juste après la lecture des résultats de CMI des prélèvements sont effectués dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés «en strie» sur gélose MH. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C [222].

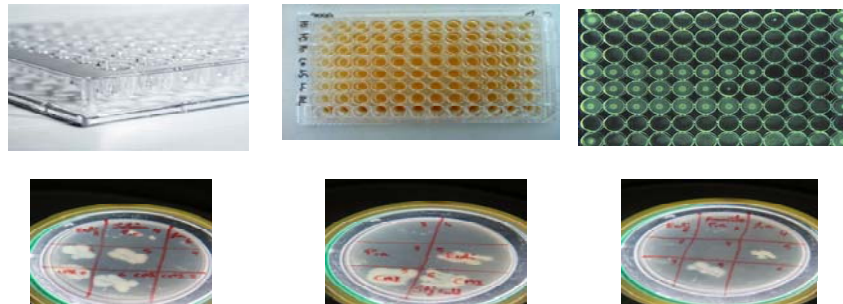


Figure 34 : Evaluation de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB et CMF) en milieu solide

Conclusion

L'importance économique des plantes médicinales sur la scène internationale réside dans leurs bienfaits sur la santé, attribués probablement à la présence des composés biologiques, notamment les composés phénoliques et les composés terpéniques. Les plantes aromatiques sont des sources d'huiles essentielles, leurs composés aromatiques sont utilisés dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

En général, les huiles essentielles ont été reconnues comme une ressource naturelle importante, elles possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés : antibactériennes, antiinflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, stimulantes, calmantes et relaxantes.

L'objectif principal de ce travail était la caractérisation chimique et biologique de six plantes médicinales poussant à l'état spontané dans l'ouest Algérien pour leurs utilisations médicinales qui peuvent être en lien avec leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Il s'agit de *Ammoides verticillata*, *Satureja candidissima*, *Salvia argentea*, *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba-alba*. Ces plantes sont aussi largement utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne.

Par ailleurs nous nous sommes intéressés également dans ce travail à étudier la composition chimique des mélanges des huiles essentielles ainsi que leurs effets synergiques sur l'activité antioxydante et antimicrobienne de ces six plantes. Et en fin l'étude de la fraction oxygénée des deux huiles essentielles de *T. fontanesii* et *R. officinalis* ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante séparément et en combinaison.

Le travail mené sur les profils chimiques des différentes huiles essentielles, leur mélange ainsi que les fractions oxygénées a montré que toutes les fractions des huiles essentielles des six plantes étudiées présentent des molécules intéressantes.

L'huile essentielle de *A. verticillata* a été riche par le carvacrol, le limonène, p-cymène et le γ -terpinène. L'étude a permis de mettre en évidence une variabilité chimique de l'huile essentielle en fonction des conditions d'habitat des spécimens étudiés. Ainsi, le carvacrol se retrouve

préférentiellement dans les huiles essentielles préparées à partir de végétaux récoltés dans les sites à faible altitude et un climat humide, alors que le thymol était le constituant le plus abondant dans les sites à haute altitude et un climat humide et plus frais.

L'huile essentielle des racines de *S. argentea* a été riche en composés oxygénés comme le ferruginol, la pulegone, le (E)-phytol, le 6,7 dihydro ferruginol et l'abiatatriène, alors que, les principales composantes de l'huile essentielle des parties aériennes ont été les sesquiterpéniques oxygénés dominées principalement par le germacrene D-4-ol, τ -muurolol et le τ -cadinol (13.2%).

L'huile essentielle de *S. candidissima* a été caractérisée principalement par la pulegone, le menthol et l'iso-menthone. L'huile essentielle de *T. fontanesii* a été riche en thymol et le p-cymène, alors que l'huile essentielle de *Artemisia herba-alba* a été riche en camphre, chrysanthenone, 1,8-cinéole et en camphène. L'huile essentielle de *R. officinalis* a été caractérisée par la présence de 1,8-cinéole, l' α -pinène, le bornéol, le camphre, et le verbénone.

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des mélanges par les méthodes DPPH et FRAP, ont montré que les huiles essentielles et leurs mélanges sont dotés d'un pouvoir antioxydant.

Les deux huiles essentielles de *A. verticillata* riche en carvacrol, *S. argentea* riche en diterpènes oxygénés, ont présenté le pouvoir antioxydant le plus élevé avec des IC₅₀ les plus faibles. Les huiles essentielles de *S. candidissima* (riche en pulégone), *T. fontanesii* (riche en thymol) et *R. officinalis* (une teneur appréciable en 1,8-cinéole) ont montré des effets antioxydants modérés. L'activité antioxydante la plus faible a été enregistrée pour l'huile de *A. herba-alba*.

Des effets antioxydants synergiques intéressants ont été observés dans les mélanges des HEs notamment entre *A. verticillata*/*S. candidissima* et *T. fontanesii*/*R. officinalis*/*A. herba alba* dépassent celle exprimée pour chaque huile testée individuellement et qui ont été parfois meilleurs que les antioxydants synthétiques.

Cela veut dire qu'il y a eu des effets synergiques entre les composants présents dans ces huiles réunies. En revanche la combinaison des deux huiles de *T. fontanesii*/*A. herba alba* et *A. verticillata*/*S. argentea* a montré des effets antagonistes par le test de DPPH.

Les fractions oxygénées des HEs de *T. fontanesii* et *R. officinalis* (riche en thymol et 1,8 cinéol) ainsi que leurs mélanges ont exprimé des effets antioxydants meilleurs que ceux des huiles correspondantes et des deux témoins, l'acide ascorbique et le BHT.

L'activité antimicrobienne a présenté également des effets inhibiteurs importants contre toutes les souches testées par les différentes huiles essentielles, soit individuellement ou en combinaison. Ainsi des effets bactéricides et fongicides ont été obtenus. Les microorganismes testés tel que *E. coli*, *S. typhi* et *S. Aureus* sont des espèces pathogènes responsables le plus souvent des contaminations alimentaires et des infections nosocomiales chez l'homme.

L'effet inhibiteur le plus important a été obtenu par l'HE de *S. argentea* qui a montré un très bon effet contre la majorité des souches y compris *L. rhamnosus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. Aeruginosa* avec des CMI allant de 0.02 à 0.8 mg/ml. Cette activité antibactérienne peut être expliquée par la richesse de l'huile en ferruginol, le dihydroferruginol, le cis-ferruginol et l'abitatriène présents à des proportions importantes.

Les huiles essentielles de *A. verticillata* riches en carvacrol ont présenté aussi une forte activité antimicrobienne contre deux levures fongique (*C. albicans* ATCC10231 et *C. albicans* ATCC4226) et quatre souches bactériennes avec des CMI allant de 0.2 à 0.8 mg/ml. On note également que l'huile de *T. fontanesii* riche en thymol a exercé une forte activité antibactérienne avec des effets bactéricides sur la majorité des souches testées notamment contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *E. faecalis*). Cependant, les HEs de *S. candidissima* et *R. officinalis* ont affichées une activité modérée si non moyennement faible vis-à-vis de toutes les bactéries testées.

L'association des huiles de *S. argentea* et de *A. verticulata* a permis de réduire considérablement les CMI de ces huiles individuellement ainsi de potentialiser leur activité notamment sur *E. coli*, *S. Typhi*, *C. sporogenes* et *E. faecalis*, cela peut être expliquée par l'effet synergique exercé par les composés présents dans ce mélange, c'est-à-dire à l'association du carvacrol, le limonène, la pulegone et le p-cymène.

D'autre part, le mélange des 3 huiles essentielles de *T. fontanesii*/*S. argentea*/*R. officinalis* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries notamment, *S. aureus*, *C. sporogenes* et *P. aeruginosa* qui se sont montrés les plus sensibles en fonction de leurs valeurs des CMI et de CMB. Il s'avère que l'association du thymol, ferruginol et du p-cymène, augmente considérablement l'activité antimicrobienne.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en évidence les propriétés antioxydantes des huiles essentielles étudiées ainsi que leurs propriétés antibactériennes à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes et vu des résultats des tests de synergie obtenus avec les mélanges de huile essentielle des différentes plantes étudiées, nous proposons d'étendre cette étude à bon nombre d'huiles essentielles que ce soit pour l'activité antioxydante ou antimicrobienne sur d'autres souches.

Nous proposons également d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces huiles essentielles telles que l'activité anti-inflammatoire, anticancéreuse, antidiabétique, antivirale, insecticide et larvicide.

Ces résultats antioxydants et antimicrobiens des huiles testées sont prometteurs et nous incitent à leur valorisation par la suite avec des tests *in vivo*, dans le but d'être utilisés comme des agents antioxydants et antibiotiques d'origine naturelle, alternatifs aux produits de synthèse.

Références bibliographiques

- [1] R. Bessah, E. H. Benyoussef. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socio-économiques. *Revue des Energies Renouvelables*. **2015**, 18(3), 513-528.
- [2] Rapport National. Etat des Ressources Phylogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture. *Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie*. **2006**.
- [3] Rapport National. Les plantes médicinales. *Institut Européenne des Substances Végétales*. **2015**.
- [4] S. Lamassiaude-Peyramaure. Actualités pharmaceutiques. *Elsevier Masson*. **2008**.
- [5] M.A. Serrano, D. Martí'nez-Romero, F. Guille'n, J.M. Valverde, P.J. Zapata, S. Castillo, D. Valero. the addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*. **2008**, 19, 464-471.
- [6] F. Bardeau. Les Huiles Essentielles : Découvrir les Bienfaits et les Vertus d'une Médecine Ancestrale. *Fernand Lanore*. **2009**.
- [7] R. Belabbes, M.A. Dib, N. Djabou, F. Ilias, B. Tabti, J. Costa, A. Muselli. Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chemistry and Biodiversity*. **2017**, 14, e1600482.
- [8] K. Medjdoub, F. Z. Benomari, N. Djabou, M. A. Dib, N. GaouarBenyelles, J. Costa, A. Muselli. Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four *Mentha* species, *Jundishapur. Journal of Natural Pharmaceutical Products*. **2019**, e64165.
- [9] C. Tefiani, A. Riazi, F. Youcefi, S. Aazza, C. Gago, M.L. Faleiro, L.G. Pedro, J.G. Barroso, A.C. Figueiredo, C. Megías, I. Cortés-Giraldo, J. Vioque, M.G. Miguel. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Resarch*. **2015**, 27(2), 1-9.
- [10] J. P. Willem, Huiles Essentielles Antivirales. *Guy Trédaniel, Paris*, **2015**.

- [11] L. Mouhi, H. Moghrani, N. Nasrallah, A. Amrane, R. Maachi. Anti-inflammatory activity of essential oil of an endemic *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. with chemotype carvacrol, and its healing capacity on gastric lesions. *Journal of Food Biochemistry*. **2017**,41(3), e12359.
- [12] P. Iserin. Encyclopédie des plantes médicinales, *Andrew Chevallier*. **2001**, 31.
- [13] M. Blumenthal. Herbal medicines: expanded commission E monographs. *Boston: Integrative Medicine Communications*. **2000**, 419-423.
- [14] E. Guenther. The Essential Oils. *Van Nostrand Company*. **1948**.
- [15] D. Baudoux. L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. *Amyris*. **2008**.
- [16] F. de Lannoy. Pestes et épidémies au moyen-âge. *International Standard Book Number*. **2016**.
- [17] J. Valnet. Aromathérapie traitement des maladies par les essences de plantes. *Maloine*. **1984**.
- [18] S. Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. **2004**, 94(3), 223-253.
- [19] Rapport National. Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”. *Association Française de Normalisation*. **1986**.
- [20] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 446-475.
- [21] T. Essawi, M. Srour. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Of Ethnopharmacology*. **2000**, 70, 343-349.
- [22] M.C. Pibiri. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat. *Polytechniques Fédérale de Lausanne, France*. **2005**.
- [23] S. Rekkab, I. Abaza, S. Chibani¹, A. Kabouche¹, Z. Kabouche. Chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Artemisia herba-alba* Asso. from Oum El-Bouaghi (Algeria) and chemotaxonomic survey. *Journal of Materials and Environmental Science*. **2016**, 7(12), 4383-4390.
- [24] S.S. Cheng, M.T. Chua, E.H. Chang, C.G. Huang, W.J. Chen, S.T. Cheng. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf

essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresource Technology*. **2009**, 100, 465-470.

[25] J.D. Thompson, J.C. Chalchat, A. Michet, Y.B. Linhart, B. Ehlers. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *Journal of Chemical Ecology*. **2003**, 29 (4), 859-880.

[26] K. Loziene, Pr. Venskutonis. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2005**, 33 (5), 517-525.

[27] I. Telci, I. Demirtas, A. Sahin. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*F. vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products*. **2009**, 30, 126-130.

[28] A. Angioni, A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2006**, 54 (12), 4364-4370.

[29] M. Hudaib, E. Speroni, A.M. Di. Pietra, V. Cavrini. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variation during the vegetative cycle, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. **2002**, 29, 691-700.

[30] P. Morin, H. Richard. Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation in Proc. *Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam*. **1985**, 563-576.

[31] T.S. Fellah, P.N. Diouf, M. Petrissans, D. Perrin, M. Romdhane, M. Abderrabba. Chemical composition and antioxidant properties of *Salvia officinalis* L. oil from two culture sites in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*. **2006**, 5, 553-556.

[32] G. Alitonou, F. Avlessi, V.D. Wotto, E. Ahoussi, J. Dangou, C.K. Dominique. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. *Comptes rendus Chimie*. **2004**, 1051-1055.

[33] R.J.W. Lambert, P.N. Skandamis, P. J. Coote, G. J. Nychas. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential

oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. **2001**, 91, 453-462.

[34] A. Ultee, R.A. Slump, G. Steging, E.J. Smid. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*. **2000**, 63(5), 620-624.

[35] S.D. Cox, C.M. Man, J.L. Markham. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. **2001**, 91 (3), 492-497.

[36] G.W. Burton, T. Doba, E.J. Gabe, L. Hughes, F.L. Lee, L. Prasad, K.U. Ingold. Autoxidation of biological molecules. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *Journal of the American Chemical Society*. **1985**, 107 (24), 7053-1065.

[37] W. Sunan, A.M. Kelly, F.M. Massimo, K. Yukio, T. Rong, Synergistic, Additive, And Antagonistic Effects of Food Mixtures On Total Antioxidant Capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59 (3), 960-968.

[38] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Essential Oils as Anticancer Agents: News on Mode of Action. *Phytothérapie*. **2016**, 16 (5), 254-267.

[39] P. Arpino, A. Pervot, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol, P. Witier, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson*. **1995**, 700.

[40] M. Brattoli, E. Cisternino, P.R. Dambruoso, G. de Gennaro, P. Giungato, A. Mazzone, J. M. Palmisani, Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds. *Journal of Sensors Basel*. **2013**, 13(2), 16759- 800.

[41] F. Giudicelli. Caractérisation De Nouvelles Molécules Et Variabilité Chimique De Trois Plantes Du Continuum Cors et Sardaigne: *Chamaemelum Mixtum, Anthemis Maritima Et Eryngium Maritimum*. Thèse de doctorat. Université Pascal Paoli, *Corse, France*. **2011**.

[42] E. De Hoffman, J. Charrette, V. Strootbant. Spectrométrie de masse. *Librairie Dunod*. **1999**, 339.

[43] R.G. Brereton. Chemometrics: Data Analysis of the Laboratory and Chemical Plant. *Wiley Interscience*. **2003**, 504.

- [44] O.I. Aruoma, Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**, 75(2), 199-212.
- [45] A.E. Edris. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. **2007**, 21, 308-323.
- [46] B. Halliwell. Antioxidant characterization, *Methodology and mechanism*. **1995**, 49, 1341-1348.
- [47] R.L. Prior, G. Cao. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**, 27, 1173-1181.
- [48] J.K. Moon, T. Shibamoto. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2009**, 57, 1655-1666.
- [49] C. EL Kalamouni. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat, *Université de Toulouse*. **2010**.
- [50] J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon. Antioxidants in food, Practical applications. *Woodhead Publishing Limited*. **2001**, 288.
- [51] A.L. Branen. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1975**, 52,59-63.
- [52] R. Linderschmidt, A. Trylka, M. Goad, H. Witschi. The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*. **1986**,38, 151-160.
- [53] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. **1995**, 22, 375-383.
- [54] M.L. Tsai, C.C. Lin, W.C. Lin, C.H. Yang. Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2011**,75(10),1977-1983.
- [55] R. Amorati, M.C. Foti, L. Valgimigli. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*. **2013**, 61(46),10835-10847.

- [56] G. Ruberto, M.T. Baratta. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Journal of Food Chemistry*. **2000**, 69, 167-174.
- [57] Y. Lu et L.Y. Foo. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Journal of Food Chemistry*. **2001**,75(2), 197-202.
- [58] F. Candan, M. Unlu, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen, H.A. Akpulat. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**, 87, 215-220.
- [59] M.J. Mendoza-Yepes, L.E. Sanchez-Hidalgo, G. Maertens, F. Marin-Iniesta. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) en Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*. **1997**, 17, 47-55.
- [60] M.T. Daouda. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'Ivoire. *Thèse de doctorat, Université de Félix Houphouët- Boigny*. **2015**.
- [61] R. Schwartz, R. Davis, T.J. Hilton. Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *the American Journal of Dentistry*. **1992**, 5(3), 147-150.
- [62] M. Lahlou. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. **2004**, 18, 435-448.
- [63] K.R. Oussou, S. Youlou, C. Kanko, K.N. Guessennd, J.B. Boti, C. Ahibo, J. Casanova. Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Reaserch*. **2008**,1, 94-103.
- [64] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, A. Wattanasatcha, S. Rengpipat, S. Wanichwecharu, Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*. **2012**, 434, 360-365.
- [65] J. Mastelić, I. Jerković, I. Blažević, M. Poljak-Blaži, S. Borović, I. Ivančić-Baće, V. Smrečki, N. Zarcović, K. Brčić-Kostić, D. Vikić-Topić, N.Müller. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**,56, 3989-1996.

- [66] R.S. Farag, Z.Y. Daw, F.M. Hewedi, G.S.A. El-Baroty. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*. **1989**, 52 (9), 665-667.
- [67] A. Pauli. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal Aromatherapy*. **2001**, 11, 126-133.
- [68] D. Fabian, M. Sabol, K. Domaracké, D. Bujnéková, Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro*. **2006**, 20, 1435-1445.
- [69] A.O. Gill, P. Delaquis, P. Russo, R.A. Holley. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*. **2002**, 73, 83–92.
- [70] H.J.D. Dorman, S.G. Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **2000**, 88, 308-316.
- [71] J. Wan, A. Wilcock, M.J. Coventry. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. **1998**, 84, 152-158.
- [72] P. Quezel, S. Santa. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Centre National de la Recherche Scientifique, Paris*. **1963**, Tome II.
- [73] C. Bekhechi. Analyse des huiles essentielles de quelque espèces aromatiques de la région de Tlemcen par (CPG-Ir, CC, CPG-SM et RMN 13C) et étude de son pouvoir antimicrobien. *Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen*. **2009**.
- [74] J. Bellakhdar. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*. **1997**.
- [75] E.M. El Ouariachi, P. Tomi, A. Bouyanzer, B. Hammouti, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Paolini. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*. **2011**, 49, 533-536.
- [76] T. Baytop, N. Sütlüpinar. Characteristics of « Nanahan » cultivated in Anatolia and its volatile oil, *Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul*. **1986**, 22, 73-76.

- [77] V.A. Parthasarathy, B. Chempakam, T.J Zachariah. Chemistry of spices. *CAB International, Wallingford*. **2008**,312-318.
- [78] N. Daira, M.C. Maazi, A. Chefrour. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **2016**, 85, 276-290.
- [79] N. Kambouche, D. El-Abed. Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachysper mumammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *Journal of Essential Oil Research*. **2003**, 15(1) 39-40.
- [80] C. Bekhechi. Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. *Thèse de Magister, Université Abou Bekr Belkaïd*. **2002**.
- [81] D.E. Abdelouahid, C. Bekhechi. Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha). *Biologie et Santé*.**2004**, 4, 91-100.
- [82] A. Attou, D. Davenne, A. Benmansour, H.A. Lazouni. Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie*. **2017**,1-7.
- [83] J.B. Walker, K.J. Sytsma, J. Treutlein, M. Wink. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation, and ecological specialization of *Salvia* and Tribe *Menthae*. *American Journal of Botany*. **2004**, 91, 1115-1125.
- [84] P. Hamlyn. The Marshall Cavendish, Encyclopedia of Gardening. *Garrod and Lofthouse International, London*.**1969**, 19.
- [85] M. Grieve, A modern Herbal. *Penguin Presse, London*.**1980**,700-705.
- [86] L. Riccobono. A. Maggio, S. Rosselli, V. Ilardi, F. Senatore, M. Bruno. Chemical composition of volatile and fixed oils from of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research*. **2015**, 30, 25-34.
- [87] B. Clebsch, C.D. Barner. The new book of Salvias: sages for every garden. *Timber Press, Portland*.**2003**, 115-117.
- [88] W. Tehami. Caractérisation phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de *salvia argentea*. *Thèse de doctorat, Université Sidi Bel Abbes*. **2009**.

- [89] B. Tepe, D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen, M. Polissiou. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Journal of Food Chemistry*. **2005**, 90,333–340.
- [90] I. Kivrak, M.E. Duru, M. Ozturk, N. Mercan, M. Harmandar, G. Topçu. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Journal of Food Chemistry*.**2009**, 116, 470-479.
- [91] D. Fraternali, L. Giamperi, A. Bucchini, D. Ricci, F. Epifano, S. Genovese. Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chemistry of Natural Compounds*. **2005**, 41, 604-606.
- [92] M. Tada, K. Oku no, K. Chiba, E. Oh nishi, T. Yoshii. Antiviral diterpenes from *salvia officinali*, *Phytochemistry*. **1994**, 35(2),539-541.
- [93] A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfine, V. Cardile. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*. **2013**, 2(55), 42-47.
- [94] M. Babak Bahadori, H. Valizadeh, B. Asghari, L. Dinparast, M. Moridi Farimani, S. Bahadori. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods*. **2015**, 18, 727-736.
- [95] F. Medjahed, A. Merouane, A Saadi, A Bader, P. L Cioni, G. Flamini. Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study. *chilean journal of agricultural research*. **2016**, 76(2), 195-200.
- [96] D. Baricevic, T. Bartol, Pharmacology: The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. *Athens, Greece: Overseas Publishers Association*. **2000**, 143-184.
- [97] D. Stagos, N. Portesis, C. Spanou, D. Mossialos, N. Aligiannis, E. Chaita, C. Panagoulis, E. Reri, L.Skaltounis, A.M. Tsatsakis, D. Kouretas. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*. **2012**, 50, 4115-4124.

- [98] S. Bel hadj, M. A. Mahjoub, S. Ammar, L. Michel, J. Millet-Clerc, J. P. Chaumont, Z. Mighri, M. Aouni. Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. *Natural Product Research*. **2006**, 20, 1110-1120.
- [99] M Ben Farhat, A. Landoulsi, R. Chaouch-Hamada, J. A. Sotomayor, M.J. Jorda'n. Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 47,106-112.
- [100] M. Ben Farhat, A. Landoulsi, R. Chaouch-Hamada, J. A. Sotomayor, M. J. Jorda'n. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 49,904-914.
- [101] S.eref Gu'n S, C. inbilgel I', O'z E, C. etin H. Larvicidal activity of some *Salvia* L. (Labiatae) plant extracts against the mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*. **2011**, 17, 61-65.
- [102] D.T. Velickovic, M.S. Ristic, N.P. Milosavljevic, D.N. Davidovic, S.Z. Bogdanovic. Chemical composition of the essential oil of *Salvia argentea* L. *Agro Food Industry Hi Tech*. **2014**, 25, 70-72.
- [103] M. Couladis, O. Tzakou, D. Stojanovic, N. Mimica-Dukic, R. Jancic. The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **2001**, 16, 227-229.
- [104] M.A. Holeman, M. Berrada, J. Bellakhdar, A. Ilidrissi, R. Pinel. Comparative chemical study on essential oils from *S. officinalis*, *S. aucheri*, *S. verbenaca*, *S. phlomoides* and *S. argentea*. *Fitoterapia*. **1984**, 55, 143-148.
- [105] K. Ayla, S. Fatih, G. Fatih. Nutlet surface micromorphology of Turkish *Satureja* (Lamiaceae). *Journal of Biologia*. **2009**, 64(5),902-907.
- [106] M. Gulluce, M. Sokmen, D. Daferera, G. Agar, H. Ozkan, N. Kartal. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil, methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**2003**,51, 3958-3965.
- [107] D.I. Vârban, M. Duda, R. Vârban, S. Muntean, Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*. 2009, 66(2), 225- 229.

- [108] A. Attou. Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne. *Thèse de doctorat, Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen. 2018.*
- [109] K. Kerbouche, M. Hazzit, A. Baaliouamer. Essential oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Biologically Active Products from Nature. 2013*, 3(4), 266-272.
- [110] R. Labiod, S. Aouadi, N. Bouhaddouda. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *satureja calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015*, 7(7), 208-211.
- [111] R. LABIOD. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. *Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-annaba. 2016.*
- [112] N. Tabanca, M. Kurkcuoglu, K.H.C. Baser, G. Tumen, H. Duman. Composition of the essential oils of *Satureja spinosa* L, *Journal of Essential Oil Reserch. 2004*, 16, 127-128.
- [113] B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, D. Falconieri, A. Maxia, M.J. Gonçalves. Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) *Salvia* subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Reserch. 2010*, 24(18), 1734-1742.
- [114] B. Satrani, A. Farah, M. Fechtal, Talbi M, M. Blaghen, A. Chaouch. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. *Annales des Falsification et de l'Expertise Chimique, 2001*, 94, 241-50.
- [115] N. Baldovini, D. Ristorcelli, F. Tomi, J. Casanova. Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France), *Flavour and Fragrance journal. 2000*, 15, 50-54.
- [116] M. Božovi'c, R. Ragno. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules. 2017*, 22, 290.

- [117] SY. Wang, J.H. Wu, L.F. Shyur, YH. Kuo, ST. Chang. Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heart wood of *Taiwania cryptomerioides* Hyata. *Holzforschung*. **2002**, 56,487-492.
- [118] H. Saijo, H. Kofujita, K. Takahashi, T. Ashitani. Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. **2015**, 29(18), 1739-1743.
- [119] A. Michavila, M.C. De la Torre, B. Rodri'guez. 20-nor-abietane and rearranged abietane diterpenoids from the root of *Salvia argentea*. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1935–1937.
- [120] F. Chialva, F. Monguzzi, P. Manitto, Essential oil constituents of *trachyspermum copticum* L. Link fruits. *Journal of Essential Oil Reserch*. **1993**, 5, 105-106.
- [121] M. Khajeh, Y. Yamini, F. Sefidkon, N. Bahramifar. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. **2004**, 86, 587-591.
- [122] S.I. Balbaa, S.H. Hilal, M.Y. Haggag. The volatile oil from the herb and fruits of *Carum copticum* at different stages of growth. *Planta Medica*. **1973**, 23, 312-319.
- [123] R.K. Oskuee, J. Behravan, M. Ramezani, Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **2011**, 1(2), 83-90.
- [124] J.C. Chalchat, M.M. Ozcan, G. Figueredo. The composition of essential oils of different parts of Laurel, Mountain Tea, Sage and Ajowan. *Journal of Food Biochemistry*. **2011**, 35, 484-499.
- [125] C. Bekhechi, J.B. Boti, F.A. Bekkara, D.E. Abdelouahid, J. Casanova et F. Tomi. Isothymol in ajowan essential oil. *Natural Product Communication*. **2010**, 5(7), 1107-1110.
- [126] H. Wagner. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, **2011**, 82, 34-37.
- [127] S. De Rapper, G. Kamatou, A. Viljoen, S. Van Vuuren. The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**, 85, 20-49.

- [128] F. Lv, H. Liang, Q. Yuan, C. Li. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. **2011**, 44, 3057-3064.
- [129] G. Magi, E. Marini, B. Facinelli, Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontier in Microbiology*. **2015**, 6, 1-6.
- [130] H. Coste. Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. *Librairie des Sciences et des Arts, Paris*. **1937**.
- [131] F. Bekkara, L. Bousmaha, S.A Taleb Bendiab, B. Jean Brice, J. Casanova, Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. **2007**,7(1), 6-11.
- [132] P. Iserin, M. Masson, J. P. Restellini, Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins. *Ed Larousse*. **2007**.
- [133] S. Moreno, T. Scheyer, C.S. Romano, A.A. Vojnov. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*. **2006**, 40, 223–231.
- [134] N. Osakabe, A. Yasuda, M. Natsume, T. Yoshikawa. Rosmarinic acid inhibits epidermal atory responses: Anticarcinogenic effect of *perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. **2004**, 25, 549-557.
- [135] S. Habtemariam. The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2016**, 1-14.
- [136] T. Masuda, Y. Inaba, T. Maekawa, Y. Takeda, H. Tamura, H. Yamaguchi. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinine, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2002**, 50, 5863–5869.
- [137] M.R. al-Sereiti, K.M. Abu-Amer, P. Sen. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*. **1999**, 37(2), 124-130.

- [138] S. Santoyo, S. Cavero, L. Jaime, E. Ibañez, F. J. Señoráns, G. Reglero. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. **2005**, 68(4), 790-795.
- [139] C. Jones. Rosemary's Whole-Plant Properties Counter Cancer. *Nutrition Sciences News*. **1998**, 1-4.
- [140] W. Wang, N. Wu, Y.G. Zu, Y.J. Fu. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. **2008**, 108(3), 1019-1022.
- [141] P.C. Dias, M.A. Foglio, A. Possenti, J.E. de Carvalho. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 69, 57-62.
- [142] E. Issabeagloo, P. Kermanizadeh, M. Taghizadieh, R. Forughi. Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. *African Journal of Microbiology Research*. **2012**, 6, 5039-42.
- [143] I. Takaki, L. E. Bersani-Amado, A. Vendruscolo, SM. Sartoretto, SP. Diniz, CA. Bersani-Amado, RK. Cumin. Anti- Inflammatory and Antinociceptive Affects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. *Journal of Medicinal Food*. **2008**, 11, 741-746.
- [144] A. Angioni, A. Barra, E. Cereti, D. Barile, J. Daniel, M. Arlorio, S. Dessi, V. Coroneo, P. Cabras. chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2004**, 52(11), 3530-3535.
- [145] S. Ayadi, C. Jerribi, M. Abderrabba. Extraction et étude des huiles essentielles de *rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*. **2011**, 21(1), 25-33.
- [146] T. EL Kamli, F. Errachidi, N. Eloutassi, H. Majid, R.Chabir, A. Bour. Comparaison Quantitative Et Qualitative Des Huiles Essentielles De *Rosmarinus Officinalis* Obtenues Par Différentes Méthodes. *European Scientific Journal July*. **2017**, 13(21), 172-182.
- [147] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova. Chemical composition and antimicrobial

activity of *Rosmarinus officinalis* L. from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance journal*. **2002**, 17, 15-19.

[148] L. Boutabia, S. Telailia, I. Bouguetof, F. Guenadil, A. Chefrour. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **2016**, 85, 2016, 174-189.

[149] C. Boutekedjiret, F. Bentahar, R. Belabbes, J.M. Bessière. The essential oils from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. **1998**, 10, 680-682.

[150] T. Lograda, M. Ramdani, P. Chalard, G. Figueredo, Antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from Eastern Algeria. *Global Journal of Reserch on. Medicinal Plants and Indigenous Medicine*. **2014**, 3(6), 232-242.

[151] T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelghoum. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Internatinal Journal Aromatherapy*. **2006**, 16(2), 95-100.

[152] E. Stahl-Biskup, F. Saez. *Thyme: The Genus Thymus*; Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. *Taylor and Francis: London*. **2002**.

[153] V. Papageorgio. GLC-MS computer analysis of the essential oil of *Thymus capitatus*. *Planta Medica Suppl*. **1980**,40, 29-33.

[154] F. Amarti, B. Satrani, M Ghanmi, A. Farah, A. Aafi, L. Aarab, M. El Ajjouri, A. Chaouch. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environment*. **2010**, 14(1), 141-148.

[155] M. Hazzit, A. Baaliouamer, M. L. Faleiro, M. G. Miguel. Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2006**, 54, 6314-6321.

[156] M. El Ajjouri, B. Satrani, M. Ghanmi, A. Aafi, A. Farah, M. Rahouti, F Amarti, M. Aberchane. Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L)Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **2008**,12(4), 345-351.

- [157] L. Bousmaha, F. Atik Bekkara, F. Tomi, J. Casanova. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. **2007**, 19(5), 490-493.
- [158] F. Haddouchi, A. Hamadi Lazouni, A. Meziane, A. Benmansour. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*. **2009**, 05(2), 246-259.
- [159] A. Ghannadi, S.E. Sajjadi, A. Kabouche, Z. Kabouche, *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. **2004**, 59, 187-189.
- [160] T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelghoum. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*. *Pharmaceutical Biology*. **2006**, 44(8), 607-612.
- [161] N. Nabet, H. Boudries, S. Loupassaki, S. Souagui, K. Madani, A. Carbonell-Barrachina. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. and *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*. **2017**, 24(6), 2518-2525.
- [162] C. Bekhechi, F.A. Bekkara, D.E. Abdelouahid, F. Tomi, J. Casanova. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. **2007**, 19(6), 594-596.
- [163] Z. Mohammedi, S. Bachik, N. Belkaroube. Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. Et Reut. *Les Technologies De Laboratoire*. **2010**, 5(19) 10-15
- [164] N. Mebarki, Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. *Thèse de doctorat, Université de Tlemcen*. **2010**.
- [165] R. Giordani, Y. Hadeif, J. Kaloustian. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*. **2008**, 79, 199-203.
- [166] M.C. Rota, A. Herrera, R.M. Martínez, J.A. Sotomayor, M.J. Jordán. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus*

zygis and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. **2008**, 19(7), 681–687.

[167] A. Rustaiyan, S. Balalaei, F. Mohammadi, S. Masoudi, M. Yari. Comparison of the volatile oils of *Artemisia santolina* Schrenk and *Artemisia gypsacea* Krash., M. Pop. et Lincz. ex Poljak. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*. **2000**,12(3), 330–332.

[168] T. Dob, T. Benabdelkader. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. **2006**, 18, 685.

[169] L. Bezza, A. Mannarino, K. Fattarsi, C. Mikail, L. Abou, F. Hadji-Minaglou, J. Kaloustian. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie). *Phytothérapie*. **2010**, 8(5), 277-281.

[170] A.E.H. Mohamed, M.A. El-Sayed, M.E. Hegazy, S.E. Helaly, A.M.E Smail, N.S. Mohamed. Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia Herba Alba*. *Records of Natural Products*. **2010**, 4, 1-25.

[171] A. Moufid, M. Eddouks. *Artemisia herba alba*: a popular plant with potential medicinal properties. *Pakistan Journal of Biological Science*. **2012**,15(24), 1152-1159.

[172] M. Haouari, A. Ferchichi. Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molecules*. **2009**, 14, 1585-1594.

[173] F. Younsi, R. Trimech, A. Boulila, O. Ezzine, S. Dhahri, M. Boussaid, C. Messaoud. Essential Oil and Phenolic Compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, Antioxidant, Anti acetyl cholinesterase, and Antibacterial Activities. *International Journal of Food Properties*. **2016**, 19(7), 1425-1438

[174] H. Mighri, H. Hajlaoui, A. Akrouf, H. Najjaa, M. Neffati. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chim*. **2010**, 13(3), 80-386.

[175] L. Al-Shamaony, S.M. Al-Khazraji, H.A. Twaij, Hypoglycemic effect of *Artemisia herba alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. *Journal Of Ethnopharmacology*.**1994**, 43, 167-171.

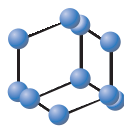
- [176] A. Neffati, I. Skandrani, M.B. Sghaie I. Bouhlel, S. Kilani, K. Ghedira, M. Neffati, I. Cherif, M. Hammami, L. Chekir-Ghedira. Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *Journal of Essential Oil Research*. **2008**, 20, 471-477.
- [177] M.M.M. Soliman. Phytochemical and toxicological studies of *Artemisia* L. (compositae) essential oil against some insect pests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **2007**, 40, 128-138.
- [178] L.H. Naser Al-Wahaibi, A. Mahmood, M. Khan, H.Z. Alkathlan. Comparative study on the essential oils of *Artemisia judaica* and *A. herba-alba* from Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*. **2018**.
- [179] R. Belhattab, L. Amor, J.G. Barroso, L.G. Pedro, A.C. Figueiredo. Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian Journal of Chemistry*. **2014**, 7(2), 243-251.
- [180] S. Salido, J. Altarejos, M. Nogueras, A. Sa'nchez. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso ssp. valentine (Lam.) Marcl. **2001**, 13, 221-224.
- [181] M. Houmani, Z. Houmani, M. Skoula. Intérêt de *Artemisia herba alba* Asso dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes. *Acta Botanica Gallica*. **2013**, 151(2), 165-172.
- [182] N. Dahmani-Hamzaoui, A. Baaliouamer. Chemical composition of Algerian *Artemisia herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*. **2010**, 22, 514-517.
- [183] H. Benouda, B. Bouammali, A. Challioui, A. Oulmidi, N. Dardouri, J. Mater. Essential oil variation in wild-growing populations of *Artemisia herba-alba* Asso collected from Morocco: Chemical composition and multivariate analysis. *Environmental Science and technology*. **2018**, 9(6), 1741-17491.
- [184] M. Hudaib, T.A. burjai. Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *Journal of Essential Oil Research*. **2006**, 18, 301-304.

- [185] C. Boutekedjiret, S. Charchari, R. Belabbes, J.M. Bessiere. Contribution à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Rivista Italiana EPPOS*. **1992**, 3, 39-42.
- [186] S. Salido, L.R. Valenzuela, J. Altarejos, M. Nogueras, A. Sanchez, E. Cano. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2004**, 32, 265-277
- [187] M.G. Miguel. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. *A Short Review, Molecules*. **2010**, 12 (15), 9252-9287.
- [188] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni. Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin as Functional Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods. *Food Chemistry*. **2011**, 91(4), 621- 632.
- [189] I. Gulcin. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. **2012**, 86, 345-391.
- [190] B. Tiwari, V. Valdramidis, C. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, P. Cullen. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 5987–6000.
- [191] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 124(1), 91-97.
- [192] Y.A. Crespo, L.R. Bravo Sánchez, Y.G. Quintana, A.S.T. Cabrera, A. Bermúdez del Sol, D.M.G. Mayancha. Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L. and *Coriandrum sativum* L. using simplex-lattice design. *Journal of Heliyon*. **2019**, 5(6), e01942.2019.
- [193] S. Aazza, B. Lyoussi, M.G. Miguel. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*. **2011**, 16, 7672-7690.
- [194] N.V. Yanishlieva, E.M. Marinova, M.H. Gordon, V.G. Raneva. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Journal of Food Chemistry*. **1999**, 64, 59-66.

- [195] R. Aeschbach, J. Loliger, B.C.Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, O.I. Aruoma. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. **1994**, 32(1), 31-36.
- [196] U. Ündeğer, A. Başaran, G. H. Degen, N. Başaran. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*. **2009**, 47, 2037-2043.
- [197] K.D. Beena, DS. Rawat. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*. **2013**, 23, 641-645.
- [198] S.S. Cheng, ST. Chang, Bioactivity and characterization of exudates from *Cryptomeria japonica* bark. *Wood Science and Technology*. **2014**, 48, 831–840.
- [199] A. Merouane. Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (*Salvia algeriensis*, *Salvia argentea* et *Salvia barrelieri*). *Thèse de Magister, Université Hassiba Ben Bouali Chlef*. **2013**.
- [200] H. Ouakouak, M. Chohra, M. Denane. Chemical Composition, Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Mentha pulegium*L, South East of Algeria. *International Letters of Natural Sciences*. **2015**, 39, 49-55.
- [201] L. Cherrat, L. Espina, M. Bakkali, R. Pagan, A. Laglaoui. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha scheele* essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2014**, 22, 221-229.
- [203] Y. Zaouali, T. Bouzaine, M. Boussaid. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48(11), 3144-3152.
- [204] AL. Dawidowicz, M. Olszowy. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*. **2014**, 28(22), 1952-1963.

- [205] J. Mazumder, R. Kumria, D. Pathak. Valuation Of Synergistic Antimicrobial Activity and Antioxidant Activity of blend of Essential Oil contains Fennel, Coriander, Ajowan and Caraway. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. **2014**, 9(1) 87-94.
- [206] M. Antolovich, P. Prenzlara, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards. Methods for testing antioxidant activity. *Royal society of chemistry*. **2002**, 127,183-198.
- [207] S. Chouhan, K. Sharma, S. Guleria. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. **2017**, 4(58), 1-21.
- [208] P. Pankaj Saraswat, G. Jeyabalan, M.Z. Hassan, M.J. Ahsan. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Benzothiazolethiophene Hybrids: A New Class of Potent Antimicrobial Agents. *Anti-Infective Agents*. **2018**, 16, 57-63.
- [209] L. Lakhdar, O.K. Ennibi, A. Farah. Composition pharmacologique de l'origan (huile essentielle) a effet antibacterien sur *d'Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Brevet WO 2016076689 A1*. **2016**.
- [210] N. Kusumoto, T. Ashitani, T. Murayama, K. Ogiyama, K. Takahashi. Antifungal abietane-type diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* Rich. *Journal of Chemistry and Ecology*. **2010**, 36,1381-1386.
- [211] H. Kofujita, Y. Fujino, M. Ota, K. Takahashi, Antifungal diterpenes from the bark of *Cryptomeria japonica* D. Don, *Holzforschung*, **2006**, 60,20-23.
- [212] D. Trombetta, F. Castelli, M.G Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2005**, 49, 2474-2478.
- [213] A. Ultee, M.H. Bennik, R. Moezelaar. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68, 1561-1568.
- [214] G. Flamini, P.L. Cioni, R. Puleio, I. Morelli, L. Panizzi. antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research*. **1999**, 13(4), 349-351.

- [215] D.P. De Sousa, F.F.F. Nóbrega, M.R.V. De Lima, R.N. De Almeida. Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. **2011**, 66, 353-359.
- [216] F.A. Al-Bayati. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, 116, 403-406.
- [217] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.E. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. **2000**, 88, 170-175.
- [218] C. Bicchi, C.E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B.A. Zellner, R. Costa. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour and Fragrance Journal*. **2008**, 23(6), 382-391.
- [219] N. Djabou, J. Paolini, J. Desjobert, H. Allali, J. Costa, A. Muselli. Qualitative and quantitative analysis of volatile components of *Teucrium massiliense* L. Identification of 6-methyl-3-heptyl acetate as new natural product. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010, 25, 475-487.
- [220] P. Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. **2004**, 26(2), 211-219.
- [221] M. Oyaizu. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. **1986**, 44, 307-331.
- [222] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. *M100- S11, Wayne, PA, USA*. **2001**.
- [223] A.G. Ponce, R. Fritz, C. Del Valle, S.I. Roura. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology*. **2003**, 36(7), 679-684.



Synergistic Effects of Essential Oils of *Ammoides verticillata* and *Satureja candidissima* Against Many Pathogenic Microorganisms



Fatima Benyoucef¹, Mohammed El Amine Dib^{2,*}, Boufeldja Tabti², Arrar Zoheir¹, Jean Costa³ and Alain Muselli³

¹Laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, Algérie, ²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, Algérie, ³Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250, Corté, France

Abstract: Background: Antibiotic resistance is today one of the most serious threats to global health, food security and development. Due to the growing number of infections, treatment becomes more difficult, if not impossible, because of the loss of antibiotic efficacy.

Objectives: In the present investigation, the chemical composition of essential oils of *Ammoides verticillata* and *Satureja candidissima* and their synergistic effects on antimicrobial activities were investigated.

Methods: The chemical composition of the essential oil was analyzed by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC/MS). The antimicrobial activity of the essential oils was investigated using dilution-agar method against nine bacterial strains three Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella typhi* (ATCC 14028), and six Gram-positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7314), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) and *Bacillus cereus* (ATCC 14579).

Results: The essential oil of *A. verticillata* was characterized principally by carvacrol (44,3%), Limonene (19,3%) and p-cymene (19,2%). The constituents identified of *S. candidissima* essential oil were principally oxygenated monoterpenes represented by pulegone (70,4%). The essential oil of *A. verticillata* had a good antimicrobial activity against four bacterial strains (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus cereus*) with MIC and MBC values between 0.2-0.4 µl/ml and 0.2-6.2 µl/ml, respectively. While, *S. candidissima* essential oil had moderate antimicrobial activities against all strains with MIC and MBC values between 1.5-6.2 µl/ml and 6.2-12.5 µl/ml, respectively. The results of antimicrobial activity of essential oils blend presented higher antimicrobial activity against all tested bacteria with MIC and MBC values between 0.3-1.5 µl/ml and 0.4-6.2 µl/ml, respectively.

Conclusion: The essential oils blend presented high antimicrobial activity compared to virgin oils. This activity can be due to the association of active compounds such as carvacrol and pulegone. These findings provide a new source of drugs that may help in therapy to lead to the development of a new treatment based on a combination of these essential oils against gram-negative and gram-positive bacteria that continue to pose a threat to public health.

Keywords: *A. verticillata* and *S. candidissima*, essential oils blend, synergistic effects, food preservative, antimicrobial activity, virgin oils.

1. INTRODUCTION

Nowadays, essential oils are experiencing unprecedented infatuation due to their biological properties. In recent years, essential oils have gained popularity as consumers have developed a growing awareness of the use of natural ingredients, especially in food, household and cosmetic products [1, 2].

Bacteria are responsible for many diseases that are dangerous to human health, such as *Meningococcal meningitis* or tuberculosis, or other relatively benign diseases such as gastrointestinal infections and nosocomial infections. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enterococcus* sp., *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*, are amongst some of the main bacteria with multidrug resistance and are included in the category of community and hospital-acquired pathogens [3].

With the increased resistance of these microorganisms to antibiotics, the constituents of biomass products appear as

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail a_dibdz@yahoo.fr

ARTICLE HISTORY

Received: December 28, 2018
Revised: February 09, 2019
Accepted: February 18, 2019

DOI:
10.2174/2211352517666190227161811



CrossMark

very attractive substitutes. As stimulants, many essential oils can help increase the healing rate throughout the body [4].

The antimicrobial properties of some essential oils also protect the body during these stages of healing. Essential oils are not only used in monotherapy but have been used in combination for many years and can create a stronger effect than the oils would have if used alone [5]. Essential oils can be used in synergy to broaden the spectrum of their action and increase their benefits. The possible synergistic effect produced by the combination of plant essential oils was referred to as an efficient strategy to combat microbial development [6-8]. *A. verticillata* and *S. candidissima* are harvested by the local population for their potential uses as alternative remedies for the treatment of many infectious diseases. Many biological activities of *Satureja* species were reported in the literature, especially as Antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, stimulant and diuretic effects [9-12]. The ethnobotanical survey conducted on this species shows that the local population of Tlemcen region use this plant against influenza, intestinal worms, infections, and as a dressing for burns and wounds.

A. verticillata is much known since antiquity for its uses in self-medication. It is used for the treatment of gastrointestinal disorders, lack of appetite and bronchial problems. Many properties have been reported: fungicidal, antimicrobial, antiviral and anti-aggregative effects on human beings [13, 14]. Furthermore, no study has investigated the essential oils of *S. candidissima* and performed evaluation of antimicrobial properties of *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils blends.

As part of our search for active natural products to fight microbial infections, the purpose of the present study was to (i) determine the chemical composition of essential oil of both the plants, (ii) antimicrobial effects of each essential oil against nine clinically important pathogenic microorganisms and (iii) the possible synergistic impacts of the combination of both essential oils.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

Aerial parts of *A. verticillata* and *S. candidissima* were collected at the flowering stage of May till June, 2017. The plant material was authenticated by botanists from the laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen (Algeria). Voucher specimens were deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen.

2.2. Essential Oils Extraction

Essential oils were obtained from fresh material by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus and yielded (w/w) 2, 6% for *A. verticillata* and 1, 3% for *S. candidissima*.

2.3. Analysis Conditions

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and fused with Rtx-1 silica capillary columns (60 m × 0.22 mm i.d., 0.25 µm film thickness; polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed

to increase from 60-230°C at 2°C/min and was then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. The injection volume was 0.1 µL, as previously reported by Dib *et al.* [15].

In gas chromatography–mass spectrometry analysis: samples were analyzed using a Perkin Elmer Turbo mass detector (quadrupole) coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with Rtx-1 fused silica capillary columns and Rtx-Wax (ion source temperature, 150°C; ionization energy, 70 eV). Ionization energy MS was acquired over a mass range of 35-350 Da (scan time, 1 s). Other GC conditions were the same as described for GC, except the split was 1/80, as previously reported by Dib *et al.* [15].

The identification of each compound of the mixtures was carried out by comparison: (i) retention indices calculated respectively on polar and apolar columns with those of standard compounds (laboratory library "Arôme") or those reported in the literature; (ii) mass spectra (electronic impact) with those of standard compounds (laboratory library) or those present in computerized banks [16-21]. Quantification of constituents was performed using a Flame Ionization Detector by internal standardization of peak areas using the calculated response factors relative to the tridecane (0.7 g.100 g⁻¹) used as an internal standard, according to the method described by Belabbes *et al.* [22] and adapted within the CPN laboratory.

2.4. Antimicrobial Activities

2.4.1. Bacterial Strains

In this study, nine spoilage and pathogenic bacteria were used. The bacterial strains assayed included three Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella typhi* (ATCC 14028), six Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7314), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) and *Bacillus cereus* (ATCC 14579).

2.4.2. Determination of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and their Combinations

A dilution agar method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Stock solutions were obtained by dissolving essential oils in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). The concentrations ranging from 0.1 to 100 µl/ml of essential oils were prepared from a serial of dilutions. Each mixture was added to Mueller–Hinton agar [23]. The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium were incubated at 37°C for 24 h. The experiments were performed in triplicate. The bactericidal or bacteriostatic effects were calculated by the ratio: CBM/CMI. When: MBC/MIC is between 1-2, the effect is bactericidal; MBC/MIC between 4-16, the effect is bacteriostatic [24].

2.5. Statistical Analysis

The results were expressed as mean ± SD and analyzed by SAS software, and for the determination of the significance levels (n = 3), the values of p ≤ 0.05 were considered statistically significant. Analysis of each test was performed in triplicate.

Table 1. Chemical composition of *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils.

S. No.	Compounds	IRI ^{ab}	RI ^{ac}	RI ^{pd}	Essential Oils		Identification ^c
					<i>A. verticillata</i>	<i>S. candidissima</i>	
1	α -Pinene	931	932	1023	0,8	-	RI, MS
2	Camphene	943	944	1066	-	-	RI, MS
3	Sabinene	964	966	1118	0,2	-	RI, MS
4	β -Pinene	970	972	1108	-	-	RI, MS
5	Myrcene	976	982	1159	0,7	-	RI, MS
6	p-Cymene	1010	1012	1259	19,2	-	RI, MS
7	Limonene	1020	1021	1195	19,3	-	RI, MS
8	(Z)- β -Ocimene	1024	1025	1225	-	1,1	RI, MS
9	(E)- β -Ocimene	1034	1036	1241	-	0,1	RI, MS
10	γ -Terpinene	1047	1049	1237	11,1	-	RI, MS
11	Iso-Menthone	1143	1142	1490	-	4,5	RI, MS
12	Neo-Menthol	1156	1157	1637	-	0,6	RI, MS
13	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	1,1	2,3	RI, MS
14	Menthol	1164	1163	1629	-	5,2	RI, MS
15	Iso-Menthol	1174	1173	1660	-	0,1	RI, MS
16	Pulegone	1213	1216	1640	-	70,4	RI, MS
17	Carvacrol	1282	1278	2220	44,3	-	RI, MS
18	Piperitenone oxide	1333	1335	1945	-	2,5	RI, MS
19	E- β -Caryophyllene	1424	1418	1583	-	1,5	RI, MS
20	α -Humulene	1456	1456	1665	0,1	0,1	RI, MS
21	γ -Muurolole	1471	1469	1679	0,1	0,8	RI, MS
22	Germacrene D	1480	1474	1692	-	0,5	RI, MS
23	α -Muurolole	1496	1492	1709	-	0,3	RI, MS
Identification %		-	-	-	96,9	92,6	-
Monoterpene hydrocarbons			-	-	51,3	3,8	-
Sesquiterpene hydrocarbons			-	-	0,2	3,2	-
Oxygenated monoterpenes			-	-	45,4	85,6	-

^aOrder of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^bRetention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König *et al.* ^cRetention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^dRetention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^eRI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.; Ref.: compounds identified from literature data Joulain *et al.* [17].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical Composition of Essential Oils

GC-RI and GC-MS analysis of *A. verticillata* and *S. candidissima* oils accounted for 96.8 % and 90.6% of the oils, respectively and allowed the identification of 10 and 18 compounds, respectively. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC retention indices with those of our laboratory-produced “Arômes” library, with the exception of two components that were identified by compari-

son with spectral data and retention indices from the literature (Table 1). The essential oil of *A. verticillata* obtained from the aerial parts was dominated by the monoterpene hydrocarbons (51, 3%) and oxygenated monoterpenes (45, 4%). The principal components were carvacrol (44, 3%), limonene (19, 3%), p-cymene (19, 2%) and γ -terpinene (11, 1%). The constituents identified in the aerial parts of essential oil of *S. candidissima* were principally oxygenated monoterpenes represented by pulegone (70, 4%) and appreciated the amount of menthol (5, 2%) and iso-menthone (4, 5%) (Table 1).

Table 2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of essential oils studied individually and in combination.

Microorganisms	MIC (µl/ml)		
	<i>A. verticillata</i>	<i>S. candidissima</i>	<i>A. verticillata/S. candidissima</i>
	Individual Oils		1:1 Combination
Gram-negative bacteria	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.2 ± 00	1.5 ± 0.2	0.3 ± 00
<i>P. aeruginosa</i>	3.1 ± 06	3.1 ± 0.6	1.5 ± 0.6
<i>S. Typhi</i>	0.8 ± 0.1	6.2 ± 0.9	1.5 ± 0.3
Gram-positive bacteria			
<i>S. aureus</i>	1.5 ± 0.2	6.2 ± 1.1	0.8 ± 0.1
<i>C. sporogenes</i>	3.1 ± 0.5	3.1 ± 0.8	1.5 ± 0.9
<i>B. subtilis</i>	1.2 ± 0.1	3.2 ± 0.6	0.7 ± 0.1
<i>E. faecalis</i>	1.5 ± 0.3	6.2 ± 0.9	1.5 ± 0.8
<i>L. rhamnosus</i>	0.4 ± 0.1	3.1 ± 0.6	0.8 ± 0.1
<i>B. cereus</i>	0.4 ± 0.1	6.2 ± 1.2	0.8 ± 0.1

Values are represented as mean ± SEM

Table 3. Minimal Bactericidal Concentration (MCB) of essential oils studied individually and in combination.

Microorganisms	MCB (µl/mL)		
	<i>A. verticillata</i>	<i>S. candidissima</i>	<i>A. verticillata/S. candidissima</i>
	Individual oils		1:1 Combination
Gram-negative bacteria	-	-	-
<i>E. coli</i>	0.2 ± 00	6.2 ± 1.1	0.4 ± 0.1
<i>P. aeruginosa</i>	6.2 ± 1.1	6.2 ± 0.9	3.1 ± 0.8
<i>S. Typhi</i>	1.5 ± 0.6	12.5 ± 1.5	3.1 ± 0.9
Gram-positive bacteria	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6.2 ± 0.9	6.2 ± 0.6	0.8 ± 00
<i>C. sporogenes</i>	3.1 ± 0.9	6.2 ± 0.8	1.5 ± 0.2
<i>B. subtilis</i>	3.1 ± 0.6	6.2 ± 1.1	1.5 ± 0.6
<i>E. faecalis</i>	3.1 ± 0.2	12.5 ± 1.6	3.1 ± 0.6
<i>L. rhamnosus</i>	1.6 ± 0.8	6.2 ± 0.9	3.1 ± 04
<i>B. cereus</i>	0.8 ± 0.1	12.5 ± 2.0	6.2 ± 0.7

Values are represented as mean ± SEM

Table 4. Bactericidal and bacteriostatic effects of essential oils studied individually and in combination.

Microorganisms	MCB/MIC (µl/ml)		
	<i>A. verticillata</i>	<i>S. candidissima</i>	<i>A. verticillata/S. candidissima</i>
	Individual oils		1:1 Combination
Gram-negative bacteria	-	-	-
<i>E. coli</i>	1	4	1

Table 4. Contd...

Microorganisms	MCB/MIC ($\mu\text{l/ml}$)		
	<i>A. verticillata</i>	<i>S. candidissima</i>	<i>A. verticillata/S. candidissima</i>
	Individual oils		1:1 Combination
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	4
<i>S. Typhi</i>	2	2	2
Gram-positive bacteria			
<i>S. aureus</i>	4	2	1
<i>C. sporogenes</i>	1	2	2
<i>B. subtilis</i>	2	2	4
<i>E. faecalis</i>	2	2	2
<i>L. rhamnosus</i>	4	2	4
<i>B. cereus</i>	2	2	8

Relative to the studies reported previously in the literature, the chemical composition of *A. verticillata* essential oil studied presented the same profile as the other's origins. Carvacrol was reported as the main component of the oil from Turkey (61, 3%), India (55, 7%) and Egypt (41, 0%) [11-23]. whereas the major components of west Algeria oil were thymol (51, 6%), limonene (18,2%), γ -terpinene (11.7%) and p-cymene (10, 4%) [13]. The previous work on the phytochemical content of the essential oils of *Saturja* species has identified pulegone and menthone as the major components. Furthermore, the phytochemical content of the essential oil of *S. spinosa* (Tabanca) has identified linalool as the major component. *S. calamintha* subsp. *nepeta* from Portugal showed that isomenthone, 1, 8-cineole and trans-isopulegone were the dominant components. The chemical composition of samples of *Calamintha nepeta* essential oil, in wild growth in Corsica made it possible to determine the existence of three chemotypes, Half of the samples were characterized by a menthone/pulegone chemotype and the other samples presented the pulegone, piperitone and piperone oxide as the major components [12-27].

3.2. Determination of Antimicrobial Activity and their Synergistic Effect Between the Essential Oils

The antimicrobial activity of the essential oils was investigated using dilution-agar method against nine bacterial strains, three Gram-negative: *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. typhi*, and six Gram-positive: *S. aureus*, *C. sporogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. rhamnosus* and *B. cereus* (Table 2 and 3). In this study, *A. verticillata* essential oil exhibited the best antibacterial activity. The higher MIC and MCB were shown in *E. coli* (0.2 and 0.2 $\mu\text{l/ml}$, respectively), *L. rhamnosus* (0.4 and 1.6 $\mu\text{l/ml}$, respectively), *B. cereus* (0.2 and 0.8 $\mu\text{l/ml}$, respectively) and *S. Typhi* (0.2 and 1.5 $\mu\text{l/ml}$, respectively), but the lower MIC and MBC were observed in *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. sporogenes*, *B. subtilis* and *E. faecalis* with MIC and MBC values ranging from 1.2-3.1 $\mu\text{l/ml}$ and 3.1-6.2 $\mu\text{l/ml}$ respectively. However, *S. candidissima* essential oil presented the lower antimicrobial activity, with MIC and MBC values ranged from 1.5-6.2 $\mu\text{l/ml}$ and 6.2-12.5 $\mu\text{l/ml}$, respectively (Table 2 and 3).

As shown in Table 4, the ratio MBC/MIC obtained, showed that the essential oil of *A. verticillata* had bactericidal effects against all bacterial species tested, except for *S. aureus* and *L. rhamnosus*. However, *S. candidissima* essential oil had a bacteriostatic effect against *E. coli* only.

The antimicrobial activity of essential oils blends examined in this study is presented in Tables 2 and 3. *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils blends displayed important synergistic effect against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. sporogenes* and *B. subtilis* with MIC and MBC ranging from 0.7-1.5 $\mu\text{l/ml}$ and 0.8-3.1 $\mu\text{l/ml}$, respectively. On the other hand, the essential oils blend showed a bactericidal effect against two Gram-negative bacteria (*E. coli* and *S. typhi*) and three Gram-positive (*S. aureus*, *C. sporogenes* and *E. faecalis*).

A majority of the antimicrobial properties of essential oils are due to the presence of oxygenated terpenoids, especially phenolic terpenes, phenyl propanoids and alcohols. A correlation between the achieved antibacterials' effectiveness studied in virgin essential oils and their chemical composition suggests that this activity may be ascribed to the presence of the relatively high concentration of carvacrol and pulegone. Several reports have shown that carvacrol exerts an antibacterial effect by disintegrating the outer membrane and disrupting the cytoplasmic membrane of bacteria [28, 29].

On the other hand, the previous works showed that the essential oil of *A. verticillata* has a powerful antimicrobial activity against four gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Micrococcus luteus*) and one gram-negative (*Escherichia coli*) [30]. Pulegone exhibited high antimicrobial activity on *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [31, 32]. It is noteworthy to observe that most of these distinct synergisms are between compounds, which exhibited strong antimicrobial activity when tested alone. Based on obtained results, it is obvious that all the synergistic observed interactions can be related to the association of carvacrol and pulegone since these compounds seem to be responsible for the antimicrobial activity [33].

CONCLUSION

In the present investigation, chemical composition and antimicrobial activities of *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils, as well as synergism of their combinations were investigated. *A. verticillata* essential oil exhibited the best antibacterial activity against *E. coli*, *L. rhamnosus*, *B. cereus* and *S. typhi*, while, *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils blend displayed important synergistic effect with a best antibacterial activity against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. sporogenes* and *B. subtilis*. These results, therefore, represent a basis for further studies that could lead to the development of a new treatment based on a combination of *A. verticillata* and *S. candidissima* essential oils for the treatment of infectious diseases.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for a study that is the base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the 'Partenariat Hubert Curien Tassili' research program.

REFERENCES

- [1] Swamy, M.K.; Sinniah, U.R. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of Pogostemon cablin Benth: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules*, **2015**, *20*(5), 8521-8547. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20058521> PMID: 25985355
- [2] Lang, G.; Buchbauer, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragrance J.*, **2012**, *27*, 13-39. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2082>
- [3] Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines (Basel)*, **2017**, *4*(3), 1-21. PMID: 28930272
- [4] Pankaj Saraswat, P.; Jayabalan, G.; Hassan, M.Z.; Ahsan, M.J. Design, synthesis and biological evaluation of benzothiazole-thiophene hybrids: a new class of potent antimicrobial agents. *Anti-infect. Agents*, **2018**, *16*, 57-63.

- [5] <http://dx.doi.org/10.2174/2211352515666171124155327> Blumenthal, M. *Herbal medicines: expanded commission E monographs*; Integrative Medicine Communications: Boston, **2000**, pp. 419-423.
- [6] de Rapper, S.; Kamatou, G.; Viljoen, A.; van Vuuren, S. The *in vitro* antimicrobial activity of Lavandula angustifolia essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. Evid. based Complement *Evid Based Complement Alternat. Med.*, **2013**, *2013*, 852049. DOI: 10.1155/2013/852049 PMID: 23737850
- [7] Lv, F.; Liang, H.; Yuan, Q.; Li, C. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 3057-3064. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.030>
- [8] Magi, G.; Marini, E.; Facinelli, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.*, **2015**, *6*, 165. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165> PMID: 25784902
- [9] Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Simin, N.; Anackov, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*(5), 1822-1828. <http://dx.doi.org/10.1021/jf051922u> PMID: 16506839
- [10] Cavar, S.; Edita S.M.; Maksimovic, M. Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt Biokovo. *Bot. Serb.*, **2013**, *37*(2), 159-165.
- [11] Kerbouche, K.; Hazzit, M.; Baaliouamer, A. Essential oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, antimicrobial and antioxidant activities. *J. Biol. Active Prod. Nat.*, **2013**, *3*(4), 266-272. <http://dx.doi.org/10.1080/22311866.2013.833466>
- [12] Baldovini, N.; Ristorcelli, D.; Tomi, F.; Casanova, J. Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour Fragrance J.*, **2000**, *15*, 50-54. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(200001/02\)15:1<50::AID-FFJ871>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(200001/02)15:1<50::AID-FFJ871>3.0.CO;2-F)
- [13] Bekhechi, C.; Boti, J.B.; Bekkara, F.A.; Abdelouahid, D.E.; Casanova, J.; Tomi, F. Isothymol in ajowan essential oil. *Nat. Prod. Commun.*, **2010**, *5*(7), 1107-1110. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1000500726> PMID: 20734951
- [14] Bhargava, P.P.; Hakasas, C.N. Examination of essential oil from ajowan seeds *Perfum. J. Essent. Oil Res.*, **1959**, *50*, 204-206.
- [15] Diba, M.A.; Paolini, J.; Bendahou, M.; Varesi, L.; Allali, H.; Desjobert, J.M.; Tabti, B.; Costa, J. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and *in vitro* antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat. Prod. Commun.*, **2010**, *5*(7), 1085-1090. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1000500721> PMID: 20734946
- [16] Jennings, W.; Shibamoto, T. *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*; Jovanovich, H.B., Ed.; Academic Press: New York, **1980**.
- [17] König, W.A.; Hochmuth, D.H.; Joulain, D. Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder 2.1. Ed. Institute of Organic Chemistry: Ham-burg, **2001**.
- [18] McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. *The Wiley/NBS registry of mass spectra data*, 7th Ed.; Wiley-Interscience: New-York, **1988**.
- [19] Joulain, D.; König, W. *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*, 7th Ed.; Pergamon Press: Ham-burg, **1998**.
- [20] National Institute of Standards and Technology, **2005**. Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- [21] National Institute of Standards and Technology. *NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7*; Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CT, **1999**.
- [22] Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of calendula arvensis L. from western Algeria. *Chem. Biodivers.*, **2017**, *14*(5), e1600482. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600482> PMID: 28109063
- [23] Lennette, F.M.; Balows, A. *Manual of Clinical Microbiology*; Hansler, W.J.; Shadomy, H.J., Ed.; American Society for Microbiology: Washington, DC, **1985**.
- [24] Berche, P.; Gaillard, J.L.; Simonet, M. Les bacteries des infections humaines. *Éditeur: Flammarion, Médecine Sciences*, Flammarion médecine-sciences: Paris, **1991**, pp. 66.

- [25] Chalchat, J.C.; Ozcan, M.M.; Figueredo, G. The composition of essential oils of different parts of Laurel, Mountain Tea, Sage and Ajowan. *J. Food Biochem.*, **2011**, *35*, 484-499.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00397.x>
- [26] Labiod, R.; Aouadi, S.; Bouhaddouda, N. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2015**, *7*(7), 208-211.
- [27] Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Falconieri, D.; Maxia, A.; Goncalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Nat. Prod. Res.*, **2010**, *24*(18), 1734-1742.
<http://dx.doi.org/10.1080/14786410903108944> PMID: 20981614
- [28] Tabanca, N.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; Tumen, G.; Duman, H. Composition of the essential oils of *Satureja spinosa* L. *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, *16*, 127-128.
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2004.9698671>
- [29] Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, *91*(3), 453-462.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x> PMID: 11556910
- [30] Attou, A.; Davenne, D.; Benmansour, A.; Lazouni, H.A. Chemical composition and biological activities of *ammoides verticillata* essential oil from West Algeria. *Phytotherapie*, **2017**, *2017*(1), 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1108-1>
- [31] Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*(4), 1561-1568.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002> PMID: 11916669
- [32] Primo, V.; Rovera, M.; Zanon, S.; Oliva, M.; Demo, M.; Daghero, J.; Sabini, L. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Mintostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Rev. Argent. Microbiol.*, **2001**, *33*(2), 113-117. PMID: 11494754
- [33] Flamini, G.; Cioni, P.L.; Puleio, R.; Morelli, I.; Panizzi, L. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother. Res.*, **1999**, *13*(4), 349-351.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199906\)13:4<349::AID-PTR446>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199906)13:4<349::AID-PTR446>3.0.CO;2-Z) PMID: 10404547



Synergistic Antioxidant Activity and Chemical Composition of Essential Oils From *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*

Fatima Benyoucef¹, Mohammed El Amine Dib^{2*}, Zoheir Arrar¹, Jean Costa³, Alain Muselli³

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

²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie

³UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, Université de Corse, Laboratoire CPN, BP 52, 20250 Corte, France

Corresponding Author: Mohammed El Amine Dib, PhD, Professor, Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie. Tel : +21-3554378192, Email : a_dibdz@yahoo.fr

Received August 4, 2018; Accepted November 8, 2018; Online Published December 20, 2018

Abstract

Introduction: Oxidative stress is involved in many pathological mechanisms especially those due to aging, such as cancer, Parkinson's and Alzheimer's disease. Essential oils are known for their biological properties, especially as anti-nociceptive, anticancer, antiviral and antioxidative. The main objective of this study was to study the antioxidant activity of essential oils from *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*, individually and in combinations.

Materials and Methods: Essential oils of plants aerial parts were analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant properties were evaluated using two different methods, α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP).

Results: The essential oil of *T. fontanesii* was principally characterized by phenolic compounds represented by thymol (76.6%) and p-cymene (7.4%). The constituents identified from *A. herba-alba* essential oil were principally represented by camphor (32.3%) and chrysanthenone (25.6%). While, *R. officinalis* essential oil was characterized by 1,8-cineole (18.3%), camphene (15.4%) and α -pinene (12.8%). *T. fontanesii* essential oil indicated the significantly highest activity in quenching of DPPH radical, followed by *R. officinalis* and *A. herba-alba* essential oils with IC₅₀ of 13.7, 24.5 and 79.4 mg/L, respectively. The combination of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils showed the greatest antioxidant activity with an IC₅₀ of 2.6 mg/L almost equal to the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT).

Conclusions: The essential oils blend presented high antioxidant activity compared to individual oils. These findings provide a new source of antioxidant that can be used as a natural food preservative and alternative to chemical synthetic preservatives.

Keywords: Essential Oils, Antioxidant Activities, Synergistic Effects

Citation: Benyoucef F, El Amine Dib M, Arrar Z, Costa J, Muselli A. Synergistic antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*. J Appl Biotechnol Rep. 2018;5(4):151-156. doi:10.29252/JABR.05.04.03.

Introduction

In an attempt to preserve human health and avoid auto-oxidation affecting both the sensory and nutritional quality of foods, synthetic preservatives such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole were introduced in the food industry. However, with the current resurgence of interest in the application of safe organic materials instead of synthetic materials, which are suspected for their carcinogenicity, essential oils are increasingly sought as natural alternatives.^{1,2} Essential oils represent a "green" alternative in the nutritional and pharmaceutical fields due to their incredible biological properties.^{3,4} Essential oils are not only used in monotherapy but also have been used in combinations for many years.⁵ They are used to act synergistically to further enhance their effects. The possible synergistic effect produced by the combination of plant essential oils was referred as an efficient strategy to

inhibit or reduce the natural oxidation process of foods.⁶ The combination of essential oils with antioxidant effects approach may lead to new natural preservatives. A Few research have studied the synergistic effect of plant essential oils. Grosso et al suggested that the combination of thymol, carvacrol and thymoquinone in the volatile oil of *Satureja montana* may be responsible for the increase in antioxidant activity, using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging and rancimat methods.⁷ *Thymus fontanesii* and *Rosmarinus officinalis* belong to the Lamiaceae family. While, *Artemisia herba-alba* belongs to the Asteraceae family. These species are especially known for their important biological properties such as antibacterial and antioxidant activities. To our knowledge, no study has investigated the antioxidant properties of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils blend. The purpose of the present study was (i)

to determine the chemical composition of the essential oil of these plants, (ii) to evaluate the antioxidant power of each essential oil by DPPH and FRAP assays and (iii) to investigate the possible synergistic impacts of the combination of three essential oils.

Materials and Methods

Plant Material and Extraction of the Oils

Aerial parts of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* were collected at the flowering stage on May to June, 2017. The plant materials were botanically identified by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen, Algeria. Voucher specimens were deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen. *T. fontanesii* (T.on.04/2018), *A. herba-alba* (A.h.a.05.2018) and *R. officinalis* (R.of 04/2018).

Essential oils were obtained from fresh material (300-400 g) by hydrodistillation for 5 hours using a Clevenger-type apparatus with yields (w/w) of 3.7% for *T. fontanesii*, 0.7% for *A. herba-alba* and 0.4% for *R. officinalis*.

Gas Chromatography

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

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS)

The oils and the fractions obtained by GC were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole analyzer, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with 2 fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature was 150°C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35–350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 µL and fraction injected volume was 0.2 µL.

Component Identification

The identification of each compound was carried out by comparison: (i) retention indices calculated respectively on polar and apolar columns with those of standard compounds of the laboratory library^{8,9} or those reported in the literature; (ii) mass spectra (electronic impact) with those of standard compounds or those present in computerized banks.^{10,11}

Determination of Antioxidant Activity of Essential Oils DPPH Free Radical Scavenging Assay

The free radical-scavenging activity of essential oils and combinations were measured using DPPH, as described in the literature.¹² At first, 500 mg/L of each essential oil stock solution was prepared. A series of dilution with varying concentrations (0.1 to 100 mg/L) was prepared by dissolving various masses of essential oil in ethanol. In regards to essential oils blends, a ratio of 1: 1 by volume was mixed for each combination and a series of concentrations ranging from 0.1 to 50 mg/L were prepared. After on, 100 µL of each concentration was then mixed with 25 µL of 0.5 mM DPPH. After a 30 minutes incubation period at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm using spectrophotometer. Ascorbic acid was used as standard and DPPH mixture without any sample served as blank. Inhibition of free radical DPPH in percent (I%) was calculated as follows:

$$I\% = \left[\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100\%$$

As presented above, A_{blank} is the absorbance of the control reaction (without oils), and A_{sample} was the absorbance in the presence of essential oils. From the obtained RSC values, the IC₅₀ values, which represented the concentrations of the extracts caused 50% neutralization, were determined by linear regression analysis.

Ferric-Reducing Antioxidant Power Assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the essential oils was tested as described earlier¹³. Different concentrations of the essential oils dissolved in ethanol (80%) were mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (pH = 6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide. Later, the mixture was incubated at 50°C for 20 minutes, and then trichloroacetic acid (10%, 1,25 mL) was added. After shaking the mixture vigorously, it was mixed with distilled water (5 mL) and ferric chloride (0.1%, 5 mL). After 30 minutes of incubation, absorbance was read at 700 nm against ethanol (80%) as blank. Analyses were performed in triplicate. Increased absorbance of the reaction meant increased reducing power and compared to the synthetic antioxidant BHT as reference.

Statistical Analysis

The data are presented as the means ± standard deviations from the three replicates. Calculations were performed using the SAS v. 9.1.3 program.

Results

Chemical Composition of Essential Oils

GC-FID and GC-MS analysis of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* oils accounted for 99.3%, 93.4% and 91.1% of oils, respectively and allowed the identification of 31, 20 and 19 components, respectively (Table 1). All components were identified by comparison of their mass spectrum and retention indices with those of our laboratory-produced “Arômes” library (Table 1). The essential oil of *T. fontanesii* obtained from the aerial parts was dominated principally by monoterpenoid phenol (84.7%). The main components were thymol (76.6%) and p-cymene (7.4%).

Table 1. Chemical Composition of the Essential Oils

No ^a	Compounds	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Essential oils			Identification ^e
					<i>T. fontanesii</i>	<i>A. herba-alba</i>	<i>R. officinalis</i>	
1	α -Thujene	932	924	1028	0.2	-	-	RI, MS
2	α -Pinene	936	931	1028	0.9	0.3	12.8	RI, MS
3	Camphene	950	945	1071	0.2	10.3	0.2	RI, MS
4	Oct-1-en-3-ol	962	962	1441	0.5	-	-	RI, MS
5	β -Pinene	978	972	1113	0.1	-	0.2	RI, MS
6	Myrcenes	987	982	1160	2.1	-	0.1	RI, MS
7	α -Phellandrene	1002	999	1161	0.2	-	0.2	RI, MS
8	3-Carene	1005	1006	1149	0.1	-	-	RI, MS
9	α -Terpinene	1008	1011	1270	1.7	-	-	RI, MS
10	<i>p</i> -Cymene	1015	1015	1270	7.4	-	1.5	RI, MS
11	1,8-Cineole	1024	1021	1211	-	8.4	18.3	RI, MS
12	(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1029	1022	1234	0.6	-	-	RI, MS
13	Limonene	1039	1031	1967	-	-	4.2	RI, MS
14	γ -Terpinene	1051	1050	1245	2.3	0.2	3.8	RI, MS
15	trans-Sabinene hydrate	1051	1054	1445	0.1	0.1	-	RI, MS
16	Terpinolene	1082	1079	1281	0.2	-	-	RI, MS
17	Linalool	1083	1085	1538	1.7	0.5	-	RI, MS
18	Chrysanthenone	1110	1106	1504	-	25.6	-	RI, MS
19	Camphor	1123	1124	1506	0.1	32.3	-	RI, MS
20	α -pinocarvone	1135	1139	1632	-	-	1.4	RI, MS
21	Camphre	1144	1145	1532	-	-	15.4	RI, MS
22	Borneol	1148	1150	1688	0.3	4.5	12.7	RI, MS
23	Terpinen-4-ol	1164	1162	1591	1.1	3.2	1.2	RI, MS
24	α -Terpineol	1176	1176	1690	0.1	2.1	1.6	RI, MS
25	Verbenone	1183	1184	1723	-	-	12.7	RI, MS
26	Carvone	1214	1215	1278	-	3.5	-	RI, MS
27	Thymol	1266	1263	2181	76.6	-	-	RI, MS
28	Carvacrol	1278	1286	2193	0.6	-	-	RI, MS
29	Bornyl acetate	1285	1280	1600	-	-	2.6	RI, MS
30	Eugenol	1330	1329	2164	0.1	-	-	RI, MS
31	cis-Caryyl acetate	1343	1345	1858	0.1	-	-	RI, MS
32	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1421	1416	1591	1.6	-	0.2	RI, MS
33	(<i>E</i>)- α -Bergamotene	1434	1435	1573	Trace	0.1	-	RI, MS
34	α -Humulene	1455	1448	1668	0.1	0.1	0.6	RI, MS
35	γ -Humulene	1483	1480	1702	Trace	0.1	-	RI, MS
36	β -Bisabolene	1503	1499	1721	0.1	0.2	-	RI, MS
37	δ -Cadinene	1520	1511	1760	Trace	0.5	-	RI, MS
38	(<i>E</i>)- α -Bisabolne	1530	1531	1755	0.1	0.3	-	RI, MS
39	Spathulenol	1572	1560	2120	-	0.5	-	RI, MS
40	Globulol	1589	1578	2067	-	0.6	-	RI, MS
41	Caryophyllene oxide	1578	1567	1969	0.1	-	1.4	RI, MS
Total identification %					99.3	93.4	91.1	
Monoterpene hydrocarbons %					8.6	10.8	21.5	
Sesquiterpene hydrocarbons %					1.9	1.3	0.8	
Oxygenated monoterpenes %					3.6	80.2	65.9	
Oxygenated sesquiterpenes %					0.1	1.1	1.4	
Non terpenic oxygenated compounds %					0.5	-	-	
Monoterpenoid phenol. %					84.7	-	1.5	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1).^b Retention indices of literature on the apolar column (IRI_a) reported from König.⁹^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a).^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p).^e Identification mode; RI, retention indices; MS, mass spectrometry in electron impact mode.

The constituents identified in the aerial parts of *R. officinalis* and *A. herba-alba* essential oils were principally oxygenated monoterpenes (80.2 and 65.9%, respectively), followed by monoterpene hydrocarbons (10.8 and 21.5%, respectively). The main components of *A. herba-alba* essential oil were camphor (32.3%), chrysanthenone (25.6%), 1,8-cineole (8.4%) and borneol (4.5%). While, *R. officinalis* essential oil was characterized by 1,8-cineole (18.3%), camphene (15.4%), α -pinene (12.8%), borneol (12.7%), verbenone (12.7%) and limonene (4.2%) (Table 1).

DPPH Free Radical Scavenging Assay

All essential oils were able to reduce the stable free radical DPPH to the yellow colored diphenylpicrylhydrazine. However, *T. fontanesii* presented the highest antioxidant effect based on DPPH test that had the lowest IC₅₀ value of 13.7 mg/L. While, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils appeared to be the least active oils with IC₅₀ values of 24.5 and 79.4 mg/L, respectively (Table 2).

Essential oils blends were very effective compared to the individual essential oils tested. The combination of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils showed a significant increase in antioxidant activity with an IC₅₀ of 2.6 mg/L, almost equal to the synthetic antioxidant used as reference (IC₅₀ = 2,3 mg/L) (Table 3). The combination of essential oils of *T. fontanesii* and *R. officinalis* showed also good antioxidant activity with an IC₅₀ of 7.2 mg/L. However, the essential oils blends of *T. fontanesii* and *A. herba-alba*, and *A. herba-alba* and *R. officinalis* had promising antioxidant activities with IC₅₀s of 23.9 and 39.2 mg/L, but were still lower than the synthetic antioxidant (BHT) (Table 3).

Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

FRAP assay is a widely used method that uses antioxidants as reductants in a redox-linked colorimetric reaction, wherein Fe³⁺ is reduced to Fe²⁺. Figure 1 depicts the reducing power of individual and blend essential oils. All oils showed the presence the reductive effects, which increased with an increase in concentration. However, the combination of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils has been as effective on reducing power, compared to the synthetic antioxidant BHT. The individual and blends essential oils displayed chelating effects on ferrous ions, suggesting that it can sequestrate Fe-ions or reduce the concentration of metal.

Discussion

As a result, *T. fontanesii* presented the highest antioxidant effect, probably related to its chemical profile, especially the relatively high percentage of phenolic compounds. Thymol and p-cymene are the most frequently occurring constituents of essential oils obtained from thyme species, with many biological activities. They also act as antioxidants (free radical scavenger, anti-lipid peroxidative agent, etc).¹⁴⁻¹⁶ The moderated antioxidant activity obtained from *R. officinalis* essential oil could be the consequence of appreciable content of camphene, borneol, verbenone, 1,8-cineole and α -pinene, that represented more than 71% of the total oil. The lowest antioxidant activity was recorded for *A. herba-alba* oil where chrysanthenone, camphor, camphene and 1,8-cineole represented more than 66.3% of the total oil. The antioxidant activity obtained from *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils could be the consequence of appreciable contents of oxygenated monoterpenes (80.2 and 65.9%, respectively)

Table 2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil Radical Scavenging Activities (%)

Samples		Antioxidant Activity						IC ₅₀
		0.2	1	5	10	15	20	
<i>Thymus fontanesii</i>	Concentration (mg/L)	0.2	1	5	10	15	20	13.7±1.1
	DPPH radical scavenging activity (%)	3.1	5.8	19.8	37.2	54.6	72.1	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Concentration (mg/L)	5	10	15	20	25	30	24.5±2.1
	DPPH radical scavenging activity (%)	5.9	17.2	28.5	39.8	51.1	62.4	
<i>Artemisia herba-alba</i>	Concentration (mg/L)	10	20	30	50	70	90	79.4±2.8
	DPPH radical scavenging activity (%)	10.1	15.8	21.6	38.8	44.6	50.4	
BHT	Concentration (mg/L)	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	2.3±0.8
	DPPH radical scavenging activity (%)	28.4	35.6	47.9	71.9	85.1	86.6	

Table 3. Antioxidant Activity of Essential Oils Blends

Samples		Antioxidant Activity						IC ₅₀
		0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	
<i>Thymus fontanesii</i> + <i>Rosmarinus officinalis</i>	Concentration (mg/L)	0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	7.2±1.8
	DPPH radical scavenging activity (%)	4.1	7.8	29.8	38.1	52.5	62.1	
<i>Thymus fontanesii</i> + <i>Artemisia herba-alba</i>	Concentration (mg/L)	5.0	10	15	20	25	30	23.9±2.3
	DPPH radical scavenging activity (%)	6.8	18.3	29.5	40.4	53.2	63.4	
<i>Artemisia herba-alba</i> + <i>Rosmarinus officinalis</i>	Concentration (mg/L)	5.0	10	15	20	30	40	39.2±3.1
	DPPH radical scavenging activity (%)	12.1	17.5	24.6	40.8	46.2	50.5	
<i>Thymus fontanesii</i> + <i>Rosmarinus officinalis</i> + <i>Artemisia herba-alba</i>	Concentration (mg/L)	0.5	1.0	3.0	5.0	7.0	10	2.6±0.4
	DPPH radical scavenging activity (%)	20.5	34.5	59.9	65.3	80.7	93.7	
BHT	Concentration (mg/L)	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	2.3±0.6
	DPPH radical scavenging activity (%)	28.40	35.6	47.9	71.9	85.1	86.3	

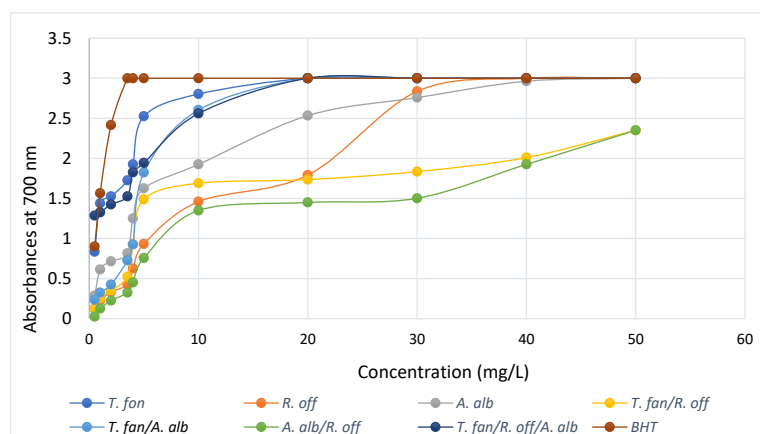


Figure 1. Ferric-Reducing Antioxidant Power Assay of Individual and Blend Essential Oils. Abbreviations: *T. fan*, *Thymus fontanesii*; *R. off*, *Rosmarinus officinalis*; *A. alb*, *Artemisia herba-alba*; BHT, butylated hydroxytoluene.

such as 1,8 cineole, camphor, chrysanthenone, verbenone and borneol. Indeed, Dawidowicz and Olszowy¹⁷ showed that camphor, one of the main components in essential oil of *Salvia hispanica*, has lower antioxidant activity. This is while, 1,8 cineole and borneol were naturally found in many aromatic plants and showed weak antioxidant activity.^{18,19} However, no information was found in the available literature about the biological activities of chrysanthenone and verbenone. Furthermore, monoterpene hydrocarbons are known to have noticeable antioxidant activities.²⁰ The obtained findings showed that essential oil combinations applied a promising synergistic antioxidant effect by decreasing the half maximal inhibitory concentration. The strong synergistic effect was found by combining *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils (Table 3). It seems that the association of thymol and p-cymene with 1,8-cineole, chrysanthenone, camphor, borneol and verbenone increases the antioxidant activity. *T. fontanesii* and *R. officinalis* essential oils blend also showed a good antioxidant capacity when compared to the value of the synthetic antioxidant. It is evident that this synergistic effect was found when thymol and p-cymene was paired with 1,8-cineole, borneol and verbenone. However, the blends of *T. fontanesii* and *A. herba-alba*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils showed the lowest antioxidant activities. It seems that the combination of thymol and p-cymene with chrysanthenone, camphor and 1,8-cineole produce low antioxidant power. While, the absence of thymol and p-cymene of blend significantly decreases this power.

In conclusion, the results showed that essential oil of *T. fontanesii* is a good source of monoterpene phenols as thymol and p-cymene. The essential oil had the best antioxidant activity using DPPH and FRAP methods. While, *R. officinalis* and *A. herba-alba* essential oils rich with oxygenated monoterpenes showed the lowest antioxidant activities by means of highest IC_{50} values. On the other hand, blends of essential oils showed an increase of antioxidant capacity. It seems that the monoterpene phenols (i.e. thymol and p-cymene) associated with oxygenated monoterpenes such as 1,8-cineole, chrysanthenone, camphor, borneol and verbenone play a pivotal role in this activity and produce

stronger synergistic effect. These results, therefore, represent a basis for further studies that could lead to the development of a new treatment based on the combination of these essential oils as natural antioxidant agents, both in food and pharmaceuticals fields.

Authors' Contributions

FB prepared the samples and carried out the experiments; MAD wrote the manuscript; AZ conceived the original idea; AM performed the analyzes; JC supervised the project.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare they have no conflicts of interest.

Ethical Approval

Not applicable.

References

- Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1990;29(4):273-300. doi:10.1080/10408399009527528.
- Pokorny J. Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Technol*. 1991;2:223-227. doi:10.1016/0924-2244(91)90695-F.
- Papachristos DP, Karamanoli KI, Stamopoulos DC, Menkissoglu-Spiroudi U. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Manag Sci*. 2004;60(5):514-520. doi:10.1002/ps.798.
- Swamy MK, Sinniah UR. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules*. 2015;20(5):8521-8547. doi:10.3390/molecules20058521.
- Blumenthal M. *Herbal medicines: expanded commission E monographs*. Boston: Integrative Medicine Communications; 2000:419-423.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem*. 2006;54(5):1822-1828. doi:10.1021/jf051922u.
- Grosso C, Oliveira AC, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Palavra AM. Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *J Food Sci*. 2009;74(9):C713-717. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01376.x.
- Jennings W, Shibamoto T. In: Jovanovich HB (ed). *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas*

- chromatography. New York: Academic Press; 1980.
9. Konig WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils library of mass finder 2.1. Ed. Hamburg: Institute of Organic Chemistry; 2001.
 10. McLafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. Ed, New York: Wiley-Interscience; 1988.
 11. McLafferty FW, Stauffer DB. Wiley registry of mass spectral data. 6th ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade: Newfield. 1994.
 12. Hatami T, Emami SA, Miraghaee SS, Mojarrab M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. Iran J Pharm Res. 2014;13(2):551-558. doi:10.22037/ijpr.2014.1518.
 13. Al-Qudah MA, Obeidat SM, Saleh AM, et al. Volatile components analysis, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Phlomis* species collected from Jordan. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2018;21(3):583-599. doi:10.1080/0972060X.2018.1489739.
 14. Beena, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. Bioorg Med Chem Lett. 2013;23(3):641-645. doi:10.1016/j.bmcl.2012.12.001.
 15. Mahmoud AL. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. Lett Appl Microbiol. 1994;19(2):110-113. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00918.x.
 16. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. Phytomedicine. 2010;17(13):1057-1060. doi:10.1016/j.phymed.2010.03.020.
 17. Dawidowicz AL, Olszowy M. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. Nat Prod Res. 2014;28(22):1952-1963. doi:10.1080/14786419.2014.918121.
 18. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules. 2014;19(11):17773-17798. doi:10.3390/molecules191117773.
 19. Chen L, Su J, Li L, Li B, Li W. A new source of natural D-borneol and its characteristic. J Med Plant Res. 2011;5(15):3440-3447.
 20. Elansary HO, Salem MZM, Ashmawy NA, Yacout MM. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. J Agric Sci. 2012;4(10):144-152. doi:10.5539/jas.v4n10p144.

ملخص

الغراء النباتي في الجزائر لا يمكن حصره، يتميز الغرب الجزائري وبالأخص منطقة تلمسان بوفرة النباتات الطبية وتنوعها ويمثل الحفاظ عليها مشكلة حيوية في جميع أنحاء البلاد. كان الهدف من هذه الأطروحة هو دراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للميكروبات والمضاد للاكسدة للزيوت الأساسية بالإضافة إلى المخاليل المتقاطعة لزيوت ستة نباتات طبية وعطرية: *Artemisia herba-alba*، *Rosmarinus officinalis*، *Thymus fontanesii*، *Salvia argentea*، *Satureja candidissima*، *Ammoides verticillata*.

تم استخلاص الزيوت الأساسية من خلال التقطير المائي بطريقة كلفنجر كما تم تحليلها بطريقة الكروماتوغرافيا الغازية والتحليل الطيفي، و انطلاقاً من هذا الأخير وجدنا ان زيت *Salvia argentea*، غني بالفيروجينول (19.5%)، و البوليجون (17.9%)، (E)-فيتول (13.5%)، 6- ثنائي هيدرو فيرو جينول (11.3%) و الأبيتاترين (10.0%). أما فيما يخص زيت *Verticillata* نجده يحتوي على نسبة كبيرة من الكارفارول (44.3%)، والليمونين (19.3%)، والبارا سيمان (19.2%)، والفا تيربين (11.1%)، في حين اننا وجدنا ان المكون الأساسي لزيت *Satureja candidissima* هو البوليجون (70.4%)، المانثول (5.2%)، و الأيزو مانتول (4.5%). كما اننا وجدنا ان زيت *Thymus fontanesii* يحتوي نسبة عالية جدا من الثيمول (76.6%)، والبارا سيمان (7.4%)، كذلك فيما يخص زيت *Artemisia herba-alba* فإنه يتكون من الكافور (30.2%) والكريساتينون (24.3%)، أيضا وجدنا ان زيت *Rosmarinus officinalis* يحتوي على 8-1 سينيول (15.4%)، و الفا بينين (11%)، والبورنيول (12.7%)، والكوفنفر (15%)، و الفيريبيون (10.7%).

أظهرت دراسة النشاط المضاد للاكسدة للزيوت بطريقة DPPH وFRAP نتائج واعدة حيث وجدنا ان زيوت كل من *S. argentea* و *A. verticillata* فاعلية كبيرة مضادة للاكسدة وهذا ما تبين في قيم IC50 والتي قدرت 0.7 ملغ / ملو 0.4 ملغ / مل على التوالي. في حين لوحظ وجود قدر مضاد للاكسدة التآزرية معزز يجمع بين زيوت *verticillata* و *A. S. candidissima* مع $IC_{50} = 0.17$ ملغ / ملو التي أظهرت تقدر بقيمة مضاد الاكسدة قريبة من مضاد الاكسدة الاصطناعي.

نتائج دراسة النشاط المضاد للميكروبات للزيوت منفردة و خلانها أظهرت تأثير مثبط للعديد من البكتيريا و الخمائر التي قمنا بتجربتها. حيث اننا وجدنا التأثير المثبط الأكثر فعالية في زيت *Salvia argentea* و الذي أظهر تأثيرات مثبطة جيدة للغاية ضد غالبية السلالات بما في ذلك *L. rhamnosus*، *B. cereus* و *B. subtilis*. حيث سجلنا ادنى تركيز مثبط CMI بنحصر من 0.02 إلى 0.8 ملغ / مل. من ناحية أخرى، فإن خليط زيوت *T. fontanesii* / *S. argentea* / *R. officinalis* حفظ بشكل كبير أدنى تركيز مثبط CMI فيما يخص بكتيريا *E. coli* و *B. subtilis*. كذلك خليط زيوت *S. argentea* / *A. verticillata* أظهر نشاطا مثبطا للغاية ضد الميكروبات خاصة ضد سلالات *S. Typhi* و *C. sporogenes* و *E. faecalis* حيث تم تسجيل قيم CMI منخفضة جدا.

كلمات مفتاحية: زيوت أساسية، تركيب كيميائي، تأثير تآزري، مضاد للاكسدة، مضاد للمكروبات.

Résumé

La richesse de la flore d'Algérie n'est plus à démontrer. A l'instar d'autres zones, l'Ouest algérien et en particulier la région de Tlemcen est caractérisée par une flore particulièrement riche en plantes médicinales. La préservation de cette biomasse végétale constitue un enjeu crucial à l'échelle du pays. Le travail de cette thèse visait l'étude de la composition chimique et l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles ainsi que les mélanges croisés de six plantes médicinales et aromatiques : *Ammoides verticillata*, *Satureja candidissima*, *Salvia argentea*, *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba-alba*.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation de type clevernger et analysée par CPG et CPG-MS. L'HE des racines de *S. argentea* a été riche en ferruginol (19,5%), pulegone (17,9%), (E)-phytol (13,5%), le 6,7 dihydroferruginol (11,3%) et l'abitatriène (10,9%), l'HE d'*A. verticillata* a été dominée par le carvacrol (44,3%), le limonène (19,3%), le p-cymène (19,2%) et le γ -terpinène (11,1%). Alors que Les principaux composants de l'HE de *S. candidissima* ont été la pulegone (70,4%), le menthol (5,2%) et l'iso-menthone (4,5%). L'HE de *T. fontanesii* été caractérisée par le thymol (76,6 %) et le p-cymène (7,4%). L'HE d'*A. herba-alba* a été dominée par le camphre (30,2%) et le chrysanthenone (24,3%). L'HE de *R. officinalis* a été caractérisé par la présence du 1,8-Cinéole (15,4%), l' α -Pinène (11%), le bornéol (12,7%), le Camphre (15%), et le Verbénone (10,7 %).

L'activité antioxydante des huiles étudiées ont présenté des effets antioxydants très prometteurs par les méthodes de DPPH et FRAP. Les HES de *A. verticillata* et *S. argentea* ont présenté le pouvoir antioxydant le plus élevé avec des IC_{50} de 0.4 mg/ml et 0.7 mg/ml respectivement. Alors qu'une capacité antioxydante synergique a été observée avec la combinaison des huiles de *A. verticillata* et de *S. candidissima* avec une $IC_{50} = 0.17$ mg/ml qui a montré une capacité proche des deux antioxydants synthétiques. L'activité antimicrobienne a montré un effet inhibiteur contre plusieurs bactéries par les huiles essentielles et les différentes fractions des huiles individuellement ou en combinaison avec des effets bactéricides et fongicides. L'effet inhibiteur le plus intense a été observé par l'HE de *S. argentea* qui a montré de très bons effets inhibiteurs contre la majorité des souches y compris *L. rhamnosus*, *B. cereus* et *B. subtilis*. *P. aeruginosa* avec des CMI variant de 0.02 à 0.8mg/ml. D'autre part, l'association des HE de *T. fontanesii*/*S. argentea*/*R. officinalis* réduisait considérablement les CMI, notamment des bactéries de *E. coli* et *B. subtilis*. De même, la combinaison des HES de *S. argentea*/*A. verticillata* a montré une activité antimicrobienne très intéressante contre les souches de *S. Typhi*, *C. sporogenes* et *E. faecalis* avec de très faible CMI.

Mots clés : Huiles essentielles, Composition chimique, effet synergique, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante

Abstract

The rich flora of Algeria is well established. Like other areas, western Algeria and in particular the region of Tlemcen is characterized by a flora particularly rich in medicinal plants. The preservation of this plant biomass is a crucial issue across the country. The work of this thesis focused on the study of chemical composition and activity: *Ammoides verticillata*, *Satureja candidissima*, *Salvia argentea*, *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* and *Artemisia herba-alba*. Extraction of EOs was carried out by hydrodistillation type clevernger and analyzed by CG and CG-MS.

EO's roots of *S. argentea* was rich in ferruginol (19.5%), pulegone (17.9%), (E)-phytol (13.5%), 6,7 dihydroferruginol (11.3%) and abitatriene (10.0%); 9%. *A. verticillata* HE was dominated by carvacrol (44.3%), limonene (19.3%), p-cymene (19.2%) and γ -terpinene (11, 1%). While, the main components of *S. candidissima* EO were pulegone (70.4%), menthol (5.2%) and iso-menthone (4.5%). The EO of *T. fontanesii* was characterized by thymol (76.6%) and p-cymene (7.4%). The HE of *A. herba-alba* was dominated by camphor (30.2%) and chrysanthenone (24.3%). *R. officinalis* EO was characterized by presence of 1,8-cineole (15.4%), α -pinene (11%), borneol (12.7%), camphor (15%), and verbenone (10.7%). The antioxidant activity of the oils studied showed very promising antioxidant effects by the DPPH and FRAP methods. On the other hand, *A. verticillata* and *S. argentea* EOs had the highest antioxidant potency with IC_{50} values of 0.7 mg/ml and 0.4 mg/ml, respectively. While a synergistic antioxidant capacity was observed with the combination of *A. verticillata* and *S. candidissima* oils with an IC_{50} of 0.17 mg/ml which showed a capacity close to both synthetic antioxidants.

The antimicrobial activity showed an inhibitory effect against several bacteria by the essential oils and the different fractions, individually or in combination with bactericidal and fungicidal effects. The most intense inhibitory effect was observed with *S. argentea* EO, which showed very good inhibitory effects against all strains including *L. rhamnosus*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* with MICs ranging from 0.02 to 0.8 mg / ml. On the other hand, the association of EO from *T. fontanesii*/*S. argentea*/*R. officinalis* significantly reduced MICs of *E. coli* and *B. subtilis* bacteria. Similarly, the combination of EOs of *S. argentea*/*A. verticillata* showed a very interesting antimicrobial activity against strains of *S. Typhi*, *C. sporogenes* and *E. faecalis* with very low MIC.

Key words: Essential oils, Chemical composition, synergistic effect, Antimicrobial activity, Antioxidant activity