

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR -ANNABA



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

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En **BIOCHIMIE**
Option : Biochimie appliquée

THEME

Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local :
Origanum vulgare et Mentha pulegium

Présentée par : BOUHADDOUDA Nabila

Directeur de thèse : M^r AOUADI Saoudi

MCA, Université d' Annaba

Membres de Jury:

Président : M^r LADJAMA Ali

Professeur, Université d' Annaba

Examineur : M^r CHEKIREB Djamel

Professeur, Université d' Annaba

Examinatrice : M^{me} BENDJEDDOU Amel

MCA, Université de Souk Ahras

Année universitaire : 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

Louange à Allah, le très puissant, clément et miséricordieux de m'avoir donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce travail de recherche.

Mes plus vifs remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse, le docteur Aouadi Saoudi, maître de conférences au département de Biochimie, Université Badji Mokhtar Annaba pour avoir accepté de m'encadrer et m'avoir proposé ce sujet de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience, vos précieux conseils et la totale confiance que vous m'avez accordé.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie et microbiologie appliquées, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, sous la direction du Professeur Ladjama Ali à qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour l'aide précieuse et l'accueil chaleureux qu'il m'a apporté tout au long de mes années de recherche. Aussi, je le remercie infiniment de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance.

Mes sincères remerciements vont également aux membres de jury de thèse pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail : Mr. Chekireb Djamel, maître de conférences au département de Biochimie, Université Badji Mokhtar Annaba et Mme Bendjeddou Amel, maître de conférences au département des sciences de la matière, Université de Souk Ahras. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect.

Je tiens à remercier madame Kaci, médecin spécialiste en microbiologie clinique, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et m'a aidé ainsi à maîtriser le matériel microbiologique et aussi pour m'avoir aimablement fournis les souches bactériennes.

Ma profonde gratitude va à Mr. Prost, président directeur général du laboratoire Lara Spiral pour la réalisation des analyses HPLC/UV.

Aussi, je remercie Mr. Figueredo directeur du laboratoire Lexva analytique pour la réalisation des analyses CPG/SM.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquées : Lazhar, Mouna et Sakina pour leur disponibilité et les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.

Un immense merci à Ryma Labiod, mon amie, avec qui j'ai passé d'excellents moments de complicité. Merci pour ton aide, ta collaboration et tes encouragements.

Merci à toutes mes amies : Hanene, Badra, Hayat, Imène, Amina, Imène... Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passé ensemble.

Le plus grand merci revient à mes très chers parents, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragé, me donnant toujours l'envie d'avancer et d'aller vers le meilleur, eux qui ont su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Jamais je n'aurai réussi sans eux. J'espère que mon travail sera le témoignage de ma gratitude et mon respect le plus profond. Que Dieu les protège et les garde en bonne santé.

Finalement, je tiens à remercier mon époux Zemmour Nabil qui a toujours été là à me soutenir et m'encourager, qui a su me comprendre et me supporter.

Merci à Tous...

DÉDICACE

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse:

A ma chère mère Zahia, pour ses précieux conseils, ses encouragements et son aide inestimable.

A mon cher père Hacène, qui a été le premier à m'encourager pour aller aussi loin dans mes études.

A mon très cher mari, j'aimerai bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car c'est grâce à ton aide, ta compréhension et ta patience que ce travail a pu voir le jour.

A mon petit ange Yanis, pour qu'un jour tu sois fier de ta maman.

À tous les membres de ma famille et ma belle-famille sans aucune exception.

Et enfin, à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

Résumé

Dans le cadre d'une valorisation des ressources naturelles de la région de Nechmaya à Guelma, nous avons entrepris une étude sur deux plantes très utilisées par la population locale, à savoir *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum*, qui est une espèce endémique algéro-tunisienne et *Mentha pulegium*.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la composition chimique des huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* par CPG/SM, de déterminer le taux et le profil global en polyphénols de leurs extraits méthanoliques par le réactif Folin-Ciocalteu et par HPLC/UV et l'étude des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique des deux huiles essentielles et extraits méthanoliques.

L'identification par CPG/SM des huiles essentielles extraites par hydrodistillation montre que para-cymène (25.615%), thymol (23.129%), carvacrol (20.321%) et gamma-terpinène (16.612%) sont les composants majoritaires pour *O. glandulosum* et pour *M. pulegium*, l'huile essentielle est dominée par la présence de pipéritone (65.019%).

Les extraits méthanoliques exposent une forte teneur en polyphénols totaux de l'ordre de 52.67% et 38.63% pour *O. glandulosum* et *M. pulegium*, respectivement. L'analyse HPLC/UV a permis de détecter la dominance de l'acide rosmarinique dans les deux extraits.

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques est évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH. Cette étude a permis de révéler le fort pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques, alors que les huiles essentielles exposaient un résultat très modeste comparé à celui des extraits méthanoliques et de l'antioxydant de référence.

D'autre part, les tests de l'activité antibactérienne sont exprimés sous forme de diamètres de zones d'inhibition par la méthode de diffusion sur disque et de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de microdilution. Les huiles essentielles ont été particulièrement efficaces contre toutes souches bactériennes testées. Quant aux extraits méthanoliques, toute la gamme de bactéries testées y a été résistante.

Nous avons testé par la suite leurs effets sur deux champignons phytopathogènes. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle et l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* sont relativement plus actifs que ceux de *M. pulegium*, et pour certaines concentrations ils se sont révélés plus actifs que les fongicides du commerce.

Mots clés: *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium*, huile essentielle, polyphénols, CPG/SM, HPLC/UV, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

For the valorization of natural resources of the region Nechmaya in Guelma city, we undertook the study of two plants widely used by local population, namely *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum*, an endemic plant of Algeria and Tunisia and *Mentha pulegium*.

The objective of this study was to evaluate the chemical composition of *O. glandulosum* and *M. pulegium* essential oils by GC/MS, to determine the amount and phenolic profile of their methanolic extracts by Folin-Ciocalteu reagent and HPLC/UV and evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of both essential oils and methanolic extracts.

The GC/MS analyses of the essential oils extracted by hydrodistillation showed p-cymene (25.615%), thymol (23.129%), carvacrol (20.321%) and gamma-terpinene (16.612%) as main components of *O. glandulosum* and *M. pulegium* essential oil was dominated by the presence of piperitone (65.019%).

The methanolic extracts, obtained using a Soxhlet apparatus, exhibited a high total phenolic content of about 52.67% and 38.63% for *O. glandulosum* and *M. pulegium*, respectively. The HPLC/UV analysis detected the dominance of rosmarinic acid in both extracts.

Antioxidant activity was evaluated using DPPH scavenging capacity assay. Methanolic extracts showed the strongest scavenging ability on DPPH radicals compared to essential oils and synthetic antioxidant.

For antibacterial activity, susceptibility tests were expressed as inhibition zone by the disc diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) by broth microdilution method. Essential oils were particularly found to possess strong antibacterial capacities while methanolic extracts remained inactive.

Thereafter, we tested their effects on two phytopathogenic fungi, the results obtained show that *O. glandulosum* essential oil and methanolic extract were relatively more active than those of *M. pulegium* against the fungal strains tested, and at some concentrations most active than the reference fungicides.

Keyword: *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium*, essential oil, polyphenols, GC/MS, HPLC/UV, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity

ملخص

من أجل تثمين الموارد الطبيعية لمنطقة النشماية في قالمة، قمنا بدراسة صنفين للنباتات الطبية نظرا لاستخدامهما على نطاق واسع من قبل السكان المحليين، وهما *Origanum vulgare ssp. glandulosum* التي تعد نبتة متوطنة بالجزائر و تونس و *Mentha pulegium*.

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التركيب الكيميائي للزيوت العطرية لكنتا النبتتين بواسطة CPG/SM ، تحديد الكمية و التركيبة العامة من البوليفينولات في مستخلصات الميثانول للنبتتين عن طريق كاشف Folin-Ciocalteu و HPLC/UV و كذلك دراسة الأنشطة المضادة للأكسدة، المضادة للبكتيريا و المضاد للفطريات للزيوت العطرية و مستخلصات الميثانول.

تحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المستخلصة عن طريق التقطير بالبخار يظهر أن *para-cymene* (25.615%)، *thymol* (23.129%)، *carvacrol* (20.321%) و *gamma-terpinène* (16.612%) هم المكونات الرئيسية لنبتة *Origanum glandulosum* و أن عنصر *piperitone* بنسبة 65.019% هو الغالب في تركيبة *Mentha pulegium*.

أظهرت مستخلصات الميثانول محتوى البوليفينول الكلي عال من حوالي 52.67% و 38.63% لنبتة *Origanum glandulosum* و *Mentha pulegium* على التوالي. كشف تحليل HPLC/UV يبين هيمنة حمض *rosmarinic* في كلتا المستخلصين.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت العطرية و مستخلصات الميثانول باستعمال اختبار DPPH. كشفت النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات الميثانول تملك خصائص مضادة للأكسدة جد قوية مقارنة بالزيوت العطرية التي أظهرت نتائج متواضعة جدا.

من ناحية أخرى، قمنا باختبارات لتقدير النشاط المضاد للبكتيريا من خلال حساب قطر تثبيط نمو البكتيريا بطريقة الانتشار القرصي و حساب تركيز المثبط الأدنى (CMI) من خلال طريقة التخفيف المتسلسل. وقد أثبتت الزيوت العطرية فعالية كبيرة ضد السلالات البكتيرية المستخدمة في التجربة. أما بالنسبة لمستخلصات الميثانول، فإن مجموعة البكتيريا المختبرة كانت مقاومة لها.

لقد اخترنا بعد ذلك آثارهم على اثنين من الفطريات الممرضة للنبات، والنتائج التي تم الحصول عليها تظهر أن الزيت العطري و مستخلص الميثانول لنبتة *Origanum glandulosum* كانا أكثر نشاطا من اللذين لنبتة *Mentha pulegium* وفي بعض التركيزات أكثر نشاطا من المضادات الفطريات المرجعية

الكلمات المفتاحية: *Origanum glandulosum*، *Mentha pulegium*، الزيوت العطرية ، بوليفينول، CPG/SM، HPLC/UV، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات.

SOMMAIRE

Liste des Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Aperçu bibliographique des plantes étudiées	
Généralités	4
1- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>glandulosum</i> (Desf.) Ietswaart	4
1-1- Description botanique	5
1-2- Position systématique.....	5
1-3- Aires de répartition.....	6
1-4- Utilisation en médecine traditionnelle	6
2 - <i>Mentha pulegium</i> L. ssp. <i>pulegium</i>	7
2-1- Description botanique	7
2-2- Position systématique.....	8
2-3- Aires de répartition.....	9
2-4- Utilisation en médecine traditionnelle	9
Chapitre 2 : Huiles essentielles et polyphénols	
Généralités	10
1- Huiles essentielles	10
1-1- Définition.....	10
1-2- Répartition systématique	11
1-3- Localisation dans la plante	11
1-4- Propriétés physiques.....	12
1-5- Composition chimique	13
1-5-1- Les composés terpéniques	13
1-5-2- Les phénylpropanoïdes	15
1-5-3- Composés d'origines diverses	15
1-6- Variabilité de la composition.....	17
1-7- Existence de Chémotypes.....	17
1-8- Procédés d'extraction	17
1-8-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	18

1-8-1-1- Hydrodistillation simple.....	18
1-8-1-2- Entraînement à la vapeur sèche.....	18
1-8-1-3- Distillation à la vapeur directe (Hydrodiffusion).....	19
1-8-2- Extraction par expression.....	19
1-8-3- Autres procédés.....	19
1-9- Propriétés biologiques des huiles essentielles.....	21
1-9-1- Chez les végétaux.....	21
1-9-2- Chez l'homme.....	21
1-9-2-1- Activités antibactérienne, antifongique et antivirale.....	22
1-9-2-2- Activité antioxydante.....	22
1-9-2-3- Autres propriétés biologiques.....	23
1-10- Applications industrielles des huiles essentielles.....	23
1-11- Toxicité des huiles essentielles.....	24
2- Polyphénols.....	25
2-1- Définition.....	25
2-2- Biosynthèse.....	25
2-3- Localisation dans la plante et distribution.....	26
2-4- Principales classes des polyphénols.....	26
2-5- Extraction des composés phénoliques.....	29
2-5-1- L'infusion.....	30
2-5-2- La macération.....	30
2-5-3- La décoction.....	30
2-5-4- Le Soxhlet.....	30
2-5-5- L'extraction par sonication.....	31
2-5-6- L'extraction assistée par microondes.....	31
2-6- Caractérisation des composés phénoliques.....	31
2-7- Propriétés biologiques des polyphénols.....	31
2-7-1- Chez les végétaux.....	31
2-7-2- Chez l'homme.....	32
2-7-2-1- Activités antibactérienne, antifongique et antivirale.....	32
2-7-2-2- Activité antioxydante.....	33
2-7-2-2- Autres propriétés biologiques.....	33
2-8- Applications industrielles des polyphénols.....	34

Chapitre 3 : Activités biologiques étudiées

Généralités	35
1- Activité antimicrobienne	35
1-1- Infection microbienne et antibiothérapie.....	35
1-2- Les principales substances antimicrobiennes	36
1-2-1- Les antibiotiques	36
1-2-2- Les plantes comme antibiotiques.....	36
1-3- Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles et polyphénols	37
1-3-1- Huiles essentielles.....	37
1-3-2- Polyphénols	38
2- Activité antioxydante	39
2-1- Les radicaux libres	39
2-1-1- Les différents types de radicaux libres.....	39
2-1-1-1- Les radicaux libres primaires	39
2-1-1-2- Les radicaux libres secondaires.....	40
2-2- Stress oxydant	40
2-3- Pathologies dues au stress oxydant.....	41
2-4- Les substances antioxydantes	42
2-4-1- Les antioxydants naturels	43
2-4-2- Les antioxydants synthétiques.....	44
2-5- Mécanisme d'action antioxydante des huiles essentielles et polyphénols	44
2-5-1- Huiles essentielles.....	44
2-5-2- Polyphénols	45

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et Méthodes

1- Matériel végétal.....	47
1-1- Critères de choix des plantes	47
1-2- Récolte, situation géographique, identification et conservation.....	47
2- Screening phytochimique	50
3- Extraction des huiles essentielles	52
3-1- Principe.....	52
3-2- Mode opératoire	52
3-3- Calcul du rendement	52

3-4- Cinétique d'extraction.....	53
4- Analyses des huiles essentielles.....	54
4-1- Analyse physique.....	54
4-2- Identification chimique des huiles essentielles.....	54
4-2-1- Principe.....	54
4-2-2- Conditions opératoires.....	56
4-2-2-1- Analyse par CPG/FID.....	56
4-2-2-2- Analyse par CPG/SM.....	56
5- Préparation des extraits méthanoliques.....	57
5-1- Principe.....	57
5-2- Mode opératoire.....	58
5-3- Calcul du rendement.....	58
6- Analyses des extraits méthanoliques.....	60
6-1- Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative).....	60
6-2- Caractérisation des polyphénols par HPLC/UV (analyse qualitative).....	61
7- Etudes des activités biologiques.....	63
7-1- Evaluation de l'activité antioxydante.....	63
7-1-1- Dépistage de l'activité antioxydante sur CCM à l'aide du DPPH.....	63
7-1-2- Test de piégeage du radical libre DPPH.....	64
7-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	66
7-2-1- Activité antibactérienne.....	66
7-2-1-1- Matériels.....	66
7-2-1-2- Préparation de l'inoculum.....	68
7-2-1-3- Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	68
7-2-1-4- Détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdillution.....	70
7-2-2- Activité antifongique.....	73
7-2-2-1- Matériels.....	73
7-2-2-2- Préparation de l'inoculum.....	74
7-2-2-3- Technique de dilution en milieu solide.....	74
 Résultats et Discussion	
1- Screening phytochimique.....	76
2- Extraction des huiles essentielles.....	77
3- Analyses des huiles essentielles.....	82

3-1- Caractéristiques physiques	82
3-2- Identification chimique des huiles essentielles.....	82
4- Extraction des composés phénoliques.....	99
5- Analyses des extraits méthanoliques.....	100
5-1- Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative)	100
5-2- Profil chromatographique global en polyphénols (analyse qualitative).....	102
6- Etude des activités biologiques	106
6-1- Evaluation de l'activité antioxydante.....	106
6-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	113
6-2-1- Activité antibactérienne	113
6-2-2- Activité antifongique	122
Conclusion et perspectives.....	130
Références bibliographiques.....	132
Annexes	162
Publication scientifique	

Liste des abréviations

Abréviation	Significations
AAI	Indice de l'activité antioxydante
AFNOR	Association Française de Normalisation
CASFM	Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMF	Concentration minimale fongicide
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DAD	Diode array detector
DI	Diamètre d'inhibition
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
FID	Flame Ionisation Detector
GAE	Equivalent acide gallique
GN	Gélose nutritive
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MH	Gélose Mueller Hinton
MHB	Bouillon Mueller Hinton
NBT	nitro blue tetrazolium
PDA	Potato Dextrose Agar
SM	Spectrophotomètre de masse

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Caractéristiques botaniques d' <i>Origanum vulgare</i>	6
02	Caractéristiques botaniques de <i>Mentha pulegium</i>	8
03	Structure chimique de l'isoprène	13
04	Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles	16
05	Biosynthèse des composés phénoliques par la voie shikimate	26
06	Structure de base des flavonoïdes	28
07	Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	38
08	Les formes actives de l'oxygène dans la cellule	39
09	Le déséquilibre entre la production des espèces réactives et la capacité antioxydante dans l'organisme	41
10	Les systèmes de défense naturels contre les radicaux libres	42
11	Comparaison entre la structure de la quercétine et de de la catéchine	46
12	Valeurs de Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante	46
13	Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes	46
14	Situation géographique de la région de Nechmaya	48
15	Zone de récolte d' <i>Origanum glandulosum</i>	49
16	Zone de récolte de <i>Mentha pulegium</i>	49
17	<i>Origanum glandulosum</i> (A) et <i>Mentha pulegium</i> (B)	49
18	Protocole expérimental d'extraction des huiles essentielles	53
19	Protocole expérimental de préparation des extraits méthanoliques	59
20	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	64
21	Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	78
22	Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	78
23	Représentation des rendements des huiles essentielles d' <i>Origanum glandulosum</i> extraites de différentes régions	80
24	Représentation des rendements des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i> extraites de différentes régions	81
25	Structures de composés identifiés dans l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	85
26	Répartition en % des principales familles des composés de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i>	87
27	Répartition en % des composés majoritaires de l'huile essentielle d' <i>O.glandulosum</i>	88

Liste des figures

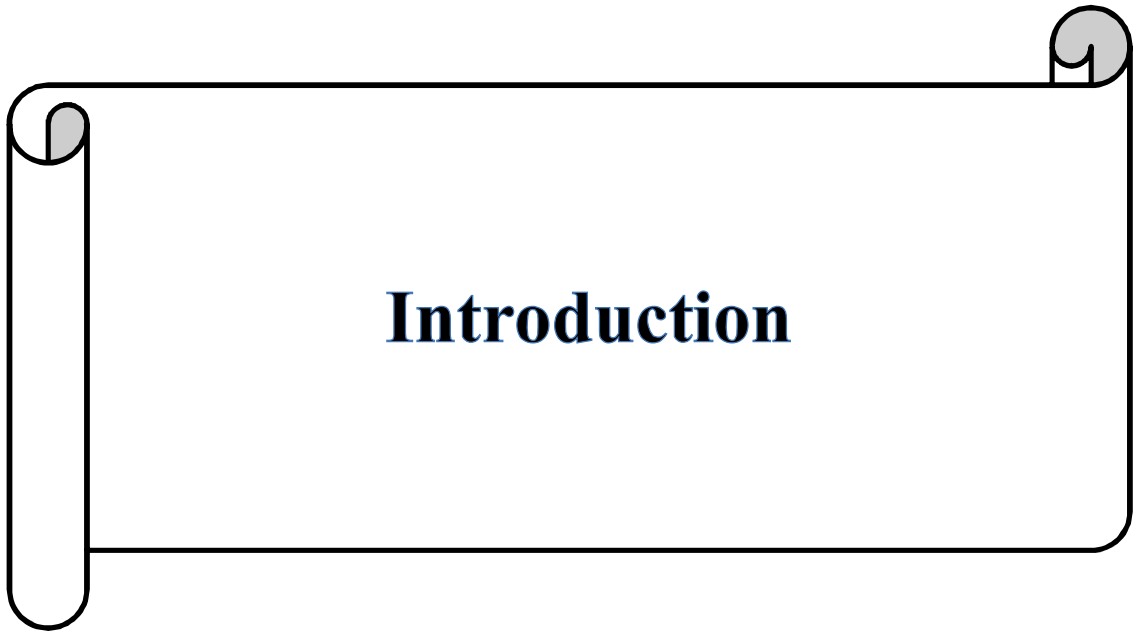
28	Concentration en thymol, carvacrol et para-cymène de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> de différentes régions	89
29	Structures des composés identifiés dans l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	93
30	Répartition en % des principales familles des composés de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	95
31	Répartition en % des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	96
32	Concentration en pulégone, pipéritone et piperiténone de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> de différentes régions	97
33	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	101
34	Activité antioxydante sur plaque CCM	106
35	Pourcentage d'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux plantes	107
36	Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> sur <i>Fusarium</i> sp.	123
37	Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> sur <i>Aspergillus</i> sp.	123
38	Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique d' <i>O. glandulosum</i> sur <i>Fusarium</i> sp.	123
39	Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique d' <i>O. glandulosum</i> sur <i>Aspergillus</i> sp.	123
40	Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i> sur <i>Fusarium</i> sp.	124
41	Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i> sur <i>Aspergillus</i> sp.	124
42	Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>M. pulegium</i> sur <i>Fusarium</i> sp.	125
43	Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique <i>M. pulegium</i> sur <i>Aspergillus</i> sp.	125
44	Analyse comparative des pourcentages d'inhibition des différentes concentrations des deux huiles essentielles sur <i>Fusarium</i> sp. et <i>Aspergillus</i> sp.	126
45	Analyse comparative des pourcentages d'inhibition des différentes concentrations des deux extraits méthanoliques sur <i>Fusarium</i> sp. et <i>Aspergillus</i> sp.	126

Liste des figures

46	Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	162
47	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	162
48	Profil des polyphénols de l'extrait méthanolique d' <i>Origanum glandulosum</i> par HPLC/UV	163
49	Profil des polyphénols de l'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i> par HPLC/UV	163
50	Photos représentant la sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> (A) et de <i>Staphylococcus aureus</i> (B) à l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	164
51	Photos représentant la sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> (A) et de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) à l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	164
52	Photos représentant la détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i> avant (A) et après révélation par le NBT	165
53	Photos représentant la détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> avant (A) et après révélation par le NBT	165
54	Photos représentant la sensibilité d' <i>Aspergillus</i> sp. (A) et de <i>Fusarium</i> sp. (B) à l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	166
55	Photos représentant la sensibilité d' <i>Aspergillus</i> sp. (A) et de <i>Fusarium</i> sp. (B) à l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	166
56	Photos représentant la sensibilité d' <i>Aspergillus</i> sp. (A) et de <i>Fusarium</i> sp. (B) à l'extrait méthanolique d' <i>Origanum glandulosum</i>	167
57	Photos représentant la sensibilité d' <i>Aspergillus</i> sp. (A) et de <i>Fusarium</i> sp. (B) à l'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i>	167

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Structures et squelettes des principales classes de composés phénoliques	26
02	Répartition des souches testées	66
03	Caractéristiques de l'antibiotique testé	67
04	Criblage phytochimique d' <i>Origanum glandulosum</i> et de <i>Mentha pulegium</i>	76
05	Rendement d'extraction des deux huiles essentielles	79
06	Caractéristiques physiques des huiles essentielles d' <i>Origanum glandulosum</i> et de <i>Mentha pulegium</i>	82
07	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i>	83
08	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	91
09	Rendement d'extraction des composés phénoliques des deux plantes	99
10	Analyse des polyphénols d' <i>Origanum glandulosum</i> par HPLC/UV	103
11	Analyse des polyphénols de <i>Mentha pulegium</i> par HPLC/UV	104
12	Activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d' <i>Origanum glandulosum</i> et de <i>Mentha pulegium</i>	108
13	Résultats de l'antibiogramme	114
14	Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique d' <i>Origanum glandulosum</i> contre les souches bactériennes testées	115
15	Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de <i>M. pulegium</i> contre les souches bactériennes testées	119
16	Résultats des antifongigrammes	122



Introduction

Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et de valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs (**Pelt, 2001**).

Les plantes aromatiques ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotique et abiotique qu'elles peuvent subir. Ces métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques. Les huiles essentielles et les polyphénols font partie de ce groupe de métabolites.

Au cours de ces dernières années, nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse, généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur (**Ames, 1983 ; Wang et al., 2008**). De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal et la conservation des aliments conduit au développement de microorganismes résistants à la plupart des antibiotiques (**Essawi et Srour, 2000**). Suite à cette préoccupation, il semble donc important de trouver une alternative. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces phénomènes de résistance bactérienne et d'oxydation des aliments.

Dans ce but, l'utilisation des plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et/ou antioxydant. Ainsi les huiles essentielles et les extraits organiques, notamment les polyphénols, suscitent un intérêt croissant comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant être employées comme alternatives à certaines substances synthétiques (**Bruneton, 1999**).

L'Algérie est considérée comme un pays riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes (**Quézel et Santa, 1962**). Ces plantes aromatiques sont à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque souvent comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation.

Au niveau de notre laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées (L.B.M.A), plusieurs travaux ont été effectués sur des plantes du sol local afin d'en déterminer leur composition en huiles essentielles, en polyphénols ou en polysaccharides ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques (**Chidouh et al., 2014 ; Barhouchi et al., 2014 ; Barhouchi et al., 2016 ; Labiod et al., 2015a ; Labiod et al., 2015b**). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier deux plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Guelma : *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* et *Mentha pulegium* appartenant toutes les deux à la famille des Lamiacées. Le choix de ces deux plantes est basé sur leurs utilisations fréquentes dans nos traditions locales culinaires et médicinales.

Un criblage phytochimique des deux plantes, l'extraction des huiles essentielles et des polyphénols et leurs caractérisations ainsi que l'évaluation des activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante) ont été réalisés.

Ces travaux sont décrits dans le présent manuscrit qui est composé de deux parties.

La première partie, consacrée à l'étude bibliographique, comprend trois chapitres :

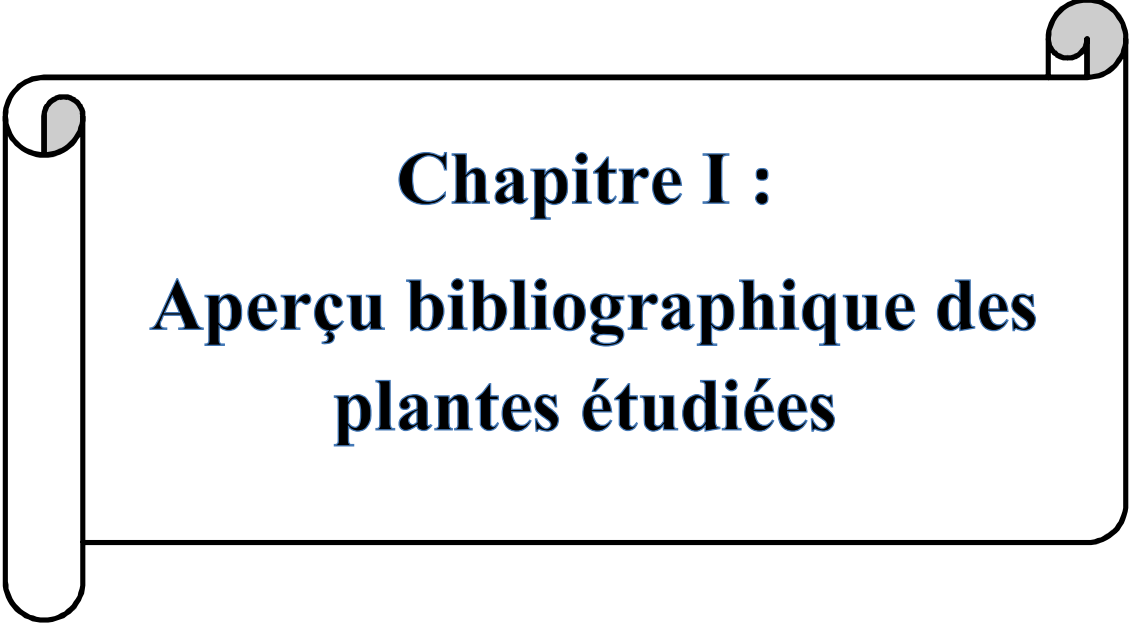
- Le premier est une description botanique générale des espèces étudiées (*Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* et *Mentha pulegium*), leurs répartitions géographiques et utilisation en médecine traditionnelle.
- Le deuxième chapitre donne un aperçu sur les huiles essentielles et les polyphénols : composition, localisation, répartition, procédés d'extraction et activités biologiques.
- Et le troisième chapitre est un rappel sur les activités biologiques étudiées.

La partie expérimentale est axée sur :

- Un screening phytochimique des deux plantes étudiées,
- L'extraction des huiles essentielles et des polyphénols (extraits méthanoliques) et leurs analyses par CPG/SM et HPLC/UV, respectivement.
- Une étude biologique *in vitro* visant à évaluer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des extraits méthanoliques. Les tests antibactériens sont réalisés sur 15 souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales et d'intoxications alimentaires. Les tests d'activité antifongique sont effectués sur 2 champignons phytopathogènes.
- Et enfin, la mise en évidence *in vitro* du potentiel antioxydant des huiles essentielles et des extraits méthanoliques par le test du piégeage du radical libre DPPH.

Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion présentant une synthèse des meilleurs résultats obtenus avec les perspectives envisagées, la liste des références bibliographiques, les annexes et la publication scientifique.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I :
Aperçu bibliographique des
plantes étudiées

Généralités :

La région méditerranéenne, d'une manière générale, et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. La production des huiles essentielles à partir de ces plantes pourrait constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays.

Les plantes médicinales Algériennes méritent une attention particulière. Il existerait en effet 3139 espèces décrites par **Quézel et Santa (1962)** dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, **Zeraia (1983)** dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques.

La famille des Lamiacées connue également sous le nom des Labiées, comprend environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais dont la plupart se concentre dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la lavande et le romarin (**Botineau, 2010**). La plupart des genres ont une importance économique due à leur richesse en huiles essentielles et leur utilisation en tant que condiments ainsi que infusions très prisées. Ainsi, ils ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques dans le but d'évaluer la présence de certains métabolites secondaires typiques (**Wink, 2003**). L'ancien nom des Lamiacées : Labiées dérive du nom latin "*labium*" qui signifie lèvre, en raison de la forme particulière des corolles.

Notre travail porte sur l'étude de deux espèces de la famille des Lamiacées : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*.

1- *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart :

Le terme origan provient du latin *origanum*, lui-même issu de grec *origanon*. Le terme français apparaît au XIII^{ème} siècle. En le décomposant étymologiquement, on trouve *oros*, la montagne et *ganos*, éclat, aspect riant, d'où la signification « *qui se plaît sur la montagne* ». En effet, l'origan ornait les montagnes méditerranéennes en abondance et assurait leur beauté. (**Dubois et al., 2005**).

Le genre *Origanum* comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisés par une extrême variabilité dans leurs caractères morphologiques (longueur de la tige, arrangement, nombre et longueur des branches, formes des feuilles,...) (**Kintzios, 2002**).

Les membres du genre sont principalement distribués le long de la région de la Méditerranée. Tandis que 75 % d'entre eux sont limités à la Méditerranée orientale, seulement quelques espèces existent dans la partie occidentale de la Méditerranée (**Skoula et al., 1999**).

Origanum vulgare L. (origan) étant l'espèce la plus répandue et la plus connue de la famille des Lamiacées (**Spada et Perrino, 1996**), l'une de ses sous espèces *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart, synonyme d'*O. glandulosum* Desf. fera l'objet de notre étude.

1-1- Description botanique :

L'origan est une herbacée vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude (**Arvy et Gallouin, 2003 ; Teuscher et al., 2004**).

Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices sessiles non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences. Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. Ce calice est lui-même en tube gamosépale et persistant. La corolle, plus grande que le calice, est quant à elle bilabée à tube saillant à la base et gamopétale. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de mai à octobre (**Baba Aissa, 1990 ; Teuscher et al., 2004 ; Figueredo, 2007**).

1-2- Position systématique :

D'après **Guignard (1996)**, la systématique d'*Origanum glandulosum* est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Série : Superovariées tétracycliques

Super ordre : Tubiflorales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Origanum*

Espèce: *Origanum vulgare*

Sous espèce: *Origanum vulgare* ssp. *glandulosum*



Figure 01 : Caractéristiques botaniques de *Origanum vulgare* (<http://www.branche-rouge.org/>)

1-3- Aires de répartition :

Origanum glandulosum, est une plante spontanée endémique qui pousse au nord de l'Afrique (Algérie et Tunisie) (Ietswaart, 1980). Très commune dans les endroits secs et ensoleillés tel que le Tell, elle pousse depuis le niveau de la mer jusqu'à 4000 m d'altitude, principalement sur les substrats calcaires (Baba Aissa, 1990).

1-4- Utilisation en médecine traditionnelle :

En Algérie, communément appelé « zaâter », l'origan est une plante essentiellement médicinale qui jouit d'une grande ferveur populaire (Baba Aissa, 1990). La sous-espèce *glandulosum* est utilisée comme tisane par la population locale pour guérir plusieurs maladies telles que : rhumatismes, toux, rhume et troubles digestifs (Mahmoudi, 1990 ; Erdogan et Belhattab, 2010).

2 - *Mentha pulegium* L. ssp. *pulegium*:

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, sont des herbacées vivaces, indigènes et très odorantes appartenant à la famille des Lamiacées (**Jahandiez et Marie, 1934**). Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces de menthe doivent leur odeur et activité à leurs huiles essentielles ou essences de menthe (**Benayad, 2008**).

Autant les menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires et des origines hybrides qui les relient. Parmi toutes les Lamiacées, les menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales (**Benayad, 2008**).

La menthe pouliot, *Mentha pulegium*, est l'espèce la plus exploitée pour ses vertus médicinales et aromatiques (**Rana et al., 1997 ; Cantino, 1998**).

Elle est représentée par deux sous espèces: *Mentha pulegium* ssp. *vulgaris* et *Mentha pulegium* ssp. *pulegium* (**Quézel et Santa, 1962**). Cette dernière fera l'objet de notre étude.

2-1- Description botanique :

C'est une plante de 10 à 30 cm de hauteur, à inflorescence formée de nombreux verticillés denses, feuillés et distants (**Quézel et Santa, 1963**). Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense. Le nom de *pulegium* vient de latin *pulex*, la puce car la plante a la propriété d'éloigner les puces (**Bekhechi, 2008**).

Les tiges à section carrée, sont plus ou moins dressées, verdâtres ou grisâtres, très ramifiées. Les feuilles, opposées et petites, sont ovales ou oblongues presque entières (légèrement dentelées ou crénelées) et munies d'un court pétiole.

Les fleurs, qui apparaissent l'été, de mai à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches, et sont groupées à l'aisselle des feuilles en glomérules largement espacés le long de la tige. Chaque inflorescence, en cyme, est axillée par une bractée foliacée. Elle englobe jusqu'à 30 fleurs. Deux préfeuilles, réduites, naissent à la base de chaque inflorescence. Le calice, persistant et finement velu, est en cloche. Il est faiblement bilabié, strié et à 5 dents subégales (les 2 dents inférieures sont plus étroites). La corolle est gamopétale formée de cinq pétales soudées. Le fruit est constitué de 4 akènes. (**Quézel et Santa, 1963 ; Arvy et Gallouin, 2003**).

2-2- Position systématique :

D'après **Quézel et Santa (1963)** et **Guignard et Dupont (2004)**, la systématique de *Mentha pulegium* est la suivante :

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha pulegium* (L.)

Sous espèce: *Mentha pulegium* ssp. *Pulegium*



Figure 02 : Caractéristiques botaniques de *Mentha pulegium* (<http://plantgenera.org/>)

2-3- Aires de répartition :

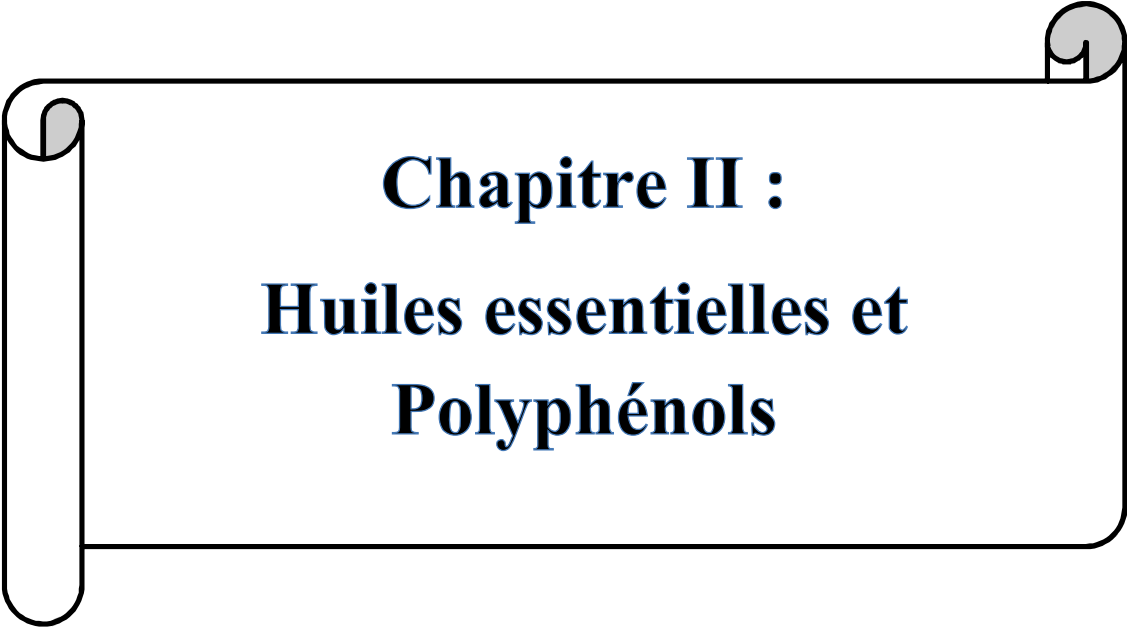
Mentha pulegium est très répandue dans le nord de l'Afrique, dans la région méditerranéenne et dans l'Asie (Quézel et Santa, 1963 ; Chalchat et al., 2000).

En Algérie, *Mentha pulegium* est très abondante et pousse spontanément (Quézel et Santa, 1963). Elle se rencontre dans les zones humides et généralement marécageuses, près des routes, et elle est plus abondante dans les pâturages de montagnes (Chalchat et al., 2000).

2-4- Utilisation en médecine traditionnelle :

La menthe pouliot, connue sous le nom vernaculaire arabe de « fliyou », est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures (Agnihotri et al., 2005 ; Diaz-Maroto et al., 2007). Les parties aériennes fleuries de cette plante sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (Zargari, 1990 ; Delille, 2007).

Depuis l'antiquité, Les Menthes conservent une grande diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Elles fortifient tout le système nerveux, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible, la menthe rend d'éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses (Benayad, 2008).



Chapitre II :
Huiles essentielles et
Polyphénols

Généralités :

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisés et accumulés en petites quantités par les plantes autotrophes. Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007**) :

- Les substances phénoliques "Composés aromatiques" comme les flavonoïdes, les tanins, la lignine, les coumarines.
- Les terpènes, c'est la plus grande catégorie de métabolites secondaires avec plus de 22000 molécules. Cette catégorie contient les hormones végétales, les pigments, les stérols, les hétérosides et une grande partie d'huiles essentielles.
- Les alcaloïdes, par exemple la morphine, la caféine, la nicotine, la cocaïne et l'atropine.

Notre travail s'orientera vers l'étude des huiles essentielles (métabolites secondaires appartenant principalement à la classe des terpènes mais aussi à la classe des composés aromatiques) et des polyphénols.

1- Huiles essentielles :

1-1- Définition :

Les huiles essentielles sont définies comme étant des liquides concentrés, très complexes et hydrophobes. Ce sont des extraits volatils et odorants qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques (fleur, feuille, bois, racine, écorce ou fruit). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Möller, 2008**).

L'association Française de Normalisation (**AFNOR, 2000**) définit les huiles essentielles comme étant « des produits obtenus à partir de matières naturelles végétales soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle ainsi obtenue est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.». A ce jour, 3000 huiles essentielles sont connues, seulement 300 d'entre elles sont commercialisées (**Burt, 2004**).

1-2- Répartition systématique :

Selon **Bruneton (1999)**, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, et les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques. Il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles, comme les Lamiacées (thym, menthe, lavande, origan), les Apiacées (anis, fenouil, angélique, cumin, coriandre), les Myrtacées (myrthe, eucalyptus) et les Lauracées (camphrier, laurier-sauce, cannelle). Ces espèces sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et du stockage des huiles essentielles (**Werker et al., 1993**).

1-3- Localisation dans la plante :

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs, en particulier les sommités fleuries (lavande, menthe, bergamotier, tubéreuse) mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal, camphrier), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (tout-épices, anis, badiane), les graines (muscade) et les boutons floraux (clou de girofle) (**Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (**Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010**) :

- Cellules à huiles essentielles, regroupant les cellules épidermiques et les cellules retrouvées au niveau du parenchyme cortical, du liber et du bois. Structures spécifiques des Lauracées ou des Zingibéracées ;
- Organes sécréteurs, regroupant : les poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées ; les canaux sécréteurs des Apiécées ou des Astéracées et les poils sécréteurs des Lamiacées.

1-4- Propriétés physiques :

Les huiles essentielles doivent répondre à des critères physiques imposés par les normes :

- Ce sont généralement des liquides à température ambiante, d'odeur aromatique très prononcée ;
- Leur consistance est huileuse mais non grasse ;
- Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes ;
- Leurs coloration varie de l'incolore au brun clair, à l'exception de celle d'azulène qui est bleue, celle de la cannelle qui est rougeâtre et de l'absinthe qui est verte ;
- Leurs densité est en général inférieure à celle de l'eau (de 0.850 à 0.950). Cependant, il existe des exceptions telles que l'huile essentielle de cannelle et de girofle dont la densité est comprise entre 1.025-1.070 et 1.044-1.057, respectivement ;
- Leurs point d'ébullition varie de 160° à 240° C ;
- Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (eau aromatique);
- Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques ;
- Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeur modifie, leurs point d'ébullition augmente et leurs solubilité diminue ;
- Leurs indice de réfraction est assez élevé, par exemple : coriandre : 1.4620-1.4700 et vétiver bourbon: 1.5220-1.5300, elles sont donc douées de pouvoir rotatoire.

(Paris et Hurabeille, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem et al., 2001 ; Baser et Buschbauer, 2010).

1-5- Composition chimique :

Du point de vue chimique, les huiles essentielles sont constituées de mélanges extrêmement complexes. Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes (Buchanan et al., 2000). Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). C'est la technique la plus utilisée, car elle permet de réaliser une analyse complète de plus d'une centaine de molécules chimiques que contient l'huile. Le spectromètre de masse (SM), que l'on associe souvent à la chromatographie (CPG-SM), permet lui d'obtenir la composition précise de l'huile essentielle (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi et al., 1995 ; Platzer, 2002).

1-5-1- Les composés terpéniques :

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone à la formule générale $(C_5H_8)_n$ reconnue par Wallach dès 1887 (Lamarti et al., 1994).

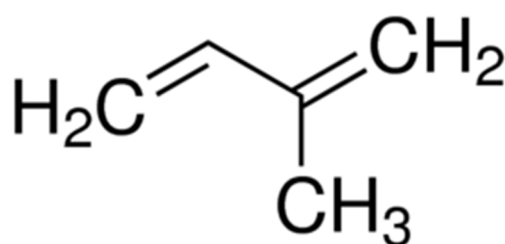


Figure 03 : Structure chimique de l'isoprène

Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires.

Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (**Lamarti et al., 1994**). Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Ainsi, on distingue selon le nombre de carbone: les monoterpènes (C 10), les sesquiterpènes (C 15), et moins fréquemment les diterpènes (C 20), les triterpènes (C 30) et les tétraterpènes (C 40). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**) et leurs confèrent un caractère volatil et des propriétés olfactives (**Pibiri, 2006**).

1-5-1-1- Les monoterpènes :

Les terpènes simples sont formés de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (**Rahal, 2004**). On y rencontre des monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), des monoterpènes monocycliques (α - et γ -terpinène, *p*-cymène) et des monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène).

Selon **Bruneton (1999)**, la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions:

- Alcools : acycliques (géraniol, linalol, citronellol) monocycliques (menthols, α -terpinéol, 1-terpinènes-4-ol) ou bicycliques (bornéol, fenchol) ;
- Aldéhydes : le plus souvent acycliques (géraniol, néral, citronellal) ;
- Cétones : acycliques (tagétone), monocycliques (menthone, carvone, pulégone) ou bicycliques (camphre, fenchone, thuyones) ;
- Esters : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle, d' α -terpinyl) ou bicycliques (acétate d'isobornyle);
- Peroxydes : ascaridole ;
- Ethers : cinéole (on dit aussi eucalyptol);
- Phénols : thymol, carvacrol.

Les monoterpènes peuvent constituer parfois plus de 90% des huiles essentielles (Citrus) (**Bruneton, 2009**).

1-5-1-2- Les sesquiterpènes :

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demi (sesqui) la molécule de monoterpène (**Belaiche, 1979**). Ils présentent une grande variété dans leurs structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé leur élucidation (**Rahal, 2004**). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions chimiques caractéristiques comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals) ou esters (acétate de cédryle) (**Laouer, 2004 ; Bruneton, 2009**).

1-5-2- Les phénylpropanoïdes :

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Paris et Hurabielle, 1981**).

Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (**Buchanan et al., 2000**).

Bruneton (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil: anéthole, anisaldehyde, estragole. persil : apiole) mais aussi de celles du girofle (eugénol), de la muscade (safrol, eugénol), de l'estragon (eugénol), du basilic (eugénol), de l'acore (asarone) ou de la cannelle (cinnamaldéhyde, eugénol, safrol).

1-5-3- Composés d'origines diverses :

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides et lactones (**Teisseire, 1991**). Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares (**Bruneton, 1999**).

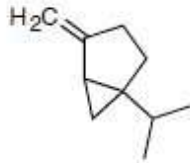
I. Terpenes

-Monoterpenes

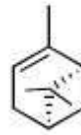
Carbure monocyclic
Cymene ("y") or p.cymene



Sabinene



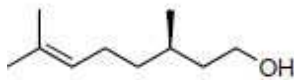
Carbure bicyclic
Alpha-pinene



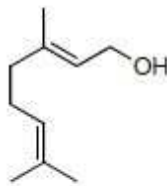
Betapinene



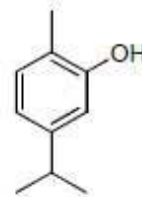
Alcohol acyclic
Citronellol



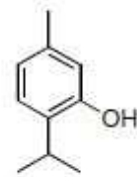
Geraniol



Phenol
Carvacrol

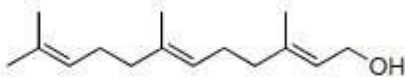


Thymol

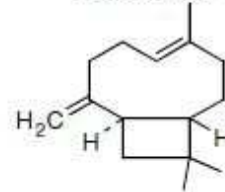


-Sesquiterpenes

Carbure
Farnesol

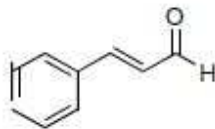


Alcohol
Caryophyllene

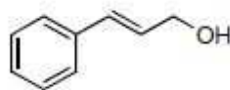


2. Aromatic compounds

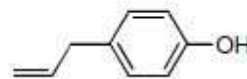
Aldehyde
Cinnamaldehyde



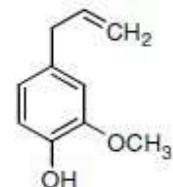
Alcohol
Cinnamyl alcohol



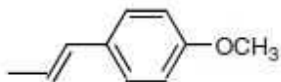
Phenol
Chavicol



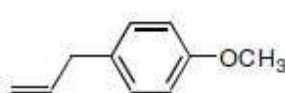
Phenol
Eugenol



Methoxy derivative
Anethole



Methoxy derivative
Estragole



Methylene dioxy compound
Safrole

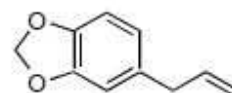


Figure 04 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

1-6- Variabilité de la composition :

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions telles que l'environnement, le génotype et l'origine géographique. D'autres facteurs interviennent également tels que la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes et le choix de la méthode d'extraction. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Müller-Riebau, 1997 ; Zygadlo et Juliani, 2003 ; Burt, 2004 ; Bozin et al., 2006 ; Möller, 2008).

1-7- Existence de Chémotypes :

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera. Ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes, types biogénétiques, races chimiques ou races biologiques. Parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement, on l'appelle composé majoritaire et ça sera lui qui définit le chémotype de cette huile (exemple : Thymus à thymol, à geraniol, à carvacrol, à linalol) (Cosentino et al., 1999). Biochimiquement différents, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2006). La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles (Laouer, 2004).

1-8- Procédés d'extraction :

Avant de pouvoir utiliser ou analyser les huiles essentielles, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point. Parmi les divers procédés d'extraction des huiles essentielles deux seulement sont admis par la pharmacopée française ainsi que par l'AFNOR :

- L'extraction par entraînement à la vapeur (distillation).
- L'extraction par expression (pressage).

1-8-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau. **Bruneton (1999)** signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe. La différence entre elles réside dans le degré de contact entre l'eau et le matériel végétal :

1-8-1-1- Hydrodistillation simple :

C'est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité.

Cette méthode est généralement utilisée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées.

1-8-1-2- Entraînement à la vapeur sèche :

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou de réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers la plante en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement où elle retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc, par décantation, en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (**Belaiche, 1979 ; Benjilali, 2004**).

Cette méthode est utilisée dans la distillation à partir de plantes fraîches telles que la menthe et le myrte et les plantes qui portent leurs huiles essentielles dans les feuilles. Puisque la plante fraîche est riche en eau, donc il n'est pas nécessaire de l'immerger.

1-8-1-3- Distillation à la vapeur directe (Hydrodiffusion) :

C'est une variante de l'entraînement à la vapeur. Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur. La composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (**Bruneton, 1999 ; Benjlali, 2004**).

1-8-2- Extraction par expression :

C'est une technique simple où le matériel végétal est pressé mécaniquement à froid pour extraire son huile essentielle. Cette méthode est essentiellement utilisée pour recueillir les huiles essentielles des épicarpes frais des Citrus (citrons, oranges, mandarines et pamplemousses). Dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (**Bruneton, 1999**); ou encore après scarifications mécaniques et entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation (**Paris et Hurabielle, 1981**).

1-8-3- Autres procédés :

D'autres procédés sont utilisés le plus souvent pour les plantes délicates qui ne supportent pas la chaleur. Ceux-ci occupent cependant une place considérable sur les marchés de la pharmacie, des produits d'hygiène, de l'industrie cosmétique, de la parfumerie, ainsi que dans de nombreux secteurs de l'industrie agro-alimentaire :

- **L'extraction par enfleurage :** Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaiche, 1979 ; France Ida, 1996**).

Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite.

- **L'extraction par les solvants volatils :** Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut pas extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu (pour éliminer les cires) conduit à «l'absolue» (**Luque de Castro et al., 1999**).

L'extraction par les solvants présente toutefois des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits, en effet, de nombreuses substances peuvent de ce fait se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, cires, certaines coumarines) et imposer une purification ultérieure, et en second lieu, à la toxicité des solvants et leur présence sous forme de traces résiduelles dans l'extrait final (**Bruneton, 1999**).

- **L'extraction au fluide supercritique :** Procédé relativement nouveau qui semblerait *a priori* intéressant pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. En effet, dans des conditions particulières de température et de pression situées au-delà du point critique, les fluides acquièrent des propriétés importantes qui se caractérisent par une bonne diffusibilité dans les matières solides et un bon pouvoir solvant. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, mais l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO₂, car celui-ci présente d'incontestables atouts : produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (**Wichtel et Anton, 1999 ; Kazazi et al., 2007**). L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et se charge en composé à extraire. Ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait.

L'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit selon **Scheffer (1997)** des huiles de très bonne qualité et en un temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques.

- **L'extraction par micro-ondes** : C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**Paré, 1997**). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant. On filtre et on récupère ensuite l'extrait.

L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**France Ida, 1996**). Ce procédé, très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (**Bruneton, 1999**).

1-9- Propriétés biologiques des huiles essentielles :

1-9-1- Chez les végétaux :

Les plantes aromatiques produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu (**Rai et al., 2003**).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Belaiche, 1979**). Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes (**Capon et al., 1990**).

1-9-2- Chez l'homme :

La diversité moléculaire des métabolites que les huiles essentielles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

1-9-2-1- Activités antibactérienne, antifongique et antivirale :

La majorité des huiles essentielles ont un spectre d'action très étendu contre un large éventail de microorganismes dont les bactéries, les champignons et les levures, les virus et les protozoaires. La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antimicrobiennes (**Burt, 2004**).

Les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires ainsi que dans le traitement des infections fongiques touchant l'homme (**Sokmen et al., 1999 ; Serrano et al., 2008 ; Kotan et al., 2010**).

Les activités antibactérienne et antifongique sont estimées à la grande complexité de la composition des huiles essentielles. Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien et antifongique le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol) et des aldéhydes (néral, géraniol). En général, l'activité décroît selon le type de fonction chimique: phénol > alcool > aldéhyde > cétone > ester > hydrocarbure (**Benjlali et al., 1986**).

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolus jusqu'à ce jour. Les huiles essentielles constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux. En effet, les virus sont très sensibles aux phénylpropanoïdes, monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles (**Astani et al., 2010 ; Astani et al., 2011**).

1-9-2-2- Activité antioxydante :

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

1-9-2-3- Autres propriétés biologiques :

Effets antiinflammatoires: L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leurs activités antioxydantes, mais aussi à leurs interactions avec les cascades de signalisation impliquant les cytokines et les facteurs de transcription régulateurs (Miguel, 2010).

Effets anticancérigènes: Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle de *Nigella sativa L.* démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Ait Mbarek et al., 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et al., 2004).

1-10- Applications industrielles des huiles essentielles :

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs. Elles sont largement utilisées en traitement des infections d'origine bactérienne, fongique ou virale. En effet, les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques, ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies et les infections, notamment les infections respiratoires (Buchbauer et Jirovetz, 1994).

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée des produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure, et à réduire la prolifération des microorganismes (Hammer et al., 1999 ; Lis-Balchin et al., 1998). Les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires, sont également connus pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes sur plusieurs bactéries responsables de la pollution des aliments et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration (Burt, 2004 ; Sipailiene et al., 2006). Les huiles essentielles ont également des propriétés fongicides et sont très efficaces contre les moisissures responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leur stockage (Prakash et al., 2012).

Les huiles essentielles sont composées d'un grand nombre de molécules volatiles. En diffusion dans l'atmosphère, ou diluées dans les produits de nettoyage, elles désinfectent, désodorisent et parfument agréablement et naturellement l'air en éliminant 90% du pouvoir bactérien. Cette pratique est utile en particulier dans le milieu hospitalier, comme elle peut être utilisée également pour l'assainissement de l'atmosphère des locaux tels que dans la conservation du patrimoine bibliographique des musées et des archives (**De Billerbeck, 2002**), ou pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (**Pibiri, 2006**).

En plus de leurs utilisations thérapeutiques, les huiles essentielles sont largement appliquées en cosmétiques (aromatisation des savons, parfumerie).

1-11- Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autres ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (**Guba, 2001**).

2- Polyphénols :

2-1- Définition :

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques spécifique du règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux (**Bravo, 1998**).

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés (**Bravo, 1998 ; Mompon et al., 1998**).

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples comme les acides phénoliques simples vers les molécules les plus hautement polymérisées comme les tanins condensés (**Macheix et al., 2005**).

2-2- Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Figure 05). Cette voie shikimate est à l'origine de la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) dont la désamination conduit à la formation des acides cinnamiques et *p*-coumarique et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénone, lignanes, lignines et coumarines (**Bruneton, 1993**).

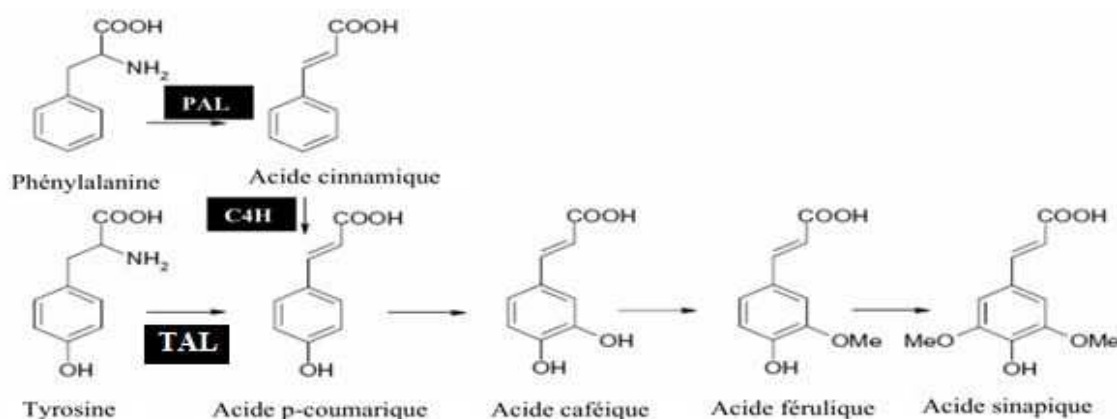


Figure 05 : Biosynthèse des composés phénoliques par voie shikimate (**Crozier et al., 2006**)

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; TAL : tyrosine ammonia-lyase.

2-3- Localisation dans la plante et distribution :

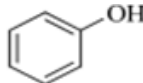
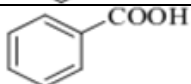
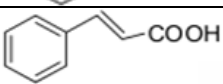
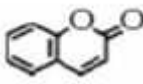
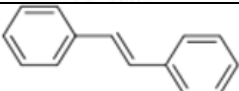
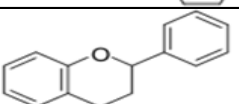
Les polyphénols sont majoritairement présents dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles et les écorces de bois de tous les végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

Les principales sources alimentaires sont les fruits et les légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et les légumes contribuent environ à la moitié de notre apport en polyphénols. Les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportent le reste (Middleton et al., 2000).

2-4- Principales classes des polyphénols :

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes dont la plupart ont des représentants chez de nombreux végétaux. Les premiers critères de distinction entre ces classes concernent le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carbone (Tableau 01) (Macheix, 1996).

Tableau 01 : Structures et squelettes des principales classes de composés phénoliques (Crozier et al., 2006)

Squelette carboné	Classe	Structure de base
C_6	Phénols simples	
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	 
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	

2-4-1- Les acides phénoliques :

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques (acides phénols en C₆-C₁) sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (**Manach et al., 2004**). Les acides hydroxycinnamiques (acides phénols en C₆-C₃) sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide *p*-coumarique, acide caféique, acide férulique et acide sinapique. L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (**El Gharras, 2009**).

2-4-2- Les coumarines :

Les coumarines qui sont aussi des dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus des benzopyrones (**O'Kennedy et Thornes, 1997**) et toutes sont substituées en C₇ par un hydroxyle. Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

2-4-3- Les stilbènes :

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆. Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**). Le plus connu d'entre eux est le resvératrol qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales (**El Gharras, 2009**).

2-4-4- Les flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge (**Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006**). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.

À l'état naturel les flavonoïdes peuvent se trouver sous forme d'hétérosides (C- ou O-glycosides) (**Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999**) et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose ou l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères. Mais de façon générale les flavonoïdes se trouvent à l'état libre et ils sont dits aglycones (**Dacosta, 2003**).

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₃-C₆ et les composés de chaque sous-classe des flavonoïdes se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles ou autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et en position 3 sur l'hétérocycle oxygéné central (C) de la structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 06) (**El Gharras, 2009 ; Dacosta, 2003**).

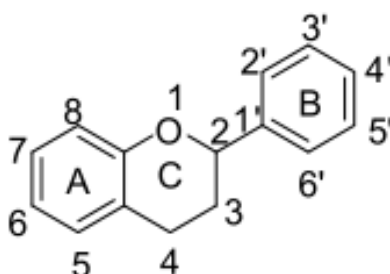


Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes (**Di Carlo et al., 1999**)

Les flavonoïdes peuvent être eux-mêmes divisés en plusieurs sous-classes, en fonction du type de l'hétérocycle impliqué, dont les plus importantes sont: flavonols (kaempferol, quercétine : l'oignon, les brocolis, les poireaux et les myrtilles), flavones (lutéoline, apigénine glycosylés : le persil et le céleri), flavanes, flavanols (catéchine : pomme, thé), flavanones (naringénine, hespéridine, ériodictyol : pamplemousse, Orange, citron) et aurones (**Manach et al., 2004 ; Leonard et al., 2008**).

2-4-5- Les lignanes :

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane (C₆-C₃). Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins (**El Gharras, 2009**).

2-4-6- Les tanins :

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

Les tannins hydrolysables : qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

Les tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols : sont fondamentalement différents des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur édifice moléculaire et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. L'aptitude de ces composés à s'associer avec les protéines salivaires leur confère la propriété d'astringence que l'on retrouve chez certains fruits (raisin, pomme, poire) et certaines boissons (thé, vin) (**Prieur et al., 1994 ; El Gharras, 2009**).

2-5- Extraction des composés phénoliques :

L'extraction de principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation de ces composés phénoliques. Cependant, il n'y a pas de méthode d'extraction unique et standard.

L'extraction est influencée par la méthode choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière / volume du solvant, le temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure (**Muanda, 2010**).

L'extraction solide-liquide est la procédure la plus couramment utilisée. En effet, ces techniques sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être largement appliquées. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tels que les acides phénoliques ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs, les mélanges d'alcool-eau ou acétone-eau sont recommandés (**Naczk et Shahidi, 2004**). Les solvants moins polaires (dichlorométhane, chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, chlorophylle).

Classiquement, les techniques d'extractions solide-liquide utilisées sont: l'infusion, la macération, la décoction, l'extraction au Soxhlet et, dans certains cas, l'extraction par sonication et l'extraction assistée par microondes.

2-5-1- L'infusion : c'est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement porté à ébullition que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes et le thé.

2-5-2- La macération : c'est une méthode d'extraction solide-liquide similaire à l'infusion qui s'effectue à température ambiante. Elle est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur.

2-5-3- La décoction : elle consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant. Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le solvant d'extraction est à température ambiante (**Muanda, 2010**).

2-5-4- Le soxhlet : c'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode sont : la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles. Etant donné la grande quantité de solvant utilisée, l'étape postérieure d'évaporation/concentration devient limitante (**Grigonis et al., 2005 ; Penchev, 2010**).

2-5-5- L'extraction par sonication : c'est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Comme le Soxhlet, l'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels (**Wang et Waller, 2006 ; Penchev 2010**).

2-5-6- L'extraction assistée par microondes : c'est également une alternative aux méthodes d'extraction conventionnelles. Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement élevée (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants (**Penchev, 2010**).

2-6- Caractérisation des composés phénoliques :

Le double objectif identification/quantification consiste à déterminer la composition chimique des extraits par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographique. De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée par couplage d'une technique chromatographique : la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) qui s'adresse à des substances peu ou pas volatiles, permettant l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (UV, SM, IRTF, ...), qui permet leur identification par combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus (**Sutour, 2010**).

2-7- Propriétés biologiques des polyphénols :

2-7-1- Chez les végétaux :

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- Certains aspects de la physiologie de la plante : ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les insectes et les oiseaux pollinisateurs et disperseurs de graines. Ils interviennent aussi dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant leur saveur. Ainsi, les flavanones sont responsables de l'amertume des *Citrus* (**Dubois et al., 1977**) et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs. Ils sont aussi responsables de la lignification (**El Gharras, 2009**).

- Les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique : représentant un système de défense contre les microorganismes pathogènes par interactions moléculaires avec les bactéries, les champignons, les parasites et les insectes (**Bahorun, 1997**). Les polyphénols sont aussi connus pour leur effets protecteurs contre le rayonnement UV en absorbant à la fois ces radiations et en éliminant les espèces réactives de l'oxygène formées (**Heimeur et al., 2004 ; Macheix et al., 2005 ; Stalikas, 2007**).

2-7-2- Chez l'homme :

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**).

Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**).

2-7-2-1- Activités antibactérienne, antifongique et antivirale :

Beaucoup d'études ont été faites pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales (**Xia et al., 2011**).

Les composés appartenant aux acides phénoliques les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféïques et sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus (**Cowan, 1999 ; Cheng et al., 2008**).

Les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (**Dixon et al., 1983**), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes (**Cowan, 1999 ; Daglia, 2012**).

Des travaux ont mis en évidence l'impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Des chercheurs ont montré que les flavonoïdes ont une action sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (**Mahmood et al., 1993**).

Les flavonols issus de fractions de propolis ont également montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 (HSV-2) sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur de haut risque pour la transmission du VIH (**Khan et al., 2005**).

2-7-2-2- Activité antioxydante :

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols, et en particulier, les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives (**Quideau et al., 2011 ; Rice-Evans et al., 1995**).

2-7-2-2- Autres propriétés biologiques :

Effets cardiovasculaires : De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose. Ainsi, ils limitent l'incrustation des LDL dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang (**Chang et al., 2009 ; Mulvihill et Huff, 2010**). Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose conduisant à l'occlusion des artères (**Scalbert et al., 2005 ; Zhou et al., 2009**).

Effets antiinflammatoires : Les polyphénols sont *in vitro* des inhibiteurs enzymatiques des élastases et des collagénases, ce sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase ainsi que de la cyclo-oxygénase donc de la biosynthèse des prostaglandines. Ce qui peut expliquer l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**). Des études ont pu confirmer l'effet de ces composés vis-à-vis de la maladie de Parkinson qui se caractérise par une dégénérescence des neurones, dont l'inflammation joue un rôle dans son apparition. Les chercheurs ont observé que la lutéoline inhibait de manière dose-dépendante la perte de neurones (**Chen et al., 2008**).

Effets anticancérigènes : Les flavonoïdes seraient impliqués dans la prévention des cancers. Ajoutés au régime de divers animaux de laboratoire, ils limitent le développement de tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de

nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie) à tous les stades de la cancérogenèse (**Petti et Scully, 2009 ; Hirata et al., 2009**). Présents comme des couleurs brillantes dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montrés leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (**Zhang et al., 2005**). Les coumarines ont aussi été prouvés possédant une activité anti-cancérigènes (**Ito et al., 2005 ; Hirata et al., 2009**).

2-8- Applications industrielles des polyphénols :

Les diverses propriétés des polyphénols ont été exploitées, et ont trouvé des applications dans de nombreux domaines: en agroalimentaire, en industrie pharmaceutique et en cosmétique. Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (**Daglia, 2012**). L'effet de certains flavonoïdes est de plus en plus étudié, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA (**Wu et al., 2003**).

La capacité antioxydante des polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (**Moure et al., 2001**).



Chapitre III :
Activités biologiques étudiées

Généralités :

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en agents antimicrobiens et antioxydants naturels à savoir les polyphénols et les huiles essentielles. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques est devenue un objectif prioritaire pour les recherches scientifiques en industries alimentaires et en pharmaceutiques.

1- Activité a

ntimicrobienne :

1-1- Infection microbienne et antibiothérapie :

Les infections microbiennes sont causées par différents microorganismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues.

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**). Cependant, la prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes (**Billing et Sherman, 1998**).

Il y a deux sources majeures pour la recherche de nouveaux antibiotiques : les produits naturels et les molécules synthétiques. Les produits naturels ont été la majeure source pour la découverte de nombreux médicaments nouveaux, et qui pourraient être développés en tant qu'agents antibactériens (**Newman et al., 2003**). Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, d'autres agents antimicrobiens plus efficaces ont été découverts et mis au point par l'élucidation des cibles médicamenteuses et par une modification des molécules médicamenteuses (**Kohanski et al., 2010**).

1-2- Les principales substances antimicrobiennes :

1-2-1- Les antibiotiques :

Les antibiotiques, au sens strict, sont des substances antibactériennes d'origine biologique, c'est à dire élaborés par des microorganismes (des champignons ou des bactéries), mais on inclut généralement parmi elles les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques qui sont capables d'inhiber la multiplication ou détruire les microorganismes (**Yala et al., 2001**).

Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (**Yala et al., 2001**). Les antibiotiques naturels sont connus pour atteindre la plupart des grandes voies biologiques, mais la majorité d'entre eux transmettent leur effet antibactérien par inhibition de la paroi cellulaire bactérienne et la synthèse des protéines. La seule exception comprend la classe des rifamycines qui inhibent la synthèse de l'ARN (**Singh, 2012**).

Les antibiotiques ont montré des inconvénients et des limites d'utilisation : effets secondaires, toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité et difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (**Siegenthaler et Luthy, 1978**).

1-2-2- Les plantes comme antibiotiques :

La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes (bactéries, champignons et virus) (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008**). L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (**Gibbons, 2008**). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives.

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ils possèdent une haute activité contre les bactéries à Gram positif, mais demeurent peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les levures (**Lewis, 2001**).

1-3- Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles et polyphénols :

1-3-1- Huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al., 2006**). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux (**Zhiri, 2006**). Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre, sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol) qui, du fait de la présence des substituants phényle et hydroxyle, sont les plus actifs, s'en suit les aldéhydes, les cétones, les alcools et les terpènes (**Dorman et Deans, 2000**).

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. 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 molécules hydrocarbonées (**Guinoiseau, 2010**).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt, 2004**). Cependant, les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique :

- Les terpènes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema et al., 1994**). Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite des ions intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de l'ATP, et du phosphate inorganique. Ceci va limiter la croissance bactérienne, mais si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraînera la mort cellulaire (**Tsuchiya et al., 1996 ; Hammer et al., 1999 ; Carson et al., 2002**).

- Notamment, les huiles essentielles sont capables d'inhiber la production de toxines : soit à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice qui empêche l'exportation active des toxines hors de la cellule, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (Ultee et Smid, 2001).
- Pour les levures, les huiles essentielles agissent sur la biomasse et la production des pseudo-mycéliums, alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

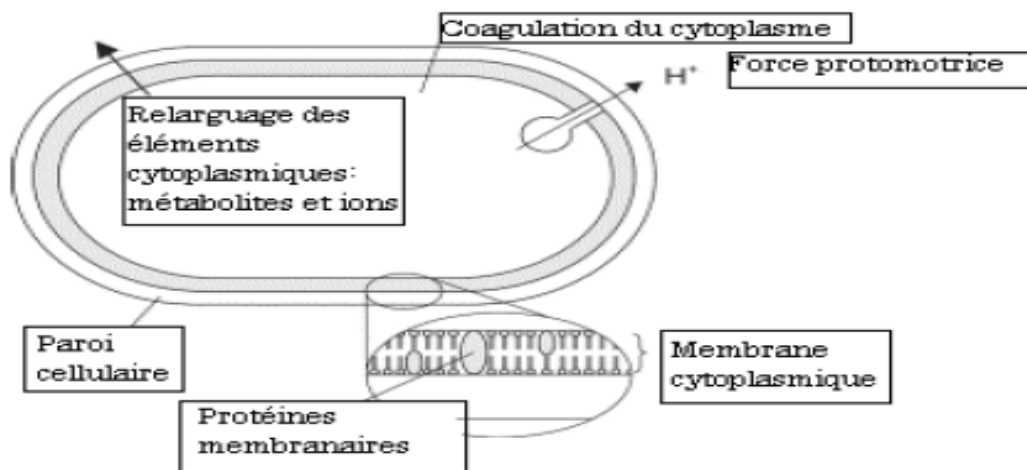


Figure 07 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

1-3-2- Polyphénols :

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes (Scalbert, 1991 ; Cowan, 1999). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique due à l'intercalation des polyphénols dans les phospholipides membranaires (Daglia, 2012).
- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard et al., 1995 ; Zhang et al., 2009).
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi et al., 1998, Daglia, 2012).
- Séquestration des substrats requis pour la croissance microbienne (Milane, 2004 ; Daglia, 2012).

2- Activité antioxydante :

2-1- Les radicaux libres :

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

2-1-1- Les différents types des radicaux libres :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer deux grandes classes de radicaux libres: les radicaux libres primaires, directement formés à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires (**Binov, 2001**), comme est représenté dans la figure suivant :

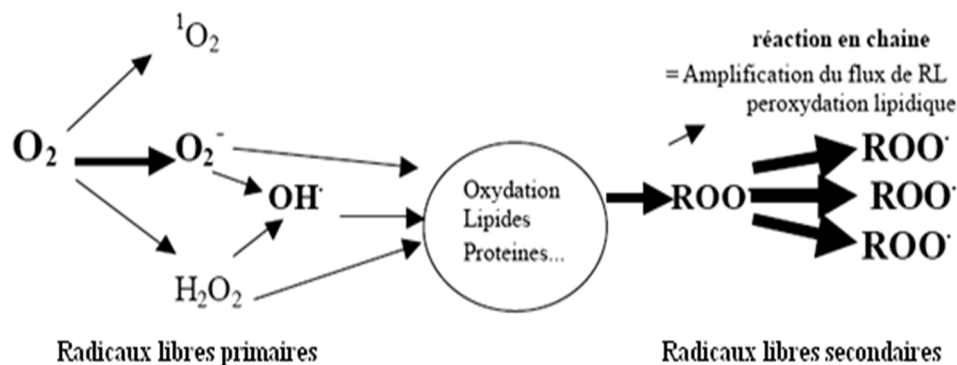


Figure 08 : Les formes actives de l'oxygène dans la cellule (**Binov, 2001**)

2-1-1-1- Les radicaux libres primaires :

Les radicaux libres primaires sont les plus dangereux car ils sont directement formés à partir de l' O_2 (**Reichl et al., 2004**). L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), radical hydroxyl (OH^\bullet), monoxyde d'azote (NO^\bullet) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet ($^1/2 O_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (**Favier, 2003**).

2-1-1-2- Les radicaux libres secondaires :

Ils ne sont pas formés spontanément, ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines). Ce sont les radicaux alkoxy (RO°)⁻ et peroxy (ROO°)⁻ qui se forment lors du métabolisme d'un certain nombre de substances étrangères (xénobiotiques). Ainsi, des composés tels que le 1,2-dibromométhane (additif présent dans l'essence), ou le paracétamol peuvent être métabolisés en radicaux libres, et être ainsi la cause de lésions dans l'organisme (**Reichl et al., 2004**).

Au niveau de la cellule, il est très important de contrôler la production de radicaux libres primaires essentiellement O_2° ⁻ et H_2O_2 . En effet, cela entraîne une production moins importante de radicaux libres secondaires et donc par conséquent une protection des constituants cellulaires et un maintien de l'activité biologique de la cellule (**Binov, 2001**).

2-2- Stress oxydant :

A l'état quiescent, il existe un équilibre entre la production des ERO et la capacité antioxydante intracellulaire (**Michel et al., 2008**), dans ces conditions, les cellules présentent un état redox physiologique optimal (**Garnier et al., 2005**). On dit alors que la balance Oxydants / Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (endogène d'origine inflammatoire, ou exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants tel que tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports en micronutriments antioxydants, inactivation enzymatique) ou une combinaison de ces deux facteurs, un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Sohal et al., 2002 ; Ece et al., 2007**).

Ce déséquilibre va se traduire par de nombreuses oxydations au niveau des macromolécules biologiques telles que les acides gras polyinsaturés AGPI (fixation d'un radical sur une double liaison), les protéines (modification de leur structure) et de l'ADN (rupture des chaînes bicaténaires) (**Gauche et Hausswirth, 2006**). Ce qui va permettre d'évaluer le stress oxydant par la détermination de ces produits d'oxydation.

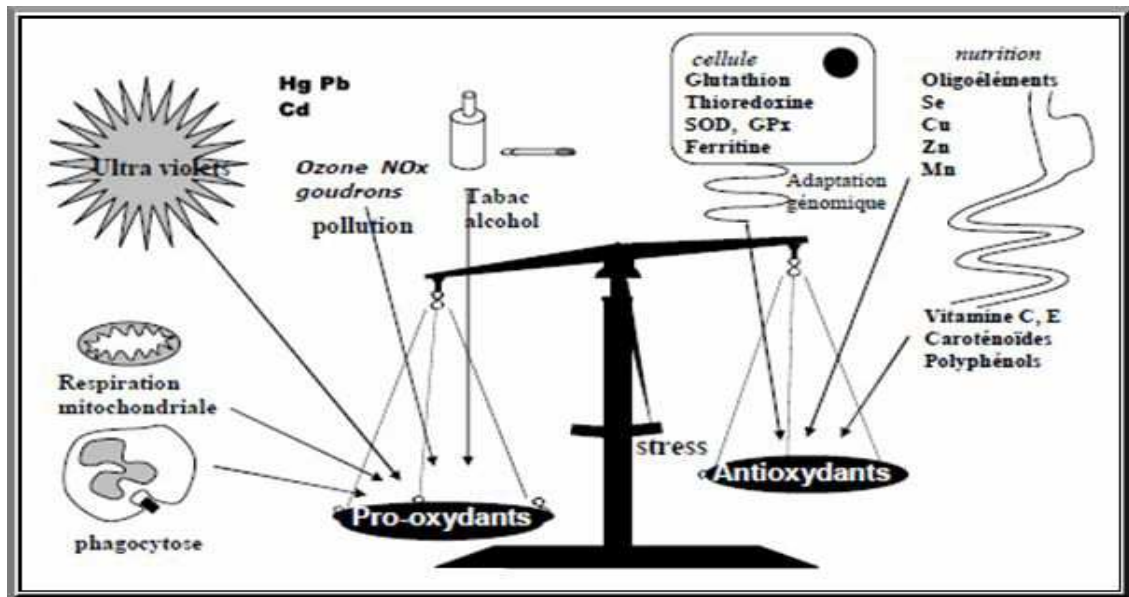


Figure 09 : Le déséquilibre entre la production des espèces réactives et la capacité antioxydante dans l'organisme (Favier, 2006)

2-3- Pathologies dues au stress oxydant :

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée.

- Les ERO semblent jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer.
- Les ERO produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes-macrophages sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines légères (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome.
- De même dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important, en particulier dans la survenue des complications diabétiques.
- Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres (Gardès-Albert et al., 2003 ; Favier, 2003).

2-4- Les substances antioxydantes :

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules non enzymatiques. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires dans le but d'atténuer ou d'empêcher les effets nocifs des ERO et des radicaux libres (Reichl et al., 2004 ; Cano et al., 2007).

Notre organisme réagit donc de façon constante à la production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

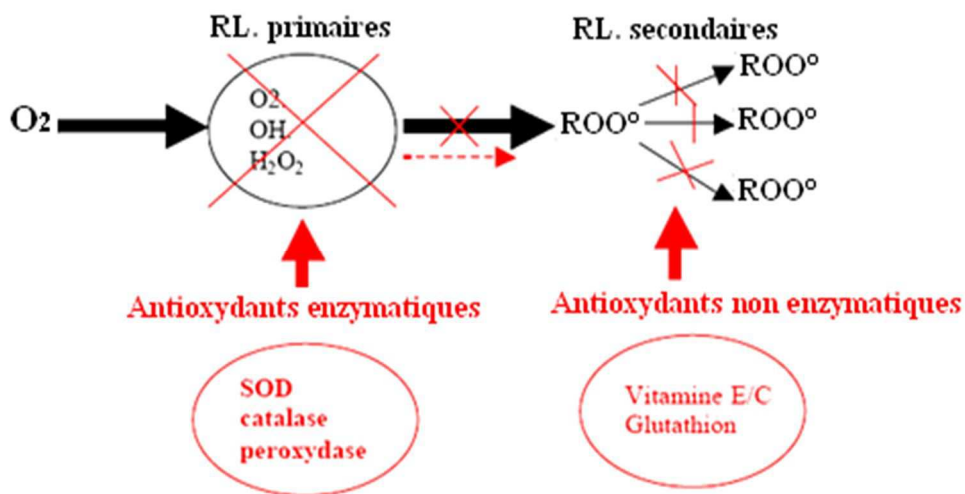


Figure 10 : Les systèmes de défense naturels contre les radicaux libres (Binov, 2001)

2-4-1- Les antioxydants naturels :

2-4-1-1- Les antioxydants enzymatiques :

La cellule est pourvue de systèmes de défense très efficaces. Plusieurs enzymes peuvent catalyser des réactions de détoxification des différents pro-oxydants. Les antioxydants enzymatiques sont capables d'éliminer les radicaux libres primaires de façon permanente et efficace, en transformant l'anion OH° et le H_2O_2 en produits non toxiques : l'eau et l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**). Les antioxydants enzymatiques sont principalement trois enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase et les peroxydases.

En état de stress oxydant, la production des radicaux libres primaires augmente très fortement, de ce fait, les systèmes enzymatiques primaires qui ont une vitesse maximum d'élimination des radicaux libres primaires, sont débordés. Ces radicaux libres primaires non éliminés vont alors oxyder les constituants cellulaires. Ce qui engendre la formation de radicaux libres secondaires (ROO°) qui sont capables de réaction d'oxydation en chaîne conduisant à la destruction des cellules. Ces phénomènes d'oxydation en chaîne, peuvent être ralentis par des antioxydants secondaires non enzymatiques qui sont apportés par l'alimentation (**Binov, 2001**).

2-4-1-2- Les antioxydants non enzymatiques :

Divers piègeurs de radicaux libres non enzymatiques peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres. Ces composés sont facilement oxydables, relativement stables et conduisent à des dismutations permettant l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne. Ce système de protection peut être à la fois membranaire (vitamine E, A) ou cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C).

Certains éléments minéraux exercent indirectement un rôle antioxydant en agissant comme des cofacteurs. Ainsi le cuivre, le zinc et le fer sont des cofacteurs pour la superoxyde dismutase, le fer est également un cofacteur pour la catalase et le sélénium est le cofacteur du glutathion- peroxydase (**Delattre et al., 2003**).

Aussi, parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme (**Gee et Johnson, 2001**).

Les polyphénols, suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales, est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (**Rock, 2003 ; Bubonja-Sonje et al., 2011**).

2-4-2- Les antioxydants synthétiques :

Les antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al, 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**).

2-5- Mécanisme d'action antioxydante des huiles essentielles et polyphénols :

2-5-1- Huiles essentielles :

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols qui sont responsables de cette activité (**Zhiri et Baudoux, 2005**).

2-5-2- Polyphénols :

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres et à chélater les ions des métaux de transition est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres et aux positions des groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques (**Rice-Evans et al., 1996**).

Les polyphénols agissent contre la peroxydation lipidique de deux façons: par la protection des lipides contre les initiateurs de l'oxydation ou par arrêt de la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs entravent la formation des ERO ou éliminent les espèces réactives responsables de l'initiation de l'oxydation comme $O_2^{\cdot-}$, $\frac{1}{2} O_2$ et OH° . Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne perdent généralement un atome d'hydrogène en faveur des radicaux propageurs de l'oxydation (LOO°) pour stopper la propagation de la peroxydation (**Laguerre et al., 2007 ; Leopoldini et al., 2011**).

En ce qui concerne le pouvoir antioxydant des flavonoïdes vis-à-vis des radicaux libres, il est dû à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (**Sandhar et al., 2011**). Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques (**Le et al., 2007**). Les flavonoïdes exercent aussi des effets antioxydants par la chélation des ions métalliques (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires (**Van Acker et al., 1996 ; Verdán et al., 2011**).

Plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des polyphénols (**Rice-Evans et al., 1996 ; Van Acker et al., 1996 ; Harborne et Williams, 2000 ; Amič et al., 2003 ; Woodman et al., 2005**). Ces travaux permettent de connaître les activités anti-oxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales. En fait, leur activité antiradicalaire nécessiterait:

- La présence d'une double liaison entre les carbones C2 et C3 et d'un groupement carbonyle en C4 pour une activité antioxydante plus marquée, ainsi l'activité de la quercétine (flavonol) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (flavan-3-ol).

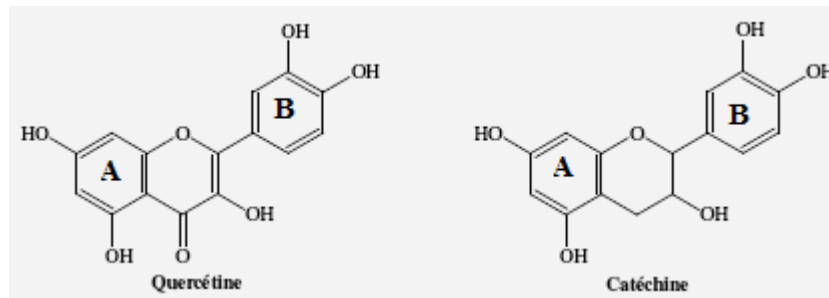


Figure 11 : Comparaison entre la structure de la quercétine et de de la catéchine (**Harborne et Williams 2000**)

- La présence d'une structure ortho-diphénolique du cycle B (les groupements hydroxyles en position C3'- C4').

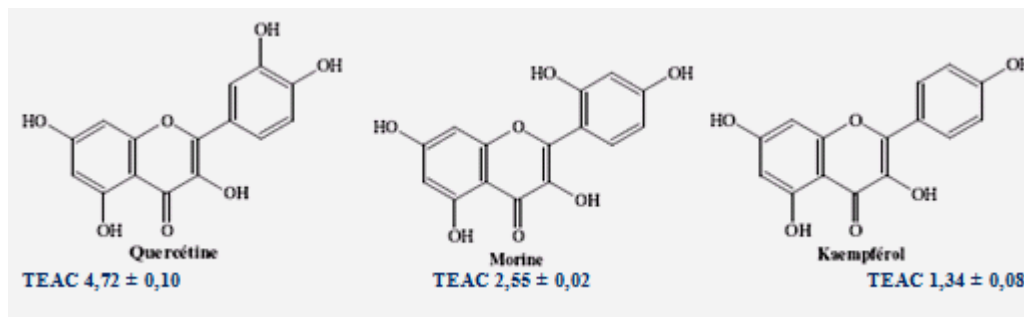


Figure 12 : Valeurs de « Trolox equivalent antioxidant capacity » (TEAC) montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante (**Rice-Evans, 1996**)

- Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. **Rice-Evans et al. (1996)** ont démontré l'importance de ce dernier. En effet, La glycosylation du groupe C3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité anti-oxydante.

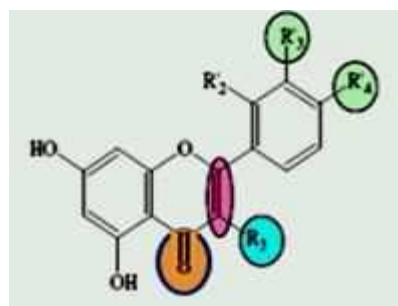
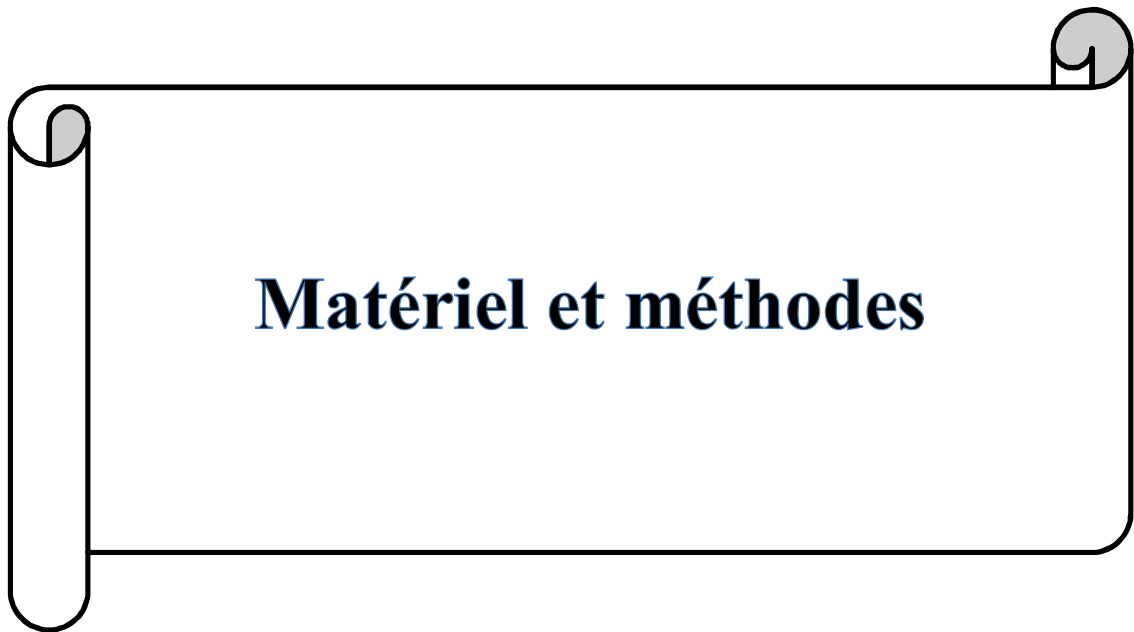


Figure 13 : Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (**Rice-Evans et al., 1996**)

PARTIE
EXPERIMENTALE



Matériel et méthodes

1- Matériel végétal :

1-1- Critères de choix des plantes :

Pour la valorisation de la médecine traditionnelle et vu l'importance de la biodiversité de notre région, on a étudié deux espèces végétales : *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* appartenant toutes les deux à la famille des Lamiacées. Le choix de nos deux plantes s'est basé sur une étude bibliographique et une enquête ethnopharmacologique auprès de la population locale ayant une connaissance de leurs usages en médecine traditionnelle. Ainsi, les critères de sélection des plantes médicinales objets de notre étude sont les suivant :

- Abondance de ces plantes dans notre région.
- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies d'origine microbienne.
- La non toxicité des plantes, vu qu'elles sont utilisées dans les préparations culinaires et dans les tisanes.
- Leurs richesses en substances aromatique (huiles essentielles) et polyphénols.
- Le manque de travaux sur la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles et polyphénols isolés des plantes de cette région.

1-2- Récolte, situation géographique, identification et conservation :

Les parties aériennes (feuilles et fleurs) d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* au stade de floraison, où il y'a accumulation importante des substances bioactives, ont été récoltées tôt le matin (9h) au mois de Juin de l'année 2012, dans la région de Nechmeya dans les montagnes de Houara.

Nechmeya est située dans la Wilaya de Guelma au Nord Est algérien, à une Latitude: 36°36'41" Nord, Longitude: 7°30'48" Est et une altitude par rapport au niveau de la mer égale à 380 m. Cette région est caractérisée par un climat méditerranéen avec un été chaud et sec et un hiver froid et humide.

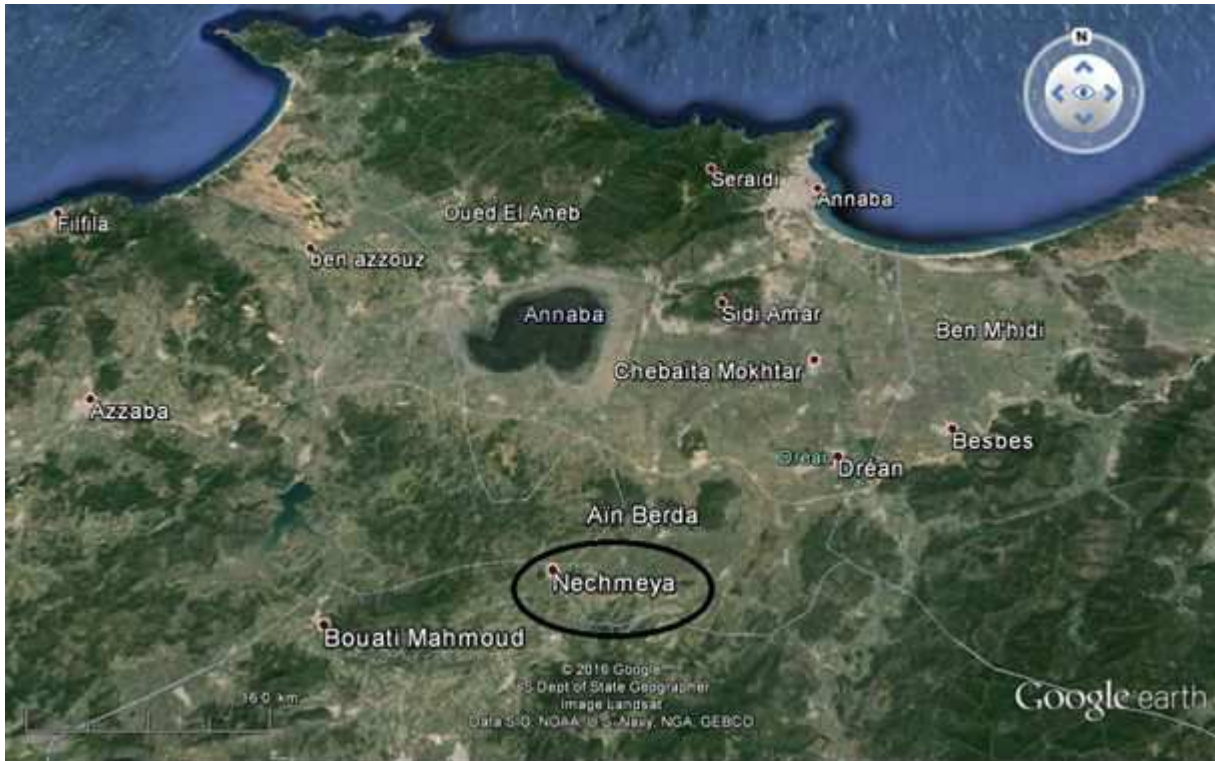


Figure 14 : Situation géographique de la région de Nechmeya (**Google Earth**)

L'identification botanique a été faite sur un spécimen d'herbier par l'équipe de recherche de botanique de l'université d'Annaba : Dr. Zaafour et Dr. Hamel.

Le matériel végétal recueilli est séché à température ambiante et à l'ombre pendant quinze jours, afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules. Les parties aériennes des plantes ainsi obtenues sont conservées dans des flacons en verre ambrés en vue des expérimentations (screening phytochimique et extraction des principes actifs).



Figure 15 : Zone de récolte d'*Origanum glandulosum* (Cliché de Bouhaddouda N., 2012)



Figure 16 : Zone de récolte de *Mentha pulegium* (Cliché de Bouhaddouda N., 2012)



Figure 17 : *Origanum glandulosum* (A) et *Mentha pulegium* (B) (Cliché de Bouhaddouda N., 2012)

2- Screening phytochimique :

Les parties aériennes des plantes sont soumises à des tests pour détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels qui peuvent se trouver dans l'échantillon. La détection de ces familles constitue le screening ou criblage phytochimique. Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation ou de complexation avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée est provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié. Elle est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une insaturation dans une molécule.

La mise en évidence des différents métabolites secondaires : tanins, anthocyanes, leuco anthocyanes, saponosides, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes et stérols est réalisée selon des méthodes standardisées (**Harborne, 1989 ; Solfo, 1973**).

2-1- Recherche des tanins :

- On prend 5 ml de l'infusé à 10%, auquel on ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques et bleu noirâtre des tanins galliques.

- Test de confirmation : à 30 ml de l'infusé, on ajoute 15 ml de réactif de Stiasny (Formol à 30% / HCl concentré 3/1 v/v). Après chauffage de 30 mn au bain marie, l'observation d'un précipité orange indique la présence des tanins catéchiques.

2-2- Recherche des anthocyanes :

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10% avec le changement de pH. On ajoute quelques gouttes d'HCl pur, puis quelques gouttes d'ammoniaque (NH_4OH à 25%). Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

2-3- Recherche des leuco anthocyanes :

Un volume de 5 ml de l'infusé est mélangé à 4 ml d'alcool chlorhydrique (Ethanol/ HCl pur 3/1 v/v). Après chauffage au bain marie à 50 °C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco anthocyanes.

2-4- Recherche des saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse : 2 g de matériel végétal sec et broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 mn. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. Dans une série de 10 tubes à essai, on met 1 ml de l'extrait dans le tube n° 1, 2 ml dans le tube n° 2, ..., 10 ml dans le tube n° 10. Le volume final dans chaque tube étant de nouveau réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont agités fortement en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le X^e tube, alors l'indice de mousse (I) est calculé selon la formule suivante :

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (en cm) dans le } x^{\text{e}} \text{ tube} \times 5}{0.0x}$$

La présence des saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.

2-5- Recherche des flavonoïdes :

La recherche des flavonoïdes débute par une macération de 10 g de l'échantillon pulvérisé dans 150 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1%) pendant 24h. Après filtration, on récupère 10 ml du filtrat auquel on ajoute une solution basique de (NH₄OH). L'apparition, après 3h, d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube, indique la présence de flavonoïdes.

2-6- Recherche des alcaloïdes :

Après macération de 5 g de feuilles séchées et broyées dans 50 ml d'HCl à 1%, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif de Dragendorff qui provoque un précipité orangé indiquant la présence des alcaloïdes.

2-7- Recherche des terpènes et des stérols :

5 g de poudre sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée dans un bain de sable à une température de 90 °C. Le résidu est dissout dans 5 ml d'anhydride acétique en ajoutant 1 ml d'acide Sulfurique (H₂SO₄) concentré. S'il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant vert par la suite, à l'interface des deux phases, ceci indique la présence des terpènes et stérols.

3- Extraction des huiles essentielles :

3-1- Principe :

Les huiles essentielles des deux plantes (*O. glandulosum* et *M. pulegium*) sont extraites par le procédé d'hydrodistillation, grâce à un appareil du type Clevenger qui est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale séchée et l'eau distillée et une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant).

Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. La vapeur saturée en huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner deux produits: l'eau florale et l'huile essentielle.

3-2- Mode opératoire :

100 g des parties aériennes séchées de la plante sont émiettées puis introduites dans un ballon monocol de 1 L, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements lors de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide du chauffe ballon pendant 2 h. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans un collecteur. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée par décantation puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium (Na_2SO_4), pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. Elle est alors conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4 à 5°C).

3-3- Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée (AFNOR, 1986). Le rendement (R) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R = \frac{P_h}{P_p} \times 100$$

Où, P_h : poids de l'huile essentielle en g ;

P_p : poids de la plante en g.

3-4- Cinétique d'extraction :

Selon **Bachelot et al. (2006)**, la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction.

Dans notre étude, le rendement est déterminé par prélèvement de l'huile essentielle à des intervalle de temps de 15 minutes qui s'étalent de 0 à 120 minutes en tenant compte que le début de l'extraction commence dès la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau.

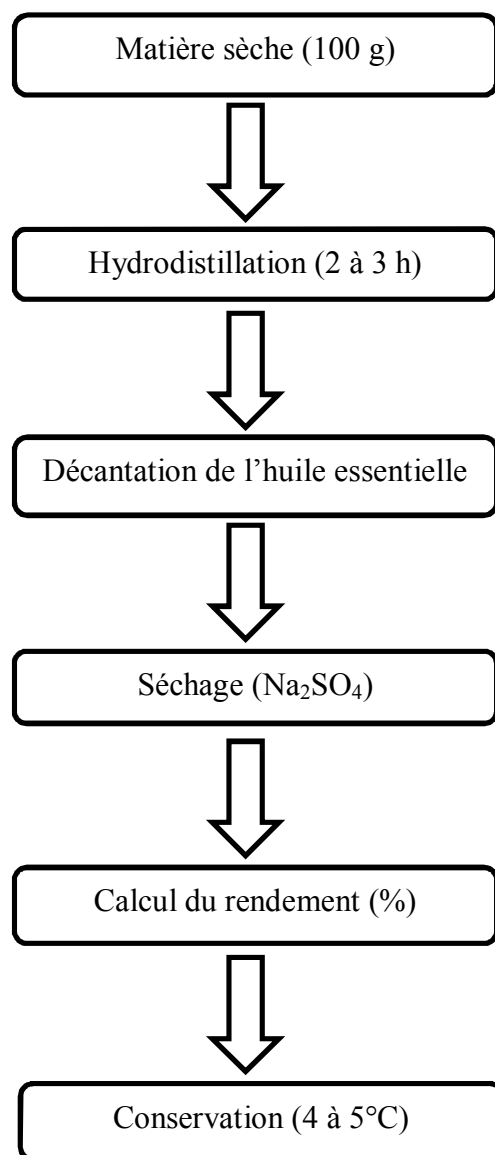


Figure 18 : Protocole expérimental d'extraction des huiles essentielles

4- Analyses des huiles essentielles :

4-1- Analyse Physique :

Les méthodes conformes aux normes **AFNOR (1986)** ont permis de déterminer la densité spécifique à 20 °C (NFT 75-111) et l'indice de réfraction (NFT 75-112) des huiles essentielles.

4-1-1 Détermination de la densité :

La mesure de la densité spécifique à 20 °C est réalisée à l'aide d'un micro-pycnomètre et d'une balance de précision.

4-1-2- Détermination de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction est déterminé à l'aide d'un réfractomètre ABBE.

4-2- Identification chimique des huiles essentielles :

La composition chimique des huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID) et couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM). Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire LEXVA Analytique, Clermont-Ferrand, France.

4-2-1- Principe :

La CPG s'est montrée être la méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile essentielle, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative. Elle est basée sur le principe de la chromatographie de partage (**Skoog et al., 2003**). La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (H₂, N₂, He). La solution est injectée au moyen d'une seringue soit manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité. La séparation des composés dépend du type de colonne utilisée et de la polarité de la phase stationnaire.

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres.

Après avoir choisi le type de colonne appropriée et un programme de température adéquat, la détection des composés élués est obtenue par un détecteur FID (flamme ionisation detector : détecteur à ionisation de flamme). On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé. Dans le cas des huiles essentielles, le FID est le détecteur le plus cité dans la littérature (**Figueredo, 2007**).

La possibilité de coupler les chromatographes à divers spectromètres augmente considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues. Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence. Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes :

- Ionisation : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200 °C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- Accélération et séparation : les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation où ils seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;
- Détection : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- Traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil est conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG (**Pradeau et Cohen, 1992**).

4-2-2- Conditions opératoires :

4-2-2-1- Analyse par CPG/FID :

- L'analyse CPG/FID est effectuée sur un Chromatographe Hewlett-Packard HP 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Colonne Agilent Technologies : DB5 MS : 30 m x 0.25 mm, épaisseur de film 0.25 µm.
- Gaz vecteur : Hydrogène (H₂), débit : 1 ml/min.
- Température de l'injecteur : 280 °C.
- Température du détecteur : 300 °C.
- Programmation du four : 50 °C pendant 5 min, 5 °C/min de 50 à 300 °C, 5 min à 300 °C.
- Injecteur mode split, avec un rapport de division de 1/60.
- Volume d'injection: 1 µl de l'huile essentielle dilué dans l'hexane (1/30).

Le pourcentage de composition de l'huile essentielle est calculé par intégration électronique des aires des pics FID. Pour chacun des composants, les indices de rétention sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

4-2-2-2- Analyse par CPG/SM :

- L'analyse des constituants volatils est exécutée sur un Chromatographe Hewlett-Packard HP 7890 couplé à un détecteur sélectif de masse quadripolaire HP 5975.
- Colonne Agilent Technologies : DB5 MS : 20 m x 0.18 mm, épaisseur de film 0.18 µm.
- Gaz vecteur : Hélium, débit : 1 ml/min.
- Température de l'injecteur : 280 °C.
- Température du détecteur : 300 °C.
- Programmation du four : 50 °C pendant 3.2 min, 8 °C/min de 50 à 300 °C, 5 min à 300 °C.
- Injecteur mode split, avec un rapport de division de 1/250.
- Volume d'injection: 1 µl de l'huile essentielle diluée dans l'hexane (1/30).

- Spectromètre de masse : en mode d'impact électronique (EI) à 70 eV.
- Température de la source d'ion : 230 °C.

L'identification des composants est basée sur la comparaison des temps de rétention de chaque composant, leurs spectres de masse et leurs KI (indice de Kovats) avec ceux de substances pures enregistrées dans la littérature, notamment dans les bases de données Wiley 275 et NIST (National Institute of Standards and Technology) et ceux décrits par **Adams (2001)**. Également, la base de données élaborée par le laboratoire à partir de substances pures et composants d'huiles essentielles connues a été utilisée.

5- Préparation des extraits méthanoliques :

5-1- Principe :

Dans notre étude, pour l'analyse des composés polyphénoliques, l'extraction solide-liquide a été utilisée via la méthode d'extraction par soxhlet. Les polyphénols, étant des molécules plutôt hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte (**Bruneton, 2006**). Ainsi, le solvant retenu pour notre étude est le méthanol.

L'appareil Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

L'obtention de l'extrait est réalisée à l'aide de l'appareil appelé Rotavapor. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. Ce principe permet d'éliminer par évaporation le solvant en un temps très court, environ une demi-heure et avec récupération totale du solvant.

5-2- Mode opératoire :

20 g d'échantillon séché et finement broyé est extrait avec 250 ml méthanol (99.7%) en utilisant l'appareil de Soxhlet pendant environ 6 heures de chauffage à 60 °C. Les extraits méthanoliques sont filtrés en utilisant du papier filtre (Whatman n°1) et ensuite concentrés sous vide à 40 °C en utilisant un évaporateur rotatif. Les substances obtenues sous forme visqueuse sont stockées dans des bocaux étanches à +4 °C jusqu'à utilisation ultérieure (Sokmen et al., 1999).

5-3- Calcul du rendement :

Le rendement en extrait méthanolique (R) est le rapport entre la masse de l'extrait et la masse de la matière végétale utilisée. Il est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{P_e}{P_p} \times 100$$

Où, P_e : poids de l'extrait méthanolique en g ;

P_p : poids de la plante en g.

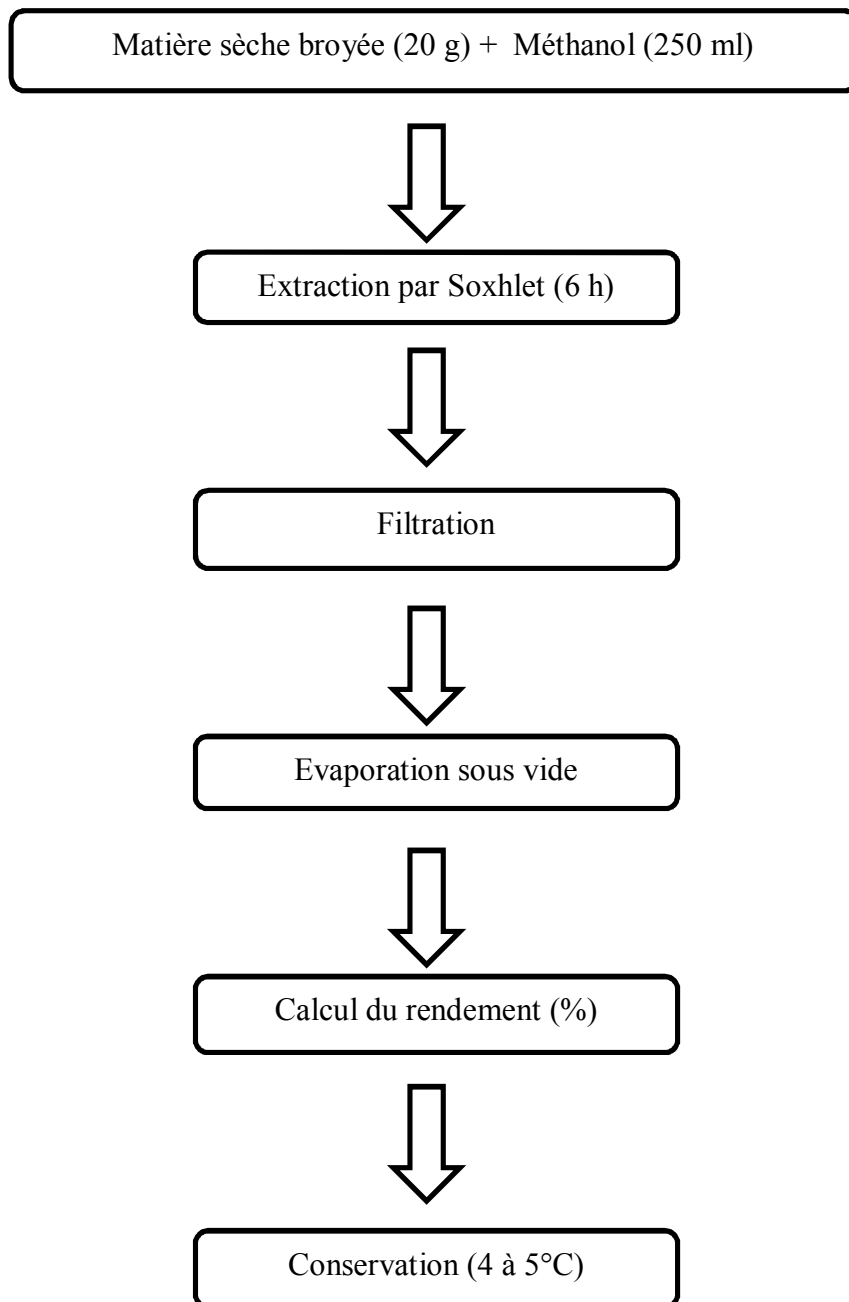


Figure 19 : Protocole expérimental de préparation des extraits méthanoliques.

6- Analyses des extraits méthanoliques :

6-1- Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative) :

6-1-1- Principe :

Le taux de polyphénols des extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* est déterminé par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Slinkard et Singleton, 1977**), ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm, est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés et présents dans les extraits végétaux (**Boizot et charpentier, 2006**).

6-1-2- Mode opératoire :

Dans une fiole jaugée, on introduit 0.1 ml de solution d'extrait, contenant 1000 µg d'extrait sec. 46 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement. Après 3 minutes, on ajoute 3 ml d'une solution de Na₂CO₃ à 2%. Le mélange est laissé au repos pendant 2 heures avec agitation intermittente. L'absorbance est mesurée à 760 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique avec des concentrations allant de 0 à 1000 µg / 0.1 ml.

6-1-3- Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg) en utilisant l'équation de régression. Cette équation est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tous les essais sont effectués en triplicata.

6-2- Caractérisation des polyphénols par HPLC/UV (analyse qualitative) :

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques. La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est sans doute la technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique, elle offre la possibilité d'une caractérisation rapide et précise de tous les composés phénoliques présents dans un mélange (**Bruneton, 1999 ; Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Proestos et al., 2006**).

La composition chimique des extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* est déterminée par HPLC/UV. Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire Lara-Spiral, Couternon, France.

6-2-1- Principe :

Cette méthode de séparation fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique sur colonne réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés les uns des autres en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. Elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur relié au système où le message est enregistré puis exploité (**Braithwaite et Smith, 1999 ; Macheix et al., 2005**).

Les phases mobiles utilisées sont des mélanges d'eau et d'un solvant organique miscible (acétonitrile, méthanol) ou des combinaisons de solvants organiques (alcools, hexane, dichlorométhane...) miscibles entre eux. Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » en opposition au mode « isocratique » pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR, SM).

6-2-2- Mode opératoire :

- Les analyses par HPLC sont effectuées à l'aide d'un appareil de type Perkin Elmer série 200 muni d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un four à effet pelletier et d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD).

- Colonne Merck Lichrospher 100 RP-18 : 150 x 4.6 mm, épaisseur 5 µm.

- Température de colonne : 27 °C.

- Elution par gradient de solvants :

Solvant A : eau acidifiée à pH 2,2 par l'acide trifluoroacétique (TFA).

Solvant B : acétonitrile.

Gradient : 0 min : 100% A

5 min : 100% A

50 min : 45% A, 55% B

- Injection : 20 µl.

- Débit : 1 ml / min.

- Détection : 280 et 345 nm

L'échantillon à analyser est préparé par solubilisation dans le méthanol à 70% en présence de DMSO d'une quantité de l'extrait sec afin d'obtenir une concentration équivalente à 2 g/L de polyphénols totaux exprimés en équivalents acide gallique. L'extrait est ensuite filtré sur filtre nylon 0.45 µm.

6-2-3- Expression des résultats :

Les différents composés à analyser sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et leurs spectres UV- visible avec ceux des étalons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réponse chromatographique.

7- Etudes des activités biologiques :

7-1- Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* est étudiée qualitativement par dépistage sur CCM à l'aide du DPPH et quantitativement par le piégeage du radical DPPH.

7-1-1- Dépistage de l'activité antioxydante sur CCM à l'aide du DPPH :

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante des composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM) (Peiwu et al., 1999 ; Tepe et al., 2005).

Le test chimique que nous avons utilisé pour déceler la présence de composés antioxydants dans les huiles essentielles et les extraits méthanoliques des plantes étudiées repose sur le principe de la réduction des radicaux libres fournis par le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) suivant la méthode de Tepe et al. (2005).

Pour réaliser ce test, on dépose 5 µl d'une solution de 1 mg/ml d'huile essentielle ou extrait dans le méthanol sur la plaque de gel de silice possédant un support en aluminium.

Le développement des plaques se fait dans le système de solvants méthanol - acétate d'éthyle (1:1). Après migration, les chromatogrammes sont séchés à l'aide d'un séchoir électrique puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH à la concentration de 0.02 mg/ml dans le méthanol. Ils sont alors maintenus à température ambiante pendant 30 minutes. L'apparition de taches jaunes formées à partir du blanchiment de la couleur pourpre du réactif de DPPH est évaluée comme activité antioxydante positive.

7-1-2- Test de piégeage du radical libre DPPH :

7-1-2-1- Principe :

Le composé chimique 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Takao et al., 1994 ; Brand-Williams et al., 1995). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de composés phénoliques. Le radical synthétique DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie à l'antioxydant. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (Molyneux, 2004).

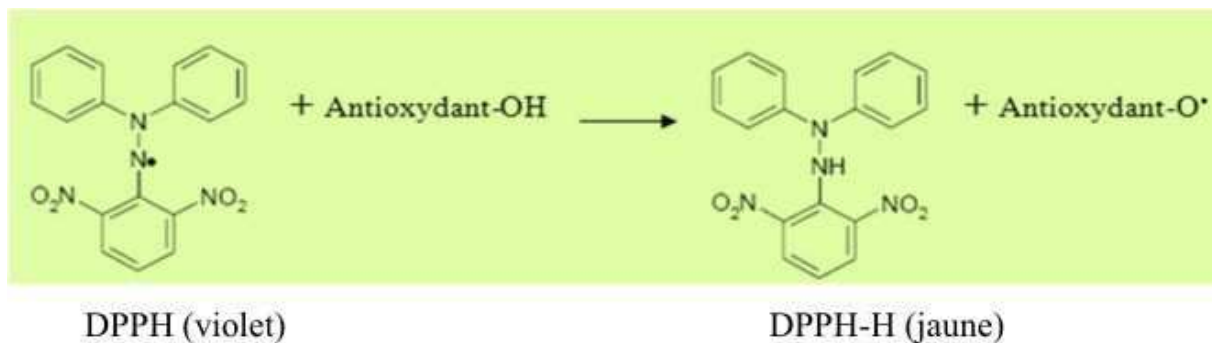


Figure 20 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Attou, 2004)

La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue, généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC₅₀). Le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent Trolox ou vitamine C. Cette méthode est beaucoup utilisée pour étudier des extraits végétaux et alimentaires pour mesurer la capacité antioxydante totale.

7-1-2-2- Mode opératoire :

La capacité des huiles essentielles et des extraits des deux plantes à piéger le radical libre DPPH est évaluée en utilisant la méthode décrite par **Takao et al. (1994)**, suivi du calcul de l'IC₅₀ et de l'indice de l'activité antioxydante (AAI) (**Scherer et Godoy, 2009**).

On prépare les solutions mères des huiles essentielles et des extraits dans le méthanol à une concentration de 2000 µg/ml. Une série de dilutions en progression géométrique à raison de 2 est réalisée pour obtenir des concentrations allant de 1000 µg/ml à 7.81 µg/ml. 2 ml de chaque solution sont mélangés avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH (80 µg/ml). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances sont mesurées à 517 nm.

Les échantillons de contrôle sont composés de 2 ml de méthanol additionné de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif. L'expérience est réalisée en triplicata.

7-1-2-3- Expression des résultats :

- L'activité antioxydante est exprimée comme le pourcentage d'inhibition calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité Antioxydante (\%)} = 100 \times [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}]$$

Où, A_{contrôle} représente l'absorbance de l'échantillon contrôle et A_{échantillon} représente l'absorbance de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique.

- La concentration inhibitrice (IC₅₀) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Elle est calculée à partir du graphe de l'activité antioxydante (en %) en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH.

- L'indice de l'activité antioxydante (AAI) est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{AAI} = \text{concentration finale de DPPH (\mu\text{g/ml})} / \text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml}).$$

Les résultats d'AAI sont exprimés comme suit: AAI < 0.5 → faible activité antioxydante; 1 > AAI > 0.5 → activité antioxydante modérée; 2 > AAI > 1 → forte activité antioxydante; AAI > 2 → très forte activité antioxydante.

7-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne :

7-2-1- Activité antibactérienne :

7-2-1-1- Matériels :

- **Souches bactériennes :**

Les tests sont effectués sur un total de 15 souches bactériennes responsables d'infections urinaires et intoxications alimentaires, dont 5 souches de référence issues de l'institut Pasteur d'Alger, 9 souches aimablement fournies par le laboratoire d'analyse médicale Ait Kaci de Annaba, et 1 souche fournie par le laboratoire de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes de la Wilaya d'Annaba (Tableau 02).

Tableau 02 : Répartition des souches testées

Bactérie	Souche	Famille	Origine
Gram -	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Moraxellaceae	Plaie
	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	Urines
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Enterobacteriaceae	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Enterobacteriaceae	Viande hachée
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	Urines
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Enterobacteriaceae	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	Enterobacteriaceae	Pus, plaie
	<i>Proteus vulgaris</i>	Enterobacteriaceae	Pus, plaie
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Urines
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Pseudomonadaceae	-
	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Enterobacteriaceae	Selles
	<i>Serratia marcescens</i>	Enterobacteriaceae	Urines
Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Enterococcaceae	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Urines
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Staphylococcaceae	-

- **Milieux de culture :**

- Gélose nutritive (GN) : milieu d'isolement et de conservation non sélectif.

- Gélose Mueller Hinton (MH) : milieu pour l'étude de la sensibilité des bactéries, en milieu solide, vis-à-vis de l'antibiotique, des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.

- Bouillon Mueller Hinton (MHB) : milieu pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

- **Conservation des souches :**

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur GN. Incubées pendant 24 h à 37 °C, elles sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant de la gélose nutritive incliné.

- **Antibiotiques :**

L'antibiotique utilisé dans notre étude est la Gentamicine (GEN) à une charge de 10 µg/disque. Notre choix s'est porté sur GEN vu qu'il possède un large spectre d'action, à la fois actif sur les Gram+ et sur les Gram-, permettant ainsi de déterminer la sensibilité de toute la gamme de bactéries étudiées vis-à-vis de cet antibiotique. Ce dernier est sélectionné selon la recommandation du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CASFM, 2012).

Tableau 03 : Caractéristiques de l'antibiotique testé (CASFM, 2012)

Antibiotique	Famille	Classe	Sigle du disque	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
					Sensible	résistante
Gentamicine	Aminoglycosides	Aminosides	GN	10 µg	≥16	<16

- **Les huiles essentielles :**

Les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont testées sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées, d'une part à l'état brut (pour la méthode des disques) et d'autre part à l'état dilué (pour la détermination de la CMI).

La solution mère est préparée par solubilisation de l'huile essentielle brute dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10%, pour atteindre une concentration initiale de 50 mg/ml.

- **Les extraits méthanoliques :**

Les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont testés sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées. Ils sont dissous dans le même solvant (méthanol) à une concentration finale de 30 mg/ml.

7-2-1-2- Préparation de l'inoculum :

Les souches bactériennes sont enrichies sur un tube contenant 9 ml de MHB, puis incubées à 37 °C pendant 18-24 heures. A l'aide d'une anse de platine on ensemence une goutte de la culture sur une boîte de Pétri contenant de la GN, elle sera par la suite incubé à 37 °C pendant 18-24 heures. A partir de ces cultures pures, la suspension bactérienne (l'inoculum) est préparée : à l'aide d'une anse de platine on racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques, on décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation de la densité optique à 0.5 Mc Farland est réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0.08 et 0.1 ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml selon Mc Farland.

7-2-1-3- Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques :

7-2-1-3-1- Principe :

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques (**Dayal et Purohit, 1971**). C'est une méthode d'évaluation qualitative *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.

Dans cette méthode, on utilise des disques de papier Whatman n°1 (6 mm), imprégnés de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, l'effet de l'agent antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone claire autour du disque en millimètres. En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, est généralisée aux huiles essentielles et autres extraits (**Tharib et al., 1983**).

Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats: la densité de l'inoculum, la température et le temps d'incubation, la concentration du produit à tester, la composition du milieu de culture ainsi que l'épaisseur de la gélose (**Guerin-Fauble et Carret, 1999**).

7-2-1-3-2- Mode opératoire :

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé est utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques selon la méthode décrite par **Gulluce et al. (2007)** avec de légères modifications.

- **Ensemencement :**

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH en surfusion est coulé aseptiquement à raison de 15 ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

- **Application des disques :**

- Des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n° 1) sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile puis imprégnés d'un volume de 5 µl d'huile essentielle ou d'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* ou de *M. pulegium*.

- Le disque d'antibiotique (Gentamicine) à 10 µg/disque est déposé à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. L'antibiotique est utilisé comme contrôle positif.

- Les disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n°1), imprégnés de 5 µl de méthanol sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Le méthanol est utilisé comme contrôle négatif.

- **Incubation :**

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm stérile pour éviter l'évaporation éventuelle des huiles essentielles. Elles sont maintenues à 4 °C pendant 2 heures, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

7-2-1-3-3- Expression des résultats :

Après la période d'incubation, la valeur des diamètres d'inhibition où les microorganismes testés n'ont pas poussés (zone d'inhibition clairement visible) est mesurée en millimètres et enregistrée en tant que moyenne \pm écart type. Tous les tests sont effectués en triplicata.

7-2-1-4- Détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution :

7-2-1-4-1- Principe :

Cette technique consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Elle a pour but de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. Elle est réalisable par contact direct en milieu gélosé ou liquide (**Allegrini et al., 1973**).

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les huiles essentielles qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème est résolu en partie par l'utilisation d'émulsions d'huiles essentielles dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 (**Allegrini et al., 1973 ; Benjilali, 1986**) ou de solvant comme l'éthanol et le DMSO (**Drugeon et al., 1990**).

Dans notre étude, on a utilisé la méthode de dilution en bouillon qui est une technique dans laquelle une suspension bactérienne est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution) (**El Kalamouni, 2010**).

7-2-1-4-2- Mode opératoire :

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont étudiées pour les souches bactériennes sensibles aux huiles essentielles et/ou extraits méthanoliques dans l'essai de diffusion sur disque. Les CMI des huiles essentielles d'*O. glandulosum* et *M. pulegium* contre les souches bactériennes testées sont déterminées par la méthode de microdilution (**Gulluce et al. 2007**) :

- A partir de la solution mère des huiles essentielles à 50 mg/ml (dans le DMSO à 10%), on prépare une gamme de concentration d'huiles essentielles par la méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2 dans des tubes contenant MHB, pour aboutir à des concentrations allant de 0,048 à 50 mg/ml.
- Les plaques de 96 puits sont préparées en distribuant dans chaque puits 95 µl de MHB et 5 µl de l'inoculum préalablement préparé.
- 100 µl de la solution mère des huiles essentielles initialement préparée d'une concentration égale à 50 mg/ml sont ajoutés dans les premiers puits.
- 100 µl de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs.
- Le dernier puit contenant 195 µl de MHB sans huile essentielle et 5 µl de l'inoculum est utilisé comme contrôle négatif.
- Le volume final dans chaque puits est de 200 µl.
- Les plaques sont couvertes avec du parafilm stérile et ensuite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.
- Pour le calcul des concentrations minimales bactéricides (CMB), on prélève un volume de 100 µl de chaque puit qui ne montre pas une croissance bactérienne et on l'ensemence sur un milieu de gélose nutritive qu'on incube à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Remarque : La concentration de DMSO utilisée pour les différentes dilutions a été testée préalablement sur les souches bactériennes et n'a présentée aucune activité antibactérienne, elle n'interfère donc pas dans l'interprétation des résultats. En plus le DMSO est largement conseillé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

7-2-1-4-3- Expression des résultats :

- La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un "culot" blanc sur le fond du puit. A titre d'indicatif de la croissance de microorganismes, 10 µl de nitrobleu tetrazolium (NBT) à une concentration de 2 mg/ml dans l'eau distillée stérile sont ajoutés aux puits et incubés à 37 °C pendant 30 min (**Sharma et al., 2012**). Le sel de NBT agit comme un accepteur d'électrons et la couleur jaune de l'NBT est réduite en un produit formazan bleu-violet par les organismes biologiquement actifs (bactéries viables).

- La CMI est indiquée par le puit qui contient la plus faible concentration d'huile essentielle où il y'a absence de croissance bactérienne et qui ne montre pas un changement de couleur.

- Les CMB sont interprétées comme la plus haute dilution (concentration la plus basse) de l'huile essentielle, qui a montré un liquide clair sans le développement de la turbidité et sans croissance bactérienne visible sur la boîte de Pétri.

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

Tous les tests sont effectués en duplicata.

7-2-2- Activité antifongique :

7-2-2-1- Matériels :

- **Souches fongiques :**

Deux souches fongiques sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium*.

Il s'agit de deux champignons filamenteux *Aspergillus* sp. et *Fusarium* sp. qui sont des phytopathogènes responsables de l'altération du blé. Ces souches ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie (Université Badji Mokhtar, Annaba).

- **Milieus de culture :**

Potato Dextrose Agar (PDA) : milieu pour la conservation et l'étude de la sensibilité des champignons vis-à-vis des antifongiques, des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.

- **Conservation des souches :**

Les souches fongiques sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant le milieu PDA incliné.

- **Antifongiques témoins :**

Dans notre étude on a utilisé deux antifongiques de commerce : Propineb utilisé par contact direct à une concentration de 1.59 mg/boîte de Pétri et Vapcotop dilué à une concentration de 2 mg/ml/boîte de Pétri. Ce sont deux antifongiques industriels utilisés en agroalimentaire.

- **Les huiles essentielles :**

Les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont testées contre les souches fongiques à l'état dilué dans le Tween 20 à 5%.

- **Les extraits méthanoliques :**

Les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont testés contre les souches fongiques à l'état dilué dans le méthanol.

7-2-2-2- Préparation de l'inoculum :

L'inoculum des souches fongiques est préparé par repiquage d'un disque mycélien, d'une culture pure, au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. La boîte sera incubée à 28 °C pendant 5 à 7 jours.

7-2-2-3- Technique de dilution en milieu solide :

7-2-2-3-1- Principe :

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antifongique dans un milieu gélosé à des concentrations variables, suivie de l'ensemencement d'un inoculum fongique défini à la surface de la gélose dans le but de déterminer le taux d'inhibition (**El Kalamouni, 2010**).

7-2-2-3-2- Mode opératoire :

L'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques est testée contre les deux souches de champignons décrites ci-dessus par la technique de contact direct (**Singh et al., 2008**).

- Les huiles essentielles sont préparées par dilution de 10, 20, 30, 40 et 50 µl dans 500 µl de Tween 20 à 5%.
- Les extraits méthanoliques sont préparés par solubilisation de 5, 10, 15 et 20 mg dans 500 µl de méthanol.
- Des concentrations finales de 1, 2, 3, 4, et 5 µl/ml pour les huiles essentielles et de 0.5, 1, 1.5 et 2 mg/ml pour les extraits méthanoliques sont obtenues par addition de 0.5 ml de solutions préalablement préparées dans un tube contenant 9.5 ml du milieu PDA à une température comprise entre 45 et 50°C.
- Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes est coulé dans des boîtes de Pétri. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.
- Une boîte de Pétri contenant 10 ml de milieu PDA sans huiles essentielle ou extrait méthanolique est utilisée comme contrôle négatif.
- Deux boîtes de Pétri avec 10 ml de milieu PDA, l'une contenant Propineb (1.59 mg/boîte de Pétri) et l'autre Vapcotop (2 mg/ml/boîte de Pétri) sont utilisées comme contrôles positifs.

Remarque : Le méthanol et le Tween 20 utilisés pour les différentes dilutions ont été testés préalablement sur les souches fongiques étudiées. Ils n'ont présenté aucune activité antifongique, ils n'interfèrent donc pas dans l'interprétation des résultats.

- **Inoculation :**

Un disque mycélien de 8 mm de diamètre, coupé de la périphérie de la pré-culture de 5 jours, est inoculé de manière aseptique dans le centre de chaque boîte de Pétri.

- **Incubation :**

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm stérile puis incubées à 28 °C pendant 9 jours.

7-2-2-3-3- Expression des résultats :

- L'efficacité du traitement est évaluée quotidiennement pendant neuf jours en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

- Le pourcentage d'inhibition de la croissance des deux champignons testés, par rapport au témoin, est calculé au jour 9, en utilisant la formule suivante (**Albuquerque et al., 2006**):

$$\text{Pourcentage d'inhibition mycélienne} = [(dc-dt)/dc] \times 100$$

Où, dc : le diamètre de la croissance mycélienne du contrôle négatif,

dt : le diamètre de la croissance mycélienne en présence du traitement à l'huile essentielle ou l'extrait méthanolique.

Tous les tests sont effectués en triplicata.

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : la plus faible concentration en huile essentielle ou extrait méthanolique qui a complètement inhibé la croissance du champignon après neuf jours d'incubation est considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).



Résultats et discussion

1- Screening phytochimique :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* en utilisant des réactifs spécifiques de révélation basés sur des réactions de précipitation et de turbidité ou un changement de couleur spécifique. Les résultats expérimentaux du criblage phytochimique sont mentionnés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Criblage phytochimique d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

Métabolite secondaire	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Mentha pulegium</i>
Tanins catéchiques	+	+
Tanins galliques	-	-
Anthocyanes	+	+
Leuco anthocyanes	-	-
Saponosides	+	+
Flavonoïdes	+	+
Alcaloïdes	-	-
Terpènes et Stérols	+	+

+ : présence / - : absence.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de nos deux plantes : les tanins catéchiques, les anthocyanes, les saponosides, les flavonoïdes et les terpènes. Cependant, les tests se sont révélés négatifs pour les tanins galliques, les leuco anthocyanes et les alcaloïdes.

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques d'*O. vulgare* (sans spécification de la sous espèce) de la région de Boumerdes ont démontré la présence des tanins, des anthocyanes, des saponosides et des flavonoïdes (**Bendifallah et al., 2015**). Ceci est comparable à nos résultats.

De même, les tests phytochimiques réalisés sur *M. pulegium* du Maroc par **Zekri et al. (2013)** ont montré la présence des mêmes constituants chimiques détectés dans la plante étudiée, en plus des alcaloïdes et des tanins galliques.

La présence de ces métabolites secondaires au niveau des deux plantes étudiées explique leur fort pouvoir thérapeutique. Par conséquent, ces résultats justifient la large utilisation de ces deux plantes dans la médecine traditionnelle par la population locale.

Effectivement, les tanins catéchiques, les anthocyanes, les flavonoïdes, les saponosides et les terpènes et stérols possèdent plusieurs propriétés bénéfiques notamment antimicrobiennes, antioxydantes, antiinflammatoires, vasculo-protectrices, antiulcéreuses et bien d'autres. (Di Carlo et al., 1999 ; Bruneton, 2009).

Ces résultats nous ont permis de nous orienter vers l'extraction et l'étude des huiles essentielles et des composés phénoliques.

2- Extraction des huiles essentielles :

2-1- Extraction :

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* est obtenue par la méthode d'hydrodistillation. Cette huile est de couleur jaune foncé, de saveur piquante et d'odeur fortement aromatique.

L'huile essentielle de *M. pulegium* obtenue après hydrodistillation est de couleur jaune très pale, de saveur douce et d'odeur très aromatique.

2-2- Cinétique d'extraction :

Lors des expériences servant à établir la cinétique d'extraction, l'extraction est périodiquement arrêtée, l'huile essentielle récupérée est pesée à des intervalles de temps de 15 minutes qui s'étalent de 0 à 120 minutes. Ensuite l'extraction est reprise. A partir de ces mesures du poids de l'huile essentielle on en déduit le rendement de chaque prise à partir de la formule du rendement (%) et ainsi on construit la courbe de la cinétique d'extraction en fonction du temps. Le résultat est illustré dans les figures 21 et 22.

Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

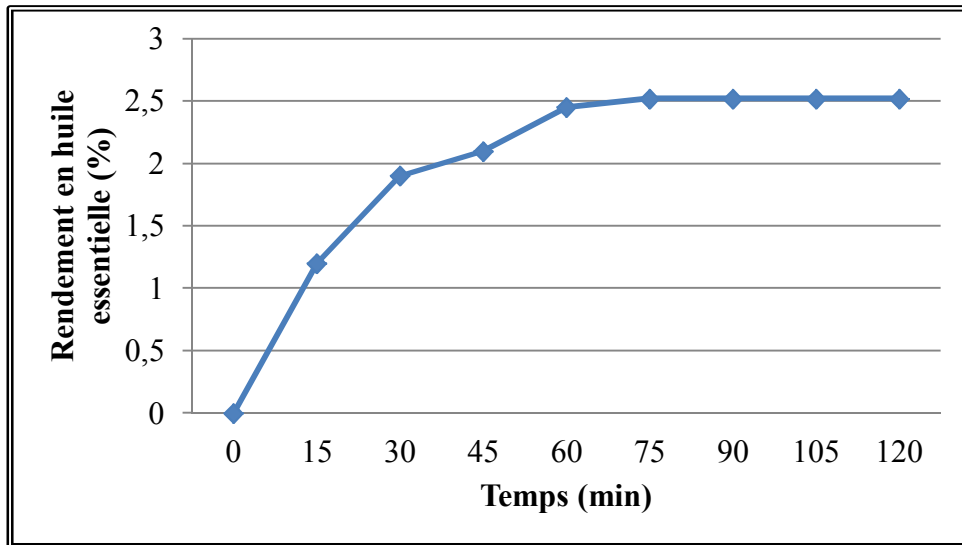


Figure 21 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Ces résultats (figure 21) montrent que la vitesse d'extraction de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* est très rapide. Le rendement augmente en fonction du temps puis il se stabilise. En effet, l'extraction complète est achevée en moins de 60 min.

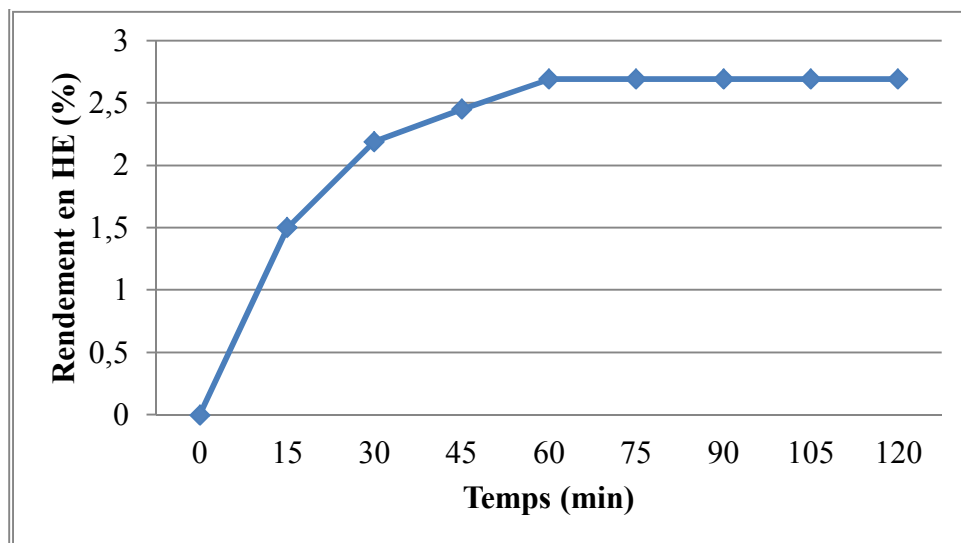


Figure 22 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Concernant la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* (figure 22), elle est aussi très rapide et indique que le rendement augmente rapidement en fonction du temps puis il tend vers un palier à partir de 60 min.

2-3- Rendement d'extraction :

Le rendement, qui est déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé, est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Rendement d'extraction des deux huiles essentielles

Matériel végétal	Essai	Rendement (%)	
<i>Origanum glandulosum</i>	1	2.52	2.52±0.005
	2	2.53	
	3	2.52	
<i>Mentha pulegium</i>	1	2.69	2.69±0.01
	2	2.69	
	3	2.71	

2-3-1- *Origanum glandulosum* :

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* est estimé à 2.52%, révélant sa richesse en molécules bioactives. Ce rendement est important comparé à celui rapporté par **Berrehal et al. (2010)** indiquant que les parties aériennes d'*O. glandulosum* récolté en période de floraison dans la région de Jijel et de Constantine, ont une teneur en huiles essentielles de 2.0%. Même constatation quant aux résultats de **Semra et al. (2013)** avec un rendement en huile essentielle de 2.2% de la même espèce récoltée dans la région de Zighoud Youcef (wilaya de Constantine) en période de floraison. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Sahraoui et al. (2007)** dont le rendement est estimé à 2.5% pour *O. glandulosum* de la région de Sétif. Cependant un rendement plus élevé a été rapporté par **Bendahou et al. (2008)** sur cette même espèce récoltée dans la région de Tlemcen, le résultat était estimé à 4.8%.

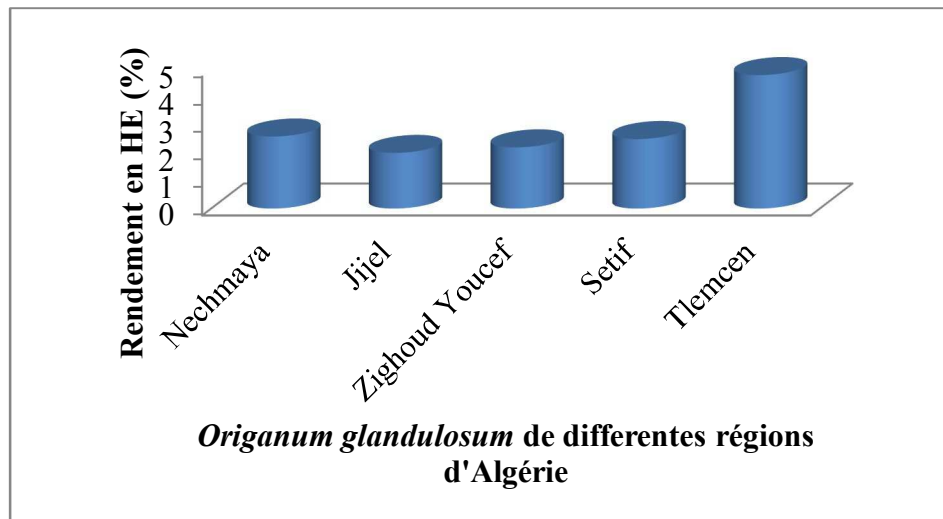


Figure 23 : Représentation des rendements des huiles essentielles d’*Origanum glandulosum* extraites de différentes régions : Nechmaya (espèce étudiée), Jijel (Berrehal et al., 2010), Zighoud Youcef (Semra et al., 2013), Sétif (Sahraoui et al., 2007) et Tlemcen (Bendahou et al., 2008)

2-3-2- *Mentha pulegium* :

L’extraction de l’huile essentielle de *Mentha pulegium* a donné un rendement de 2.69%. Ce résultat est nettement supérieur à celui reporté par Zwaving et Smith (1971) qui ont obtenus un rendement de 0.95% pour la même plante poussant en Grèce. Kokkini et al. (2004) ont étudié la menthe pouliot de plusieurs régions de Grèce dont les rendements en huiles essentielles varient entre 1.0% et 3.8%. La menthe pouliot marocaine étudiée par Benayad (2008), Derwich et al. (2010) et Ait-Ouazzou et al. (2012) a révélée des teneurs en huile essentielle inférieures au résultat obtenu dans notre étude évalué à 2.33%, 1.66% et 2.7%, respectivement. Cependant Zekri et al. (2013) ont déterminé des rendements allant de 5.29% à 6.2% pour la menthe pouliot du Maroc. En Algérie, Beghidja et al (2007) et Benabdallah (2008) ont déterminé les rendements en huile essentielle de la menthe pouliot récoltée dans plusieurs régions de Jijel ainsi que la région d’El Kala. Les valeurs obtenues étaient de 1.16 à 2.19% et 1.45%, respectivement.

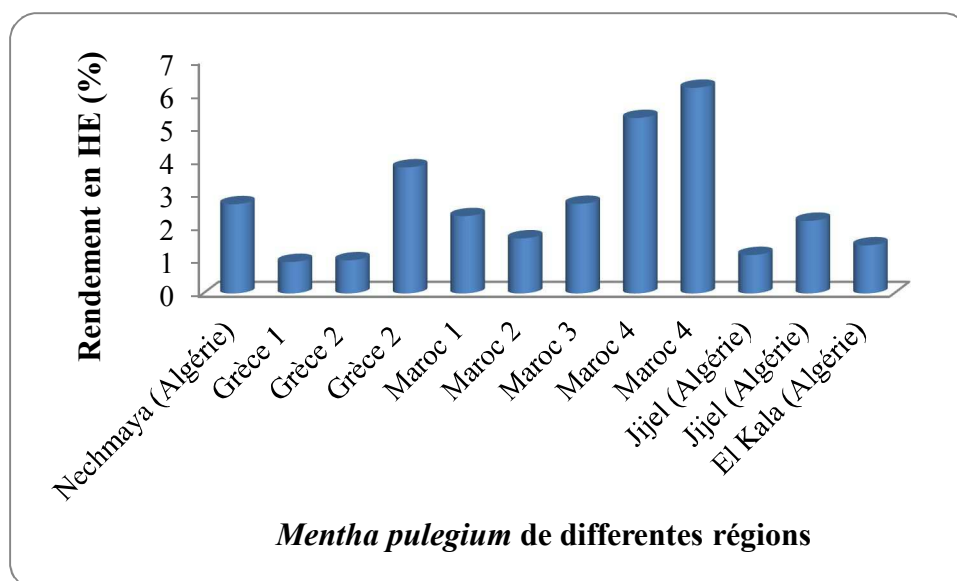


Figure 24 : Représentation des rendements des huiles essentielles de *Mentha pulegium* extraites de différentes régions : Nechmaya (espèce étudiée), Grèce 1 (Zwaving et Smith, 1971), Grèce 2 (Kokkini et al., 2004), Maroc 1 (Benayad, 2008), Maroc 2 (Derwich et al., 2010), Maroc 3 (Ait-Ouazzou et al., 2012), Maroc 4 (Zekri et al., 2013), Jijel (Beghidja et al., 2007) et El Kala (Benabdallah, 2008)

Ces variations de teneurs en huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* peuvent être attribuées à différents facteurs environnementaux prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil) le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction (Besombes, 2008 ; Béjaoui et al., 2013a).

3- Analyses des huiles essentielles :

3-1- Caractéristiques physiques:

L'un des paramètres essentiels concernant la qualité des huiles essentielles est bien évidemment les caractères physico-chimiques. Ceux-ci nous permettent de confirmer la qualité des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* par l'analyse de leur densité relative et indice de réfraction à 20 °C. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 06.

Tableau 06 : Caractéristiques physiques des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

Huile essentielle	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
<i>Origanum glandulosum</i>	0.889	1.49023
<i>Mentha pulegium</i>	0.878	1.46436

3-2- Identification chimique des huiles essentielles :

3-2-1- *Origanum glandulosum* :

L'analyse du spectre par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* nous a permis d'identifier 43 composés représentant 98.546% de la composition globale de l'huile. L'ensemble des produits identifiés est illustré dans le tableau 07. Les structures chimiques des composés sont indiquées dans la figure 25. Le chromatogramme de cette analyse CPG/SM est présenté dans l'annexe 1.

Tableau 07 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

	TR^a	Composé^b	% FID	IK^c
1	5.78	Alpha-Thujène	0.895	924
2	5.92	Alpha-Pinène	0.716	932
3	6.25	Camphène	0.12	946
4	6.71	Sabinène	0.018	696
5	6.8	Béta-Pinène	0.154	974
6	6.87	Octène-3-ol	0.52	974
7	6.97	Octanone-3	0.161	979
8	7.04	Myrcène	1.494	988
9	7.35	Alpha-Phellandrène	0.188	1002
10	7.38	Delta-3-Carène	0.072	1008
11	7.55	Alpha-Terpinène	1.787	1014
12	7.72	Para-Cymène	25.615	1020
13	7.77	Limonène	0.403	1024
14	7.8	Béta-Phéllandrène	0.207	1025
15	7.83	Eucalyptol	0.05	1031
16	7.89	(Z)-Béta-Ocimène	0.074	1032
17	8.08	(E)-Béta-Ocimène	0.06	1044
18	8.31	Gamma-Terpinène	16.612	1054
19	8.5	Cis-Hydrate de Sabinène	0.197	1065
20	8.74	Terpinolène	0.065	1086
21	8.83	Para-Cyménène	0.066	1089
22	8.99	Linalol	0.87	1095
23	9.05	Trans-Hydrate de Sabinène	0.12	1098
24	9.78	Camphre	0.012	1141

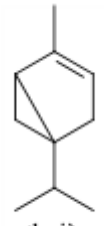


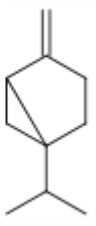
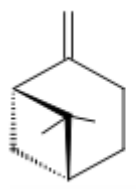
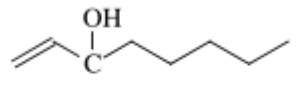
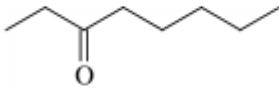
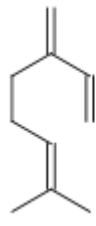
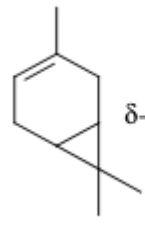
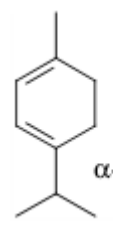
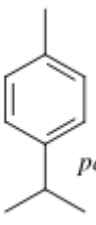
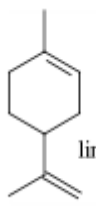
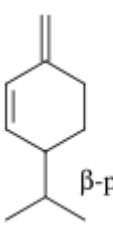
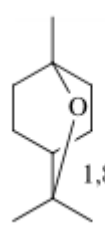
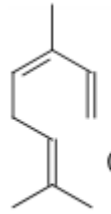
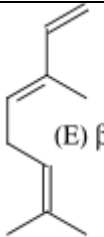
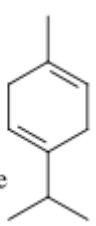
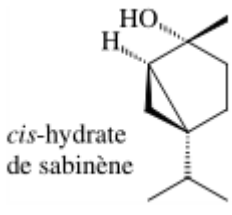
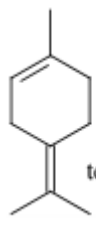
25	10.17	Bornéol	0.214	1165
26	10.3	Terpinène-4-ol	0.311	1174
27	10.39	Para-Cymène-8-ol	0.216	1179
28	10.53	Alpha-Terpinéol	0.386	1186
29	10.99	Thymol méthyl-Ether	0.051	1232
30	11.12	Carvacrol méthyl-Ether	0.18	1241
31	11.71	Isomère Thymol MW 150	0.163	1258
32	11.87	Thymol	23.129	1289
33	11.99	Carvacrol	20.321	1298
34	13.58	Béta-Caryophyllène	0.848	1417
35	13.75	Thymoquinone	0.487	1553
36	14.02	Alpha-Humulène	0.047	1452
37	14.62	Béta-Bisabolène	0.283	1505
38	14.7	Gamma-Cadinène	0.018	1513
39	14.75	Delta-Cadinène	0.025	1522
40	14.81	Béta-Sesquiphellandrène	0.539	1521
41	14.99	(E)-Alpha-Bisabolène	0.422	1529
42	15.46	Spathulénol	0.02	1577
43	15.54	Oxyde de Caryophyllène	0.41	1582
	Total		98.546	

Note :

^a : Temps de rétention (en minutes).

^b : Composés énumérés dans l'ordre de leur élution.

^c : Indice de Kovats.

 <p>α-thujène</p> <p>1</p>	 <p>α-pinène</p> <p>2</p>	 <p>camphène</p> <p>3</p>	 <p>sabinène</p> <p>4</p>
 <p>β-pinène</p> <p>5</p>	 <p>oct-1-èn-3-ol</p> <p>6</p>	 <p>octan-3-one</p> <p>7</p>	 <p>myrcène</p> <p>8</p>
 <p>α-phellandrène</p> <p>9</p>	 <p>δ-3-carène</p> <p>10</p>	 <p>α-terpinène</p> <p>11</p>	 <p><i>para</i>-cymène</p> <p>12</p>
 <p>limonène</p> <p>13</p>	 <p>β-phellandrène</p> <p>14</p>	 <p>1,8-cinéole</p> <p>15</p>	 <p>(<i>Z</i>) β-ocimène</p> <p>16</p>
 <p>(<i>E</i>) β-ocimène</p> <p>17</p>	 <p>γ-terpinène</p> <p>18</p>	 <p><i>cis</i>-hydrate de sabinène</p> <p>19</p>	 <p>terpinolène</p> <p>20</p>

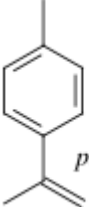
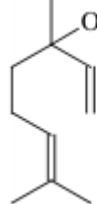
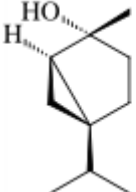
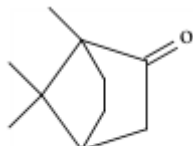
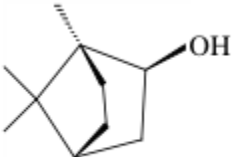
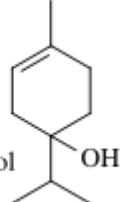
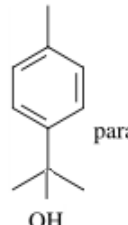
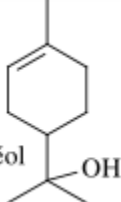
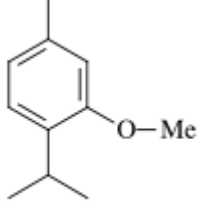
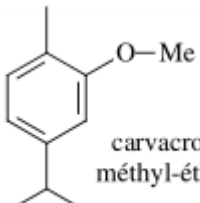
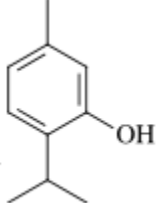
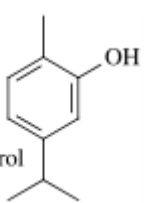
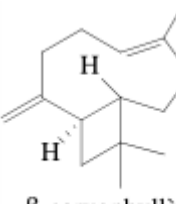
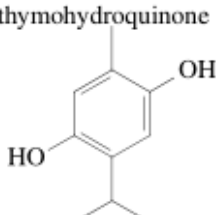
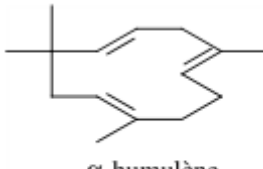
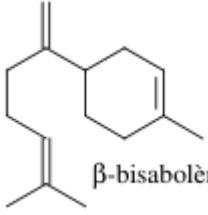
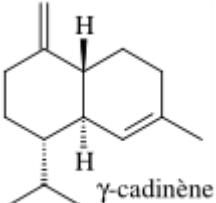
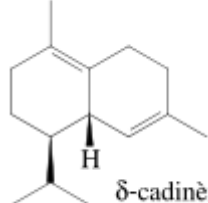
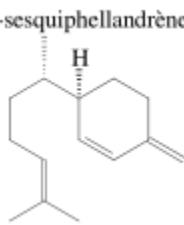
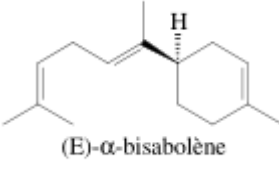
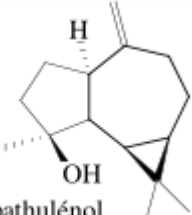
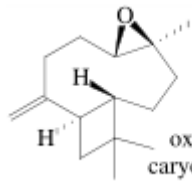
 <p><i>para</i>-cyménène</p> <p>21</p>	 <p>linalol</p> <p>22</p>	 <p><i>trans</i>-hydrate de sabinène</p> <p>23</p>	 <p>camphre</p> <p>24</p>
 <p>bornéol</p> <p>25</p>	 <p>terpinèn-4-ol</p> <p>26</p>	 <p><i>para</i>-cymèn-8-ol</p> <p>27</p>	 <p>α-terpinéol</p> <p>28</p>
 <p>thymol méthyl-éter</p> <p>29</p>	 <p>carvacrol méthyl-éter</p> <p>30</p>	 <p>thymol</p> <p>32</p>	 <p>carvacrol</p> <p>33</p>
 <p>β-caryophyllène</p> <p>34</p>	 <p>thymohydroquinone</p> <p>35</p>	 <p>α-humulène</p> <p>36</p>	 <p>β-bisabolène</p> <p>37</p>
 <p>γ-cadinène</p> <p>38</p>	 <p>δ-cadinène</p> <p>39</p>	 <p>β-sesquiphellandrène</p> <p>40</p>	 <p>(E)-α-bisabolène</p> <p>41</p>
 <p>spathuléol</p> <p>42</p>	 <p>oxyde de caryophyllène</p> <p>43</p>		

Figure 25 : Structures de composés identifiés dans l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Les figures 26 et 27 montrent la répartition en % des principales familles de composés avec une mention des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*.

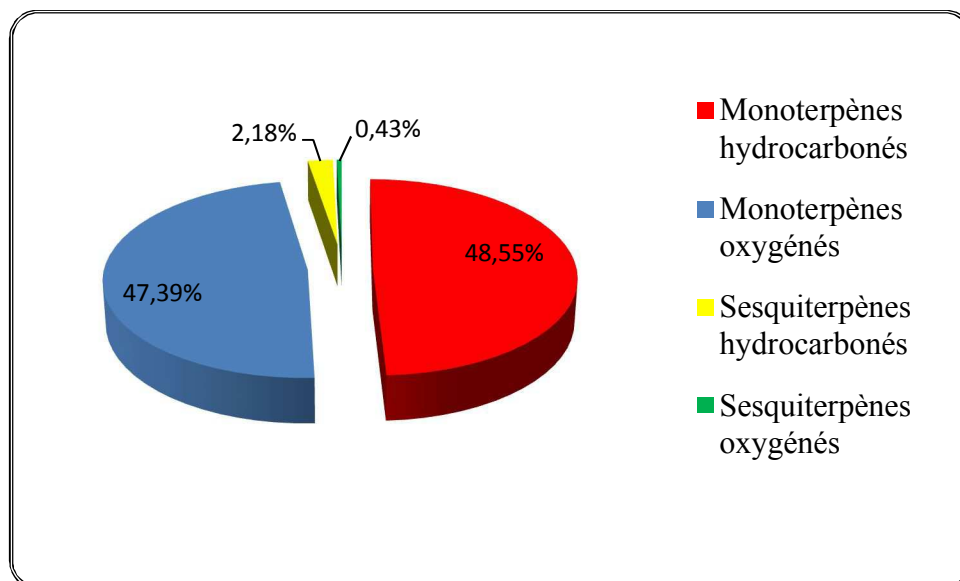


Figure 26 : Répartition en % des principales familles des composés de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*

La composition de l'huile essentielle est caractérisée par un pourcentage élevé de composés monoterpéniques hydrocarbonés et oxygénés. Les éléments majoritaires de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* étant le para-cymène à 25.615%, le thymol à 23.129% et le carvacrol 20.321%. Le gamma-terpinène (16.612%) est aussi présent à une concentration significative.

On peut en conclure que l'huile essentielle isolée d'*Origanum glandulosum* de la région de Nechmaya présente un chémotype para-cymène / thymol / carvacrol.

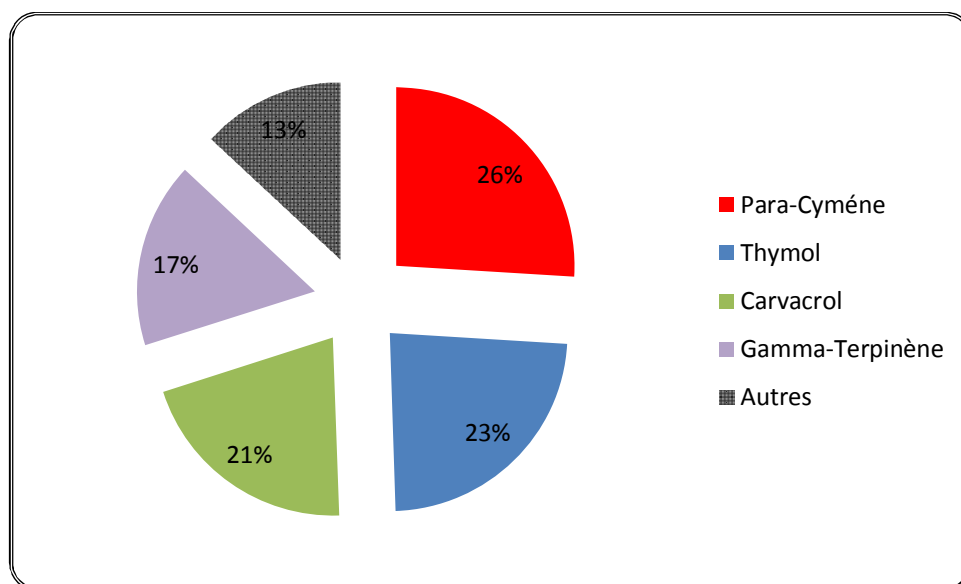


Figure 27 : Répartition en % des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*

Au cours de ces dernières années, les huiles essentielles d'*Origanum vulgare L.*, compte non tenu des sous-espèces, ont intensivement été étudiés pour leurs compositions chimiques dans le monde entier : France (Chalchat et Pasquier, 1998), Autriche (Lukas et al., 2013), Italie du Sud (De Martino et al., 2009), Chine et Pakistan (Gong et al., 2014), Bosnie (Stoilova et al., 2008), Bulgarie (Kula et al., 2007), Lituanie (Mockute et al., 2001) et aussi d'autres populations Méditerranéennes (Figueredo et al., 2006).

La plupart des travaux indiquent la présence de deux principaux chémotypes de cette huile essentielle. L'un contient comme principaux composants des phénols : thymol et/ou carvacrol et l'autre est constitué principalement d'alcools monoterpéniques comme le terpinen-4-ol, seul ou en présence de cis- et de trans-sabinène hydrate.

La sous espèce *Origanum glandulosum* étant endémique d'Algérie et de Tunisie, elle a fait l'objet de quelques études scientifiques portant principalement sur la détermination de la composition chimique de son huile essentielle dans différentes régions d'Algérie et de Tunisie.

La figure 28 représente le pourcentage des trois composés majoritaires de cette huile essentielle selon des travaux menés dans différentes régions d'Algérie et de Tunisie.

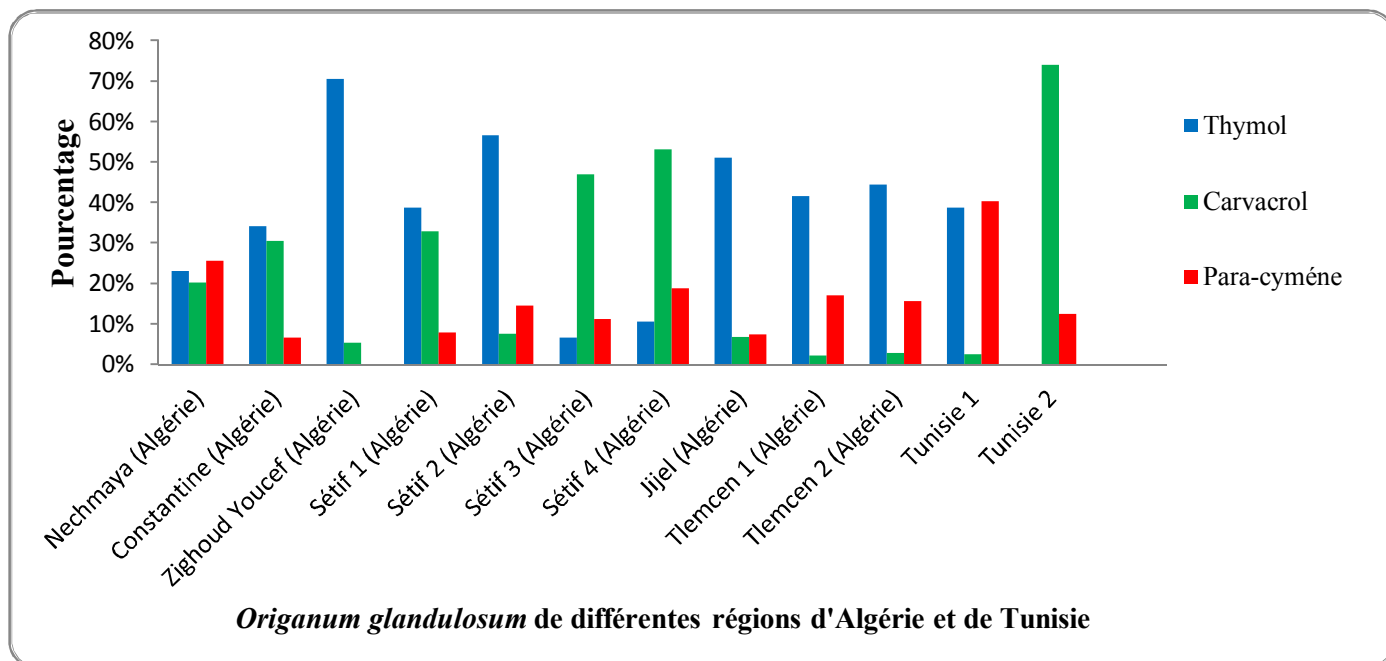


Figure 28 : Concentration en thymol, carvacrol et para-cymène de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* de différentes régions : Nechmaya (épèce étudiée), Constantine (Berrehal et al., 2010), Zighoud Youcef (Semra et al. 2013), Sétif 1 (Khalfi et al., 2008), Sétif 2 (Sari et al., 2006), Sétif 3 (Belhattab et al., 2005), Sétif 4 (Ruberto et al., 2002), Jijel (Berrehal et al., 2010), Tlemcen 1 (Bendahou et al., 2008), Tlemcen 2 (Bekhechi et al., 2008), Tunisie 1 (Mechergui et al., 2010) et Tunisie 2 (Béjaoui et al., 2013a).

D'après la figure 28, les huiles essentielles d'*O. glandulosum* provenant de différentes régions présentent une composition chimique dominée par le thymol et/ou le carvacrol et le para-cymène à différentes concentrations.

Par conséquent, le thymol est identifié comme composé majoritaire des huiles essentielles d'*O. glandulosum* issus des régions de Constantine (Berrehal et al., 2010), Zighoud Youcef (Semra et al., 2013), Sétif 1 (Khalfi et al., 2008), Sétif 2 (Sari et al., 2006), Jijel (Berrehal et al., 2010), Tlemcen 1 (Bendahou et al., 2008) et Tlemcen 2 (Bekhechi et al., 2008) avec des concentrations de 34.20%, 70.59%, 38.80%, 56.60%, 51.10%, 41.60% et 44.40%, respectivement.

Cependant, les travaux de **Belhattab et al. (2005)**, **Ruberto et al. (2002)** et **Béjaoui et al. (2013a)** portant sur l'étude de l'huile de cette même espèce de la région de Sétif 3, Sétif 4 et Tunisie 2 ont montré une large prédominance du carvacrol avec des taux de 47%, 53.20% et 73.03%, respectivement.

Par ailleurs, la comparaison de nos résultats avec les travaux effectués en Tunisie sur l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* (**Mechergui et al., 2010**), permet de distinguer la présence du même composé majoritaire dans leurs huiles essentielles, à savoir le para-cymène qui est estimé à 40.4%. En revanche, cette huile originaire de Tunisie présente un faible taux de carvacrol de l'ordre de 2.6%.

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* Algérien des différentes études citées ci-dessus présente une faible teneur en para-cymène comparée à l'huile essentielle de la région de Nechmaya, allant de 0 à 20%.

Notant, par ailleurs, que la composition chimique de l'huile essentielle étudiée diffère totalement de celles précédemment publiées dans la littérature et affiche un profil chimique de l'huile spécifique par la présence des trois composés thymol, carvacrol et para-cymène en concentrations importantes avec la prédominance du para-cymène.

3-2-2- *Mentha pulegium* :

La CPG/SM a permis de recenser 32 composés à partir de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* représentant 99.58% de la composition de l'huile. Les résultats sont représentés dans le tableau 08. Les structures chimiques des composants de l'huile essentielle sont indiquées dans la figure 29. Le chromatogramme correspondant est présenté dans l'annexe 1.

Tableau 08 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

	TR ^a	Composé ^b	% FID	IK ^c
1	5.17	2,5-Diméthyl-furane	0.073	708
2	5.78	Alpha-Thujène	0.134	924
3	5.93	Alpha-Pinène	3.551	932
4	6.26	Camphène	0.090	946
5	6.72	Sabinène	7.685	696
6	6.81	Béta-Pinène	6.923	974
7	6.97	3-octanone	0.479	979
8	7.04	Myrcène	0.411	988
9	7.19	3-Octanol	1.159	988
10	7.69	Para-Cymène	0.072	1020
11	7.78	Limonène	5.710	1024
12	7.80	Béta-Phellandrène	0.181	1025
13	7.83	Eucalyptol	0.163	1031
14	8.04	(E)-Béta-Ocimène	0.066	1044
15	8.28	Gamma-Terpinène	0.156	1054

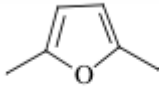
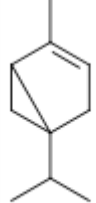

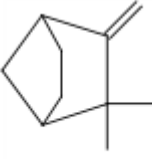
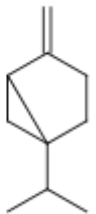
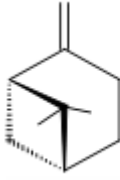
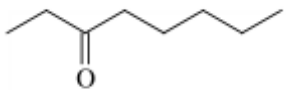
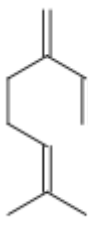
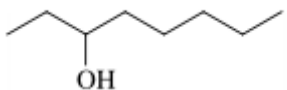
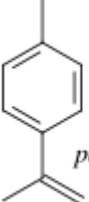
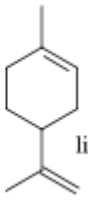
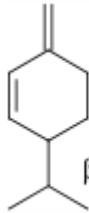
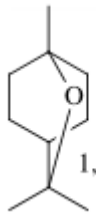
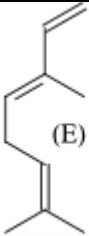
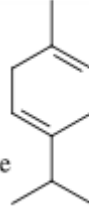
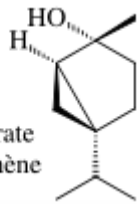
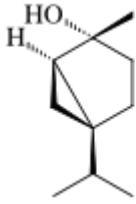
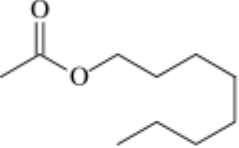
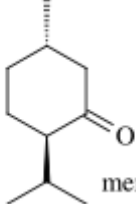
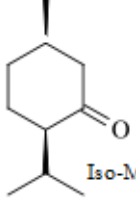
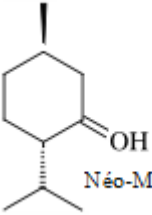
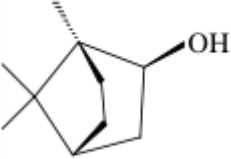
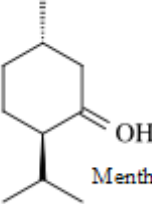
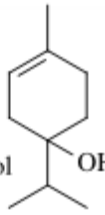
16	8.50	Cis-Hydrate de sabinène	0.156	1065
17	9.02	Trans-Hydrate de Sabinène	0.074	1098
18	9.31	Acétate d'octanyle	0.327	1120
19	9.92	Menthone	3.771	1148
20	10.06	Iso-Menthone	0.901	1158
21	10.13	Néo-Menthol	0.089	1161
22	10.17	Bornéol	0.071	1165
23	10.23	Menthol	0.049	1167
24	10.29	Terpinène-4-ol	0.113	1174
25	1.44	Pipéritone	65.019	1249
26	11.58	Néo Acétate de dihydrocarvéyle	0.215	1285
27	11.83	Acétate de Menthyle	0.049	1294
28	12.51	Pipériténone	0.157	1340
29	13.11	Béta-Bourbonène	0.377	1387
30	13.57	Béta-Caryophyllène	0.417	1417
31	14.01	Alpha-Humulène	0.689	1452
32	14.32	Germacrène-D	0.252	1484
	Total		99.579	

Note :

^a Temps de rétention (en minutes).

^b Composés énumérés dans l'ordre de leur élution

^c Indice de Kovats

 2,5-Diméthyl-furane 1	 α-thujène 2	 α-pinène 3	 camphène 4
 sabinène 5	 β-pinène 6	 octan-3-one 7	 myrcène 8
 octan-3-ol 9	 <i>para</i> -cyménène 10	 limonène 11	 β-phellandrène 12
 1,8-cinéole 13	 (E) β-ocimène 14	 γ-terpinène 15	 <i>cis</i> -hydrate de sabinène 16
 <i>trans</i> -hydrate de sabinène 17	 acétate de n-octyle 18	 menthone 19	 Iso-Menthone 20
 Néo-Menthol 21	 bornéol 22	 Menthol 23	 terpinèn-4-ol 24

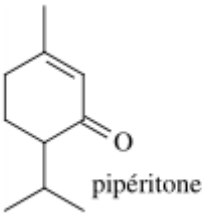
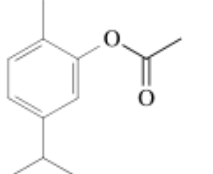
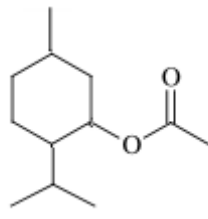
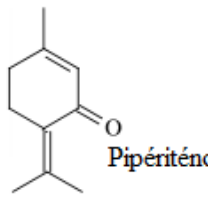
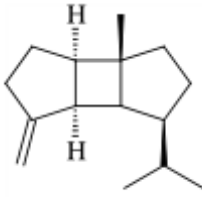
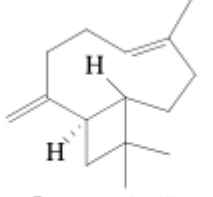
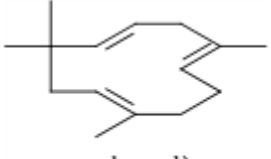
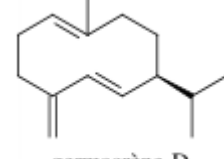
 <p>pipéritone</p> <p>25</p>	 <p>Néo Acétate de dihydrocarvéyle</p> <p>26</p>	 <p>Acétate de Mentyle</p> <p>27</p>	 <p>Pipériténone</p> <p>28</p>
 <p>β-bourbonène</p> <p>29</p>	 <p>β-caryophyllène</p> <p>30</p>	 <p>α-humulène</p> <p>31</p>	 <p>germacrène-D</p> <p>32</p>

Figure 29 : Structures des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Les figures 30 et 31 rapportent la répartition en % des principales familles de composés ainsi que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, respectivement.

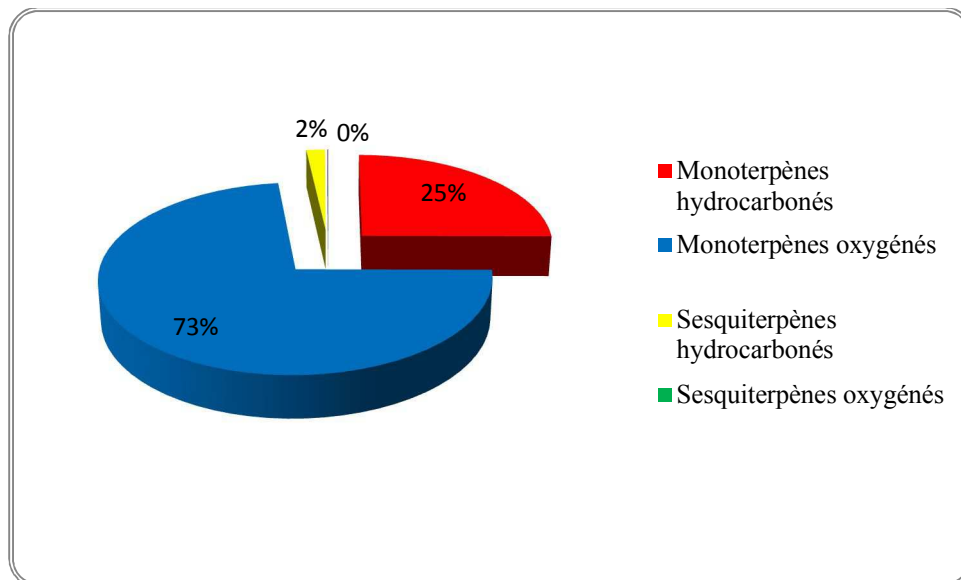


Figure 30 : Répartition en % des principales familles des composés de l'huile essentielle de *M. pulegium*

La composition chimique de l'huile essentielle de *M. pulegium* est principalement constituée de composés monoterpéniques oxygénés à raison de 73% dont le pipéritone est incontestablement le composé le plus abondant avec un pourcentage de 65.019% de la totalité de l'huile. La famille des monoterpènes hydrocarbonés constitue 25% de la composition de l'huile essentielle de *M. pulegium*, elle est principalement composée de Sabinène (7.685%), Beta-Pinène (6.923%) et Limonène (5.710%). L'huile essentielle issue de *M. pulegium* de la région de Nechmaya présente donc un chémotype à pipéritone.

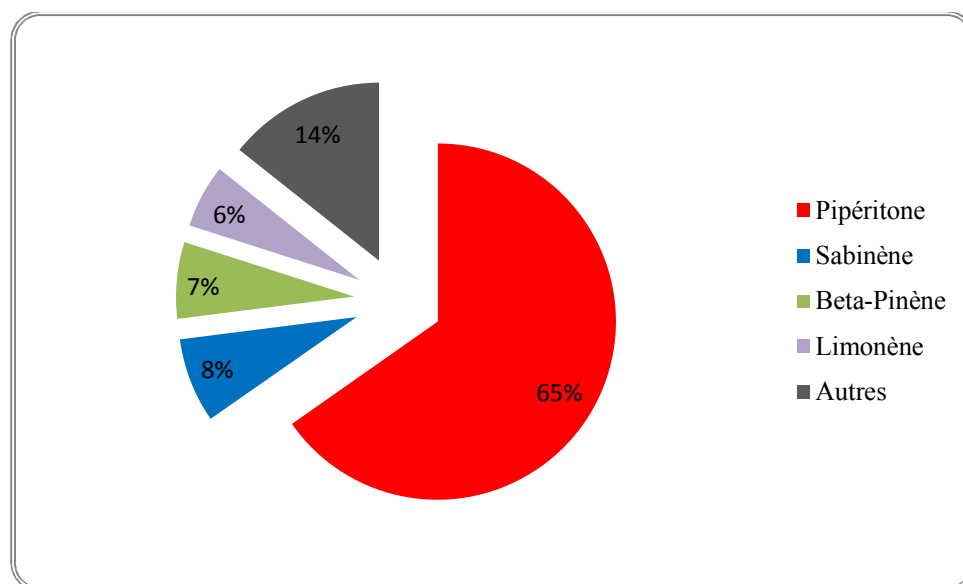


Figure 31 : Répartition en % des composés majoritaires de l'huile essentielle de *M. pulegium*

Plusieurs études sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont révélées de fortes variations d'une région à l'autre. Le chémotype a pulégone étant le plus abondant, il a été observé dans des travaux portant sur la détermination de la composition de l'huile essentielle de *M. pulegium* récolté en Uruguay (**Lorenzo et al., 2002**) et en Grèce (**Sivropoulou et al., 1995**) avec une teneur de 73.4% et 50.4% respectivement.

Les résultats fournis par la littérature (figure 32), relatifs à l'analyse de la composition chimique, indiquent que les huiles essentielles de *M. pulegium* récoltée en Tunisie, au Maroc et en Algérie présentent un taux élevé de pulégone. En effet, les composés : pulégone (61.11%), isomenthone (17.02%), menthone (5.82%) et pipéritone (2.63%) ont été signalés comme les composants majoritaires de l'huile essentielle de cette plante issue de Tunisie (**Hajlaoui et al., 2009**). Pulégone (41.8%), isomenthone (11.3%) et carvone (6.2%) étaient dominants dans une autre étude tunisienne (**Mkaddem et al., 2007**).

Au Maroc, les travaux de **Benayad (2008)**, **Ait-Ouazzou et al. (2012)** et **Zekri et al. (2013)** ont montré que pulégone (73.33%) et menthone (5.63%) ; Pulégone (69.8%) et pipéritone (3.1%) ; Pulégone (68.86% - 71.97%) et pipéritone (24.81% - 26.04%) ont été les principaux composants de l'huile essentielle, respectivement.

En Algérie une étude visant à déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *M. pulegium* de plusieurs stations de la région de Jijel a abouti à la révélation de chémotype à pulégone constitué principalement de : pulégone (43.3 à 87.3%), pipéritone (0.1 à 26.7%), isomenthone (trace à 22.6%) et pipéritone (trace à 2.13%) (Beghidja et al 2007). Benabdallah (2008) a étudié l'huile essentielle de la menthe pouliot de la région d'El Kala dont la composition chimique est dominée par la pulégone (49.8%), la néomenthol (16.5%), la menthone (12.9%) et l'isomenthone (9.9%).

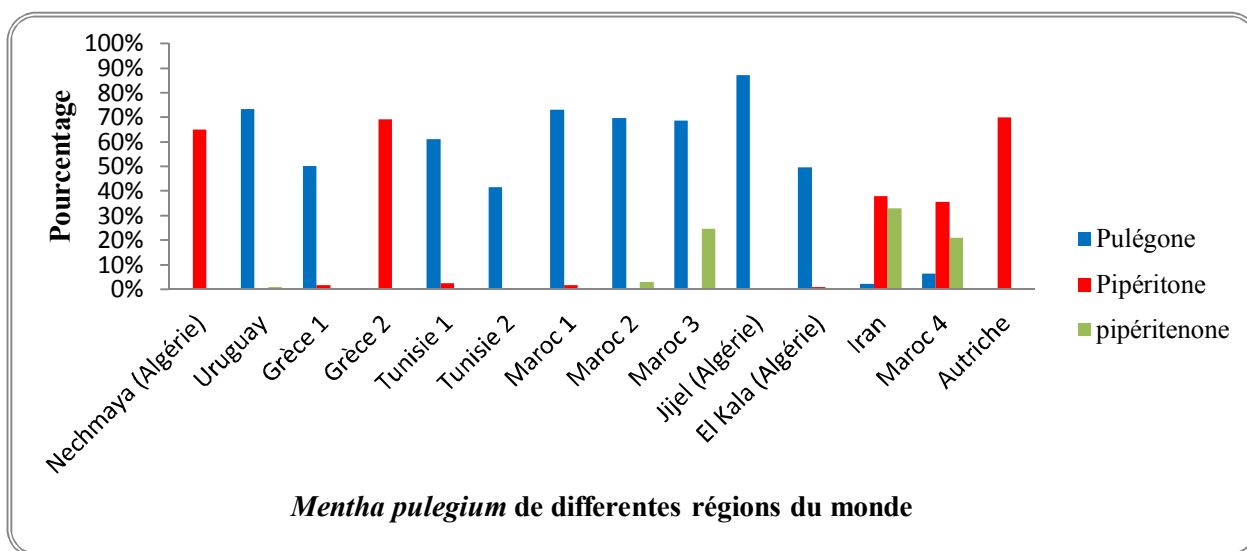


Figure 32 : Concentration en pulégone, pipéritone et piperiténone de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de différentes régions du monde : Nechmaya (espèce étudiée), Uruguay (Lorenzo et al., 2002), Grèce 1 (Sivropoulou et al., 1995), Tunisie 1 (Hajlaoui et al., 2009), Tunisie 2 (Mkaddem et al., 2007), Maroc 1 (Benayad, 2008), Maroc 2 (Ait-Ouazzou et al., 2012), Maroc 3 (Zekri et al., 2013), Jijel (Beghidja et al., 2007), El Kala (Benabdallah, 2008) Iran (Mahboubi et Haghi, 2008), Maroc 4 (Derwich et al., 2010), Auriche (Zwaving et Smith, 1971). Grèce 2 (Petrakis et al., 2009)

Un deuxième chémotype à pipéritone / piperiténone, a été observé par Mahboubi et Haghi (2008), qui ont étudié l'huile essentielle de cette même espèce poussant en Iran (pipéritone 38.0% et pipériténone 33.0%). Aussi, au Maroc on a pu identifier une huile dont les composants majoritaires sont : pipéritone (35.56%) et pipériténone (21.12%) (Derwich et al., 2010).

Il est connu que *M. pulegium* contient comme constituant principal la pulégone, dont le pourcentage varierait de 25 à 92% (**Pino et al., 1996 ; Lawrence, 1998 ; Aziz et Abbass, 2010**). Cependant, certains rapports ont cité des concentrations en pulégone en dehors des limites indiquées ci-dessus. **Rim et Jee (2006)** ont rapporté 99% de concentration en pulégone alors que **Mahboubi et Haghi (2008)** n'ont obtenu que 2.3% de pulégone en analysant l'huile essentielle de *M. pulegium* par CPG/SM.

Pourtant, il existe une exception dans la composition chimique chez la plante que nous avons cueillie dans la région de Nechmaya. En effet, elle montre une composition en huile essentielle différente par sa haute teneur en pipéritone et l'absence totale de pulégone. Nos résultats sont uniquement similaires à ceux d'une étude menée en Autriche par **Zwaving et Smith (1971)**. Effectivement, un échantillon de *M. pulegium* prélevé à proximité du lac Lange, sud-est de Neusiedl révèle une composition dominée par la pipéritone (70%) et le limonène (11%) avec une absence totale de pulégone. D'autres travaux, en Grèce (île de Crète), ont montré que la pipéritone et l'iso-menthone sont les composants principaux de l'huile essentielle de *M. pulegium* avec des taux de 69.3% et 24.8%, respectivement (**Petrakis et al., 2009**).

Il est connu que les plantes étudiées présentent une grande variabilité dans la quantité et la qualité de la composition chimique de leurs huiles essentielles en raison de l'existence de nombreux paramètres qui sont principalement le climat vital, les facteurs saisonniers, géologiques et géographiques ainsi que les différentes phases végétatives de la plante la méthode d'extraction (**Müller-Riebau et al., 1997 ; Kokkini et al., 2004 ; Bendahou et al., 2008**).

4- Extraction des composés phénoliques :

4-1- Extraction :

Les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont obtenus par la méthode d'extraction solide-liquide utilisant le soxhlet. On obtient des substances verdâtres plus ou moins pâteuses et collantes.

4-2- Rendement d'extraction :

L'extraction des composés phénoliques par le méthanol des plantes étudiées, nous a permis de déterminer les rendements de ces extraits bruts. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Rendement d'extraction des composés phénoliques des deux plantes

Materiel végétal	Essaie	Rendement (%)	
<i>Origanum glandulosum</i>	1	14.35	14.35±0.004
	2	14.34	
	3	14.35	
<i>Mentha pulegium</i>	1	24.87	24.87±0.01
	2	24.85	
	3	24.89	

Le calcul des rendements par rapport au poids total de la poudre d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* montre des proportions élevées de l'ordre de 14.35% et 24.87% pour les deux plantes, respectivement.

Pour *O. glandulosum*, il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie étant donné que notre étude est la première à mettre en évidence le rendement en extrait méthanolique de cette plante endémique.

L'extrait méthanolique de *M. pulegium* a fait objet de quelques études, dont le rendement a été similaire au notre. Notamment celle de **Khaled-Khodja et al. (2014)** qui ont pu en déterminer un rendement de 25.12% d'extrait méthanolique de la menthe pouliot de la région de Bejaia. Pour l'extrait méthanolique de *M. pulegium* de Tunisie, il a présenté un rendement de 24% (**Hajlaoui et al., 2009**). Une étude turque a aussi démontré un rendement qui corrobore le nôtre, évalué à 25.85% (**Sarikurkcu et al., 2012**).

Les rendements peuvent être influencés par plusieurs paramètres et dépendent entre autre de la composition chimique et les caractéristiques physiques de la matière végétale ainsi que la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee et al., 2003 ; Dai et Mumper, 2010).

Notant que le méthanol est le solvant le plus largement utilisé pour l'extraction de substances phénoliques des Lamiacées. Cakir et al. (2006) et Sharififar et al. (2009) dans leurs études sur les composés phénoliques de *Teucrium*, ont rapporté que le méthanol donnait un rendement d'extraction plus élevé que l'acétone, le chloroforme, l'eau et l'éther de pétrole.

D'après Ciulei (1982), les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés à l'aide du méthanol sont : flavonoïdes, coumarines glycosylés, flavonoïdes sulfatés, alcaloïdes, acides aminés, tanins, acides phénoliques, triterpènes et stérols glycosylés.

5- Analyses des extraits méthanoliques :

5-1- Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative) :

L'étude quantitative des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* au moyen de dosage spectrophotométrique de la méthode au réactif de Folin Ciocalteu, a pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

Le contenu en polyphénols totaux est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique (EAG) par mg d'extrait.

La courbe d'étalonnage est établie avec une équation de régression (figure 33) :

y (absorbance) = 0.0004 μg acide gallique + 0.1203; coefficient de corrélation $R^2 = 0.9966$.

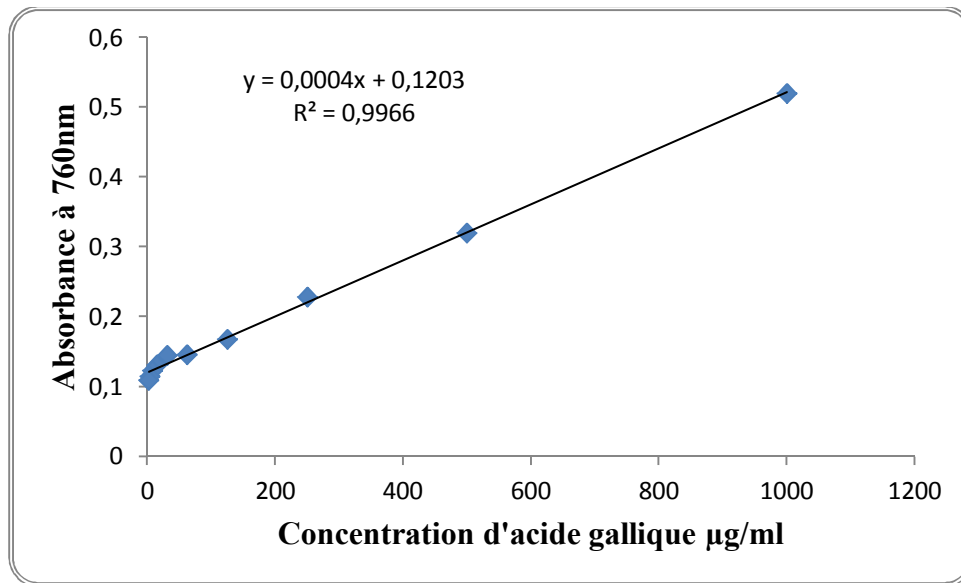


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'extrait méthanolique de l'espèce *Origanum glandulosum* contient une teneur de l'ordre de 526.75 µg EAG/mg d'extrait. Cette concentration est très importante, et pour cette plante dont l'extrait méthanolique n'a fait objet que de très peu d'études, elle laisse à présager des activités pharmacologiques importantes. Dans une étude réalisée sur cette même espèce récoltée dans la région de Bejaia, la détermination de la teneur en polyphénols totaux de la partie aérienne de l'extrait méthanolique, a donné un taux de phénols totaux de 55.15 mg EAG/g d'extrait, ce qui est 10 fois moins que celui obtenu dans notre étude (Oukil et al., 2011).

La concentration des polyphénols totaux pour l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* est de 386.33 µg EAG/mg d'extrait. Cette teneur reste très élevée par rapport à celle trouvée dans d'autres travaux scientifiques. Karray-Bouraoui et al. (2010) ont rapporté que les composés phénoliques contenus dans *M. pulegium* de Tunisie montrent des taux de 20.1 à 56.6 mg EAG/g. Hajlaoui et al. (2009) et Hajlaoui et al. (2015) ont aussi indiqué une quantité de composés phénoliques totaux relativement faible d'une valeur de 37.4 mg EAG/g et 62.06 mg EAG/g d'extrait, respectivement. Aussi l'extrait méthanolique de *M. pulegium* de Bejaia a présenté un taux en phénols totaux de 72.84 mg EAG/g (Khaled-Khodja et al., 2014). Alors que Stagos et al. (2012) ont rapporté que le taux des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* de Grèce était de 138 mg EAG/g.

Des études récentes ont montré que la quantité de polyphénols dans les plantes dépend de facteurs biologiques (génotype, organes et ontogenèse, agents pathogènes...), ainsi que de conditions édaphiques et environnementales (température, salinité, stress hydrique, rayonnement U.V et l'intensité lumineuse). En outre, la solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des composés phénoliques, et leurs interactions (**Macheix, 1996 ; Ksouri et al., 2008**).

A l'issue de ces résultats concernant la caractérisation quantitative, les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium*, à travers leurs teneurs en polyphénols, constituent une source prometteuse en composés bioactifs bénéfiques à la santé humaine.

5-2- Profil chromatographique global en polyphénols (Analyse qualitative) :

Les résultats de l'analyse HPLC/UV des extraits méthanoliques des deux plantes aromatiques *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* sont présentés dans les tableaux 10 et 11, respectivement. Les profils chromatographiques de cette analyse HPLC sont présentés dans l'annexe 2.

Le profil d'élution des composés issus de l'extrait méthanolique a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm dû à la présence du cycle phénolique. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 380 nm, exception faite pour les anthocyanes dont le cycle B présente un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm (**Merken et Beecher, 2000 ; Robbins, 2003**). C'est la raison pour laquelle le chromatogramme a été analysé à la longueur caractéristique de 345 nm.

Comme peut être observé (suivant le nombre de pics sur les chromatogrammes), les extraits méthanoliques sont très riches en composés phénoliques. Ces résultats confirment ceux obtenus lors du dosage par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu.

L'HPLC a permis d'identifier quatorze polyphénols dans l'extrait d'*O. glandulosum* et douze dans l'extrait de *M. pulegium* en moins de 40 minutes.

Ces composés phénoliques relèvent de deux grandes catégories : les acides phénoliques tels que l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide rosmarinique, l'acide férulique, l'acide t-cinnamique, l'acide néochlorogénique et l'acide chlorogénique, et les flavonoïdes comme la rutine, narirutine, hespéridine, myricétine, naringénine, morine dihydrate, quercétine et apigénine.

Tableau 10 : Analyse des polyphénols d'*Origanum glandulosum* par HPLC/UV

Polyphénols détectés à 280 et 345 nm. Profil en % de la réponse chromatographique.			
Nom	Tr (min)	280 nm	345 nm
Acide vanillique *	20,8	0,3	..**
Acide caféique	21,6	0,9	0,8
Acide p-coumarique	24,8	0,8	0,9
Composé inconnu	25,6	4,3	8,3
Acide férulique *	26,1	0,0	0,3
Rutine *	26,5	0,6	0,4
Narirutine	27,3	0,4	0,4
Acide rosmarinique	29,8	36,2	52,8
Morine dihydrate *	31,9	0,3	0,4
Composé inconnu	32,9	22,7	7,5
Acide t-cinnamique *	34,1	0,1	..**
Quercétine	34,4	0,1	0,7
Naringénine	36,4	1,8	0,4
Apigénine	37,8	0,5	1,5

* : la très faible concentration ne permet pas la vérification du spectre UV-visible.
 ** : pas d'absorption à 345 nm.

L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum*, l'acide rosmarinique est largement le composé majoritaire avec un pourcentage de la réponse chromatographique de 36.2% suivi de deux composés inconnus avec des quantités appréciables de 22.7% et 4.3% respectivement. Naringénine (1.8%), acide caféique (0.9%) et acide p-coumarique (0.8%) étaient aussi présents en quantités moindres.

Peu de travaux ont été réalisés sur l'identification des composés polyphénoliques dans les extraits d'*O. glandulosum* par analyse HPLC. D'après l'étude menée par **Oukil et al. (2011)** sur l'extrait méthanolique de cette espèce récoltée dans la région de Boukhelifa à Bejaia, le profil phénolique peut être dans l'ordre suivant : acide férulique > naringénine > acide gallique > acide vanillique > acide coumarique > rutine, ce résultat diffère totalement de ceux obtenus dans notre étude.

Tableau 11 : Analyse des polyphénols de *Mentha pulegium* par HPLC/UV

Polyphénols détectés à 280 et 345 nm. Profil en % de la réponse chromatographique.			
Composé	Temps de rétention en minutes	280 nm	345 nm
Acide néochlorogénique	17,5	0,3	0,2
Acide chlorogénique	20,6	2,8	4,5
Acide caféique	21,6	2,3	2,7
Acide p-coumarique	24,8	1,1	0,9
Composé inconnu	25,5	5,8	11,5
Rutine	26,6	0,6	0,8
Narirutine *	27,5	1,9	0,6
Hespéridine	28,7	10,9	3,8
Acide rosmarinique	29,8	26,4	41,7
Myricétine *	30,3	1,1	0,6
Composé inconnu	32,9	11,0	3,8
Naringénine *	36,4	0,2	1,0

* : la très faible concentration ne permet pas la vérification du spectre UV-visible.

Comme pour l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum*, celui de *M. pulegium* est fortement représenté par l'acide rosmarinique à 26.4% du profil phénolique, suivi d'un composé inconnu présent à un taux non négligeable de 11% et de l'hespéridine à 10.9%. Un deuxième composé inconnu est noté à une teneur de 5.8%, l'acide chlorogénique et l'acide caféique exhibent des taux à 2.8 et 2.3%, respectivement.

Quelques études ont été effectuées pour l'identification des composés polyphénoliques dans les extraits de *Mentha pulegium* l'aide de l'HPLC. Une étude menée par **Hajlaoui et al. (2015)** a démontré que l'extrait méthanolique de *M. pulegium* de Tunisie est constitué majoritairement d'un composé inconnu à 26.18%, acide chlorogénique (23.31%), acide férulique (12.37%), apigénine (8.23%) et acide trans-2- dihydroxycinnamique (4.48%), mais il s'est révélé exempt de l'acide rosmarinique.

L'acide rosmarinique est bien connu, c'est un métabolite secondaire appartenant à la classe des esters de l'acide caféique et de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. D'après la littérature, il est couramment identifié dans les espèces de la famille des Lamiacées, où il est limité à la sous-famille des Nepetoideae (**Litvinenko et al., 1975**). L'acide rosmarinique est un contributeur majeur aux nombreuses propriétés bénéfiques de la menthe et de l'origan (**Exarchou et al., 2002 ; Pizzale et al., 2002**).

6- Etude des activités biologiques :

6-1- Evaluation de l'activité antioxydante :

6-1-1- Test DPPH sur plaque CCM :

Afin de visualiser qualitativement la capacité de piégeage des radicaux libres des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*, on les a soumis à un test sur plaques de CCM en gel de silice. Avec le réactif DPPH comme révélateur, des taches jaunes sont apparues après la pulvérisation de la plaque.

En se basant sur l'intensité de la couleur, l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* avait le pouvoir antioxydant le plus important, suivi de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* dont la tache était aussi intense. L'huile essentielle d'*O. glandulosum* et aussi de *M. pulegium* présentaient de faibles colorations de leurs taches respectives.



Figure 34 : Activité antioxydante sur plaque CCM

L'intensité des taches et la vitesse de leur réaction avec le DPPH étaient différentes, ce qui suggère que les taches peuvent contenir individuellement différentes caractéristiques. Certaines ont une capacité rapide de piégeage des radicaux, réduisant le radical DPPH très rapidement, tandis que d'autres ont une activité antiradicalaire plus lente, prenant plus de temps pour réagir (Choi et al., 2002). Ainsi, on peut en déduire que les extraits méthanoliques des deux plantes étudiées exhibent un pouvoir antioxydant plus important que celui des huiles essentielles, probablement dû à leurs hautes teneurs en composés phénoliques.

6-1-2- Test DPPH mesuré au spectrophotomètre :

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* est évaluée par le test de piégeage du radical DPPH. Il est bien connu que quand une solution de DPPH est mélangée avec celle d'une substance contenant des antioxydants, le radical libre stable DPPH (couleur violet foncé) est converti en 1,1-diphényl-2-picryle hydrazine ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm (Molyneux, 2004).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes du pourcentage d'activité antiradicalaire pour chaque extrait des plantes. D'après les résultats représentés dans la figure 35, on peut constater que l'activité antiradicalaire est dose dépendante car elle est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

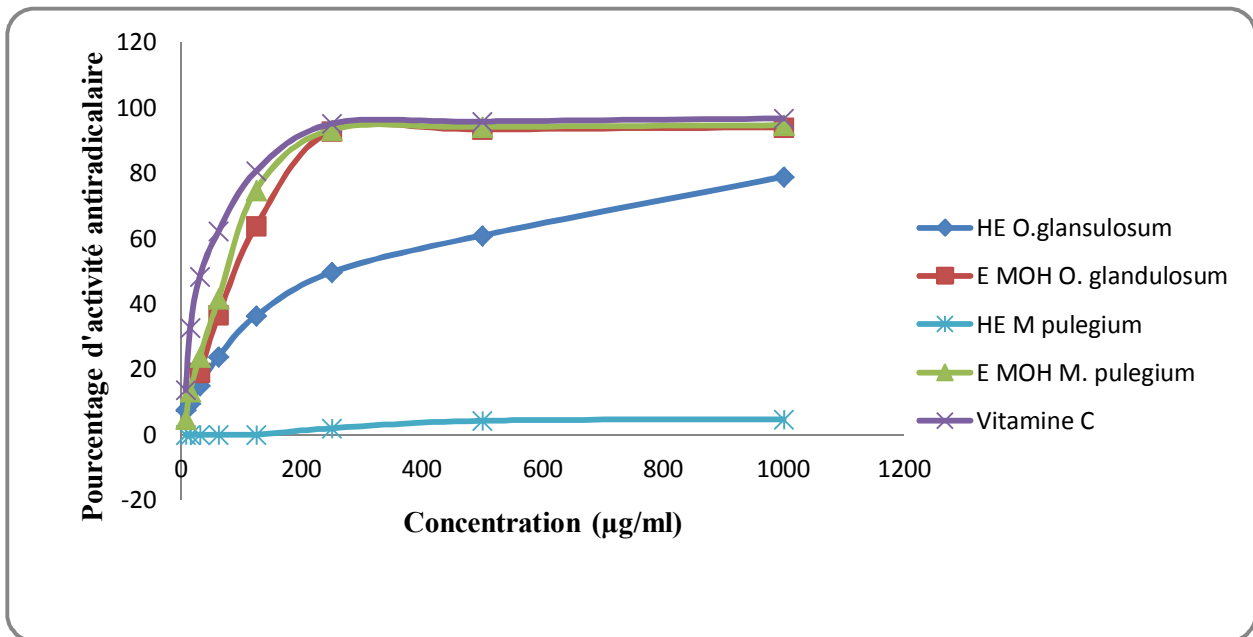


Figure 35 : Pourcentage d'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux plantes

Les extraits méthanoliques ont montré un pourcentage de piégeage du radical DPPH plus important par rapport aux huiles essentielles, ceci est indiqué par l'allure des graphes. Ces derniers tracent une courbe avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire, ceci concorde avec le test sur CCM. A une concentration de 1000 µg/ml d'extrait, les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre de 94,63 % et de 93,97 % pour l'extrait méthanolique de *M. pulegium* et *O. glandulosum*, respectivement, suivi par l'huile essentielle d'*O. glandulosum* avec un pourcentage de 78.8%. Cependant l'huile essentielle de *M. pulegium* s'est révélée presque exempt d'activité antioxydante (4.64%).

La cinétique du pourcentage d'activité antiradicalaire nous a permis de déterminer l'IC₅₀, qui correspond à la concentration d'huile essentielle, d'extrait méthanolique ou d'acide ascorbique nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu. Notant que plus l'IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydante du composé est importante. Les résultats des propriétés antioxydantes des huiles essentielles et des extraits méthanoliques des deux plantes étudiées et de la vitamine C sont présentés dans le tableau 12. L'activité est exprimée sous la forme de valeurs d'IC₅₀ et d'AAI.

Tableau 12 : Activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

	Echantillon	IC ₅₀ (µg/ml)	AAI
<i>Origanum glandulosum</i>	Huile essentielle	461.62	0.17
	Extrait méthanolique	25.59	3.12
<i>Mentha pulegium</i>	Huile essentielle	9258.18	0.008
	Extrait méthanolique	187.37	0.42
	Vitamine C	6.35	12.6

- ***Origanum glandulosum*** :

L'extrait méthanolique d'*Origanum glandulosum* a montré une très forte activité antioxydante sur les radicaux DPPH avec une $IC_{50} = 25.59 \mu\text{g/ml}$ et un AAI (indice de l'activité antioxydante) de 3.12. D'autre part, l'huile essentielle présente une activité antioxydante faible avec un $IC_{50} = 461.62 \mu\text{g/ml}$ et un AAI de 0.17. Cependant, la capacité antioxydante de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle reste moindre par rapport à l'antioxydant synthétique de référence, la vitamine C ($IC_{50} = 6.35 \mu\text{g/ml}$ et AAI = 12.6).

Comparé aux précédents rapports, l'huile essentielle de la sous espèce étudiée, *O. glandulosum*, développe une activité antiradicalaire moindre. Une étude menée par **Sari et al. (2006)** sur différentes populations d'*O. glandulosum* d'Algérie (Sétif, Bejaia, Biskra, M'sila et Bordj Bou Arreridj) a démontré le fort pouvoir antioxydant des huiles essentielles qui ont donné des IC_{50} variant de 16.2 à 26.7 $\mu\text{g/ml}$. Aussi, **Mechergui et al. (2010)** ont enregistré une valeur d' IC_{50} de l'huile essentielle de cette même plante issue de deux régions de Tunisie à 105.29 mg/L et 142.86 mg/L. Cependant une autre étude tunisienne sur l'huile essentielle de cette plante a montré une activité antioxydante similaire à la nôtre puisque l' IC_{50} rapportée s'élève à 625 $\mu\text{g/ml}$ (**Béjaoui et al., 2013a**).

Cette variabilité est due aux impacts des facteurs environnementaux sur la composition chimique des huiles essentielles. En effet, l'étude des propriétés antioxydantes des composants chimiques des huiles essentielles ont montré que les monoterpènes, tel que le gamma-terpinène, ont un effet antioxydant important (**Ruberto et al., 2000**). Cependant, le para-cymène ne montre pas une activité antioxydante appréciable (**Lee et Shibamoto, 2001**).

Le carvacrol et le thymol, les deux principaux monoterpènes phénoliques de l'huile essentielle d'origan, ont été les principaux responsables de son activité antioxydante dans plusieurs travaux (**Baratta et al., 1998 ; Ruberto et Baratta, 2000 ; Milos et al., 2000**). Ceci dit, le thymol a été jugé beaucoup plus antioxydant que le carvacrol et ce fait a été attribué à la position du groupement hydroxyle sur la structure phénolique des deux molécules (**Yanishlieva et al., 1999 ; Dorman et Dean, 2000 ; Baser et Buchbauer, 2010**).

Malgré sa forte teneur en thymol et carvacrol, l'huile essentielle d'*O. glandulosum* est moins efficace que ses principaux composants actifs indiquant de possibles interactions synergiques entre les constituants de l'huile, majeurs et mineurs, qui peuvent atténuer le potentiel antioxydant de cette dernière.

Concernant l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum*, quelques travaux ont pu en déterminer des activités antioxydantes nettement inférieures à la nôtre. **Béjaoui et al. (2013a)** ont pu mettre en évidence une faible activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* issu de Tunisie avec une valeur d'IC₅₀ = 600 µg/ml. Aussi, **Oukil et al. (2011)** ont rapporté une très faible activité antioxydante de l'extrait méthanolique de cette plante de Bejaia avec une IC₅₀ = 6730 µg/ml.

- ***Mentha pulegium* :**

L'extrait méthanolique de *M. pulegium* a montré une capacité antiradicalaire modérée avec une IC₅₀ = 187.37 µg/ml et un AAI de 0.42. D'autre part, l'huile essentielle a présenté une très faible activité antioxydante avec une IC₅₀ = 9258.18 µg/ml et un AAI = 0.008. Tandis que l'antioxydant de référence, la vitamine C, présente un pouvoir antioxydant plus important (IC₅₀ = 6,35 µg/ml et AAI = 12.6).

Des études antérieures ont rapporté une grande variation dans l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *M. pulegium*. **Hajlaoui et al. (2009)** ont rapporté une forte capacité antioxydante de l'huile essentielle (IC₅₀ = 10 µg/ml) et de l'extrait méthanolique (48 µg/ml). Le composé majoritaire de cette huile, le pulégone (61.11%), s'est révélé être un bon antioxydant (**Ruberto et Baratta, 2000**), ceci peut donc expliquer le fort pouvoir antioxydant de cette huile essentielle contrairement à la nôtre où nous avons noté l'absence totale du pulégone.

Le même constat pour l'huile essentielle de *M. pulegium* d'Iran qui s'est avéré posséder une faible capacité antioxydante (IC₅₀ = 14736 µg/ml et AAI = 0.003), alors que son extrait méthanolique est très actif avec un IC₅₀ = 6.1 µg/ml (**Kamkar et al., 2010**).

Aussi, de forts pouvoirs antioxydants de l'extrait ont été rapportés dans plusieurs travaux. **Stagos et al. (2012)**, **Khaled-Khodja et al. (2014)** et **Hajlaoui et al. (2015)** ont noté une valeur d'IC₅₀ de 28 µg/ml, 51 µg/ml et 33.53 µg/ml dans leurs travaux respectifs.

Ces divergences dans la propriété antioxydante de la menthe pouliot peuvent être dues à sa composition. À cet égard, **Duh (1999)** a pu déterminer que la présence et la synergie des différents antioxydants, présents dans un extrait ou une huile essentielle spécifique, détermineront leurs propriétés antioxydantes.

L'inévitable absence d'activité antioxydante de l'huile essentielle de *M. pulegium* étudiée, peut être attribuée à sa composition chimique et en particulier à l'absence de pulégone (un fort antioxydant) et à l'abondance de pipéritone qui ne possède pas un bon pouvoir antioxydant (**Ruberto et Baratta, 2000**).

Globalement, les résultats obtenus par le piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* sont plus actifs que les huiles essentielles et cela est probablement dû à la complexité de la composition des extraits en substances phénoliques y compris les acides phénoliques, les flavonoïdes et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (**Bourgou et al., 2008 ; Malik et al., 2013**).

La forte capacité antioxydante de l'extrait méthanolique d'*O.glandulosum* et de *M. pulegium*, objets de notre étude, peut être attribuée à la présence de composés phénoliques qui représentent 52,67% et 38.63% de l'extrait respectif.

Une forte relation entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante dans les fruits, les légumes, les produits céréaliers et les plantes a été rapportée par plusieurs auteurs (**Mimica-Dukic et al., 1999 ; Dorman et al., 2003 ; Turkmen et al., 2007 ; Montoro et al., 2006 ; Ranilla et al. 2010**).

Les composés phénoliques, composants biologiquement actifs, sont les principaux agents qui peuvent donner de l'hydrogène aux radicaux libres et ainsi briser la réaction en chaîne de l'oxydation des lipides à la première étape de l'initiation (**Oke et al., 2009**). Ce potentiel élevé des composés phénoliques à piéger les radicaux peut être expliqué par la présence des groupes hydroxyle phénoliques (**Sawa et al, 2009**). Néanmoins, il est bien évident que l'activité antioxydante des composés phénoliques dépend essentiellement du nombre et de la position des groupes hydroxyle donneur d'hydrogène sur les cycles aromatiques des molécules phénoliques (**Dziedzic et Hudson, 1983 ; Rice-Evans et al., 1996**).

L'acide rosmarinique, composé majeur de l'extrait méthanolique des deux plantes étudiées, a été identifié comme un puissant antioxydant (**Javanmardi et al., 2002 ; Sroka et al., 2005**), il a même été considéré plus actif que la vitamine E (**Exarchou et al., 2002 ; Zheng et Wang, 2001**). En protégeant les cellules vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène, l'acide rosmarinique augmente leur viabilité et diminue le taux de mort cellulaire due à l'oxydation (**Gao et al., 2005**).

Plusieurs études suggèrent une corrélation directe entre la capacité antioxydante totale et la teneur en acide rosmarinique (**Fletcher et al., 2005 ; Brahmi et al., 2014**).

Comme nos extraits sont riches en d'autres composés phénoliques, les effets synergiques entre les acides phénoliques comme l'acide rosmarinique et les autres polyphénols tels que les flavonoïdes, peuvent également être pris en compte pour l'activité antiradicalaire observée dans ces extraits méthanoliques (**Choi et al., 2002**).

Par ailleurs, **Rodriguez-Rojo et al. (2012)** ont rapporté que l'activité antioxydante est en relation avec le procédé d'extraction et la nature du solvant utilisé. En ce sens, **Kintzios et al., (2010)** ont trouvé que les extraits méthanoliques de quelques plantes médicinales ont des effets piègeurs de radicaux DPPH plus grands que ceux de leurs extraits aqueux. Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante exhibée par les extraits méthanoliques est due à la présence de substances phénoliques telles que l'acide rosmarinique.

6-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Dans la mesure où les huiles essentielles et les extraits méthanoliques vont être soumis aux essais biologiques, l'utilisation d'un solvant approprié est primordiale. Effectivement, la toxicité du solvant vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques peut être critique. Même à l'état de trace le solvant ne devrait pas entraver la procédure du test biologique. Une attention particulière devrait également être accordée aux interactions possibles entre le solvant et les solutés, car le solvant peut réagir avec certains composés de l'huile essentielle ou de l'extrait et causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Pour les huiles essentielles, notre choix s'est porté sur le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le Tween 20, fréquemment utilisés dans les études en microbiologie. Le même solvant est utilisé pour les extraits méthanoliques.

Ces trois solvants ont subi des tests préliminaires dans le but de connaître leur effet vis-à-vis des huiles essentielles, des extraits et des souches microbiennes. Ils se sont avérés sans danger pour les microorganismes et n'interféreront donc pas dans la lecture des résultats et en plus ils n'ont engendré aucune cristallisation ou décomposition de nos extraits.

6-2-1- Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* contre les bactéries testées est expérimentée par la méthode des disques et la méthode de microdullution. Leur potentiel antibactérien est qualitativement et quantitativement évalué par la mesure du diamètre des zones d'inhibition et la détermination des valeurs de CMI.

Rappelons que chaque disque contient 5 µl d'huile essentielle ou d'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* ou de *M. pulegium*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en exposant les souches à diverses concentrations d'huile essentielle.

Les résultats du test de diffusion sur disque ont été appréciés comme suit:

pas sensible (-) de diamètre inférieur ou égal à 8.0 mm,

moyennement sensible (+) pour un diamètre compris entre 8.0 et 14.0 mm,

sensible (++) pour un diamètre compris entre 14.0 et 20.0 mm

et extrêmement sensible (+++) pour un diamètre égal ou supérieur à 20.0 mm (Djabou et al., 2013).

Selon les valeurs de la CMI exprimé en mg/ml, les résultats ont été appréciées comme suit: pas sensible (-) pour une valeur comprise entre 50.0 et 25.0 mg/ml, moyennement sensible (+) pour une valeur comprise entre 12.5 et 3.0 mg/ml, sensible (++) pour une valeur comprise entre 2 et 0.4 mg/ml et extrêmement sensible (+++) pour une valeur égale ou inférieure à 0.2 mg/ml (Djabou et al., 2013).

6-2-1-1- Antibiogramme

Nous avons testé un seul antibiotique (Gentamicine, d'une charge de 10 µg/disque) par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau 13, nous ont permis de classifier les souches selon l'antibiotique. La plupart des souches testées ont montré une sensibilité à la Gentamicine, à l'exception d'*Escherichia coli*.

Tableau 13 : Résultats de l'antibiogramme

Souches testées	Diamètres d'inhibition	Sensible/ Résistante
<i>Acinetobacter baumannii</i>	54	S
<i>Escherichia coli</i>	16	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	30	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	28	S
<i>Proteus mirabilis</i>	31	S
<i>Proteus vulgaris</i>	29	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	33	S
<i>Salmonella thyphimurium</i>	19	S
<i>Serratia marcescens</i>	18	S
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	31	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	S
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	29	S

6-2-1-2- *Origanum glandulosum* :

Les résultats de la méthode des disques et de la microdillution de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* sont regroupés dans le tableau 14. D'après les valeurs enregistrées, l'huile essentielle affiche un grand potentiel antibactérien, alors que l'extrait méthanolique demeure inactif.

Tableau 14 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique d'*Origanum glandulosum* contre les souches bactériennes testées

Souches testées	Huile essentielle				Extrait méthanolique		
	DI ^a	CMI	CMB	CMB/ CMI	DI ^b	DI ^c	CMI
Gram –							
<i>Acinetobacter baumannii</i>	55.33 ± 1.25 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	9	9	-
<i>Escherichia coli</i>	49.66 ± 1.15 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	9	9	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	54.83 ± 1.25 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	8	8	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	59 ± 1.73 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	7	7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46.66 ± 1.52 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.56 ⁽⁺⁺⁾	1.56	1	7	7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	57.16 ± 3.25 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.56 ⁽⁺⁺⁾	3.125	2	8	8	-
<i>Proteus mirabilis</i>	59 ± 2.64 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	9	9	-
<i>Proteus vulgaris</i>	43.66 ± 1.44 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	8	8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.33 ± 1.15 ⁽⁻⁾	-	-	-	8	8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15 ± 1.73 ⁽⁺⁺⁾	6.25 ⁽⁺⁾	6.25	1	7	7	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>	50.25 ± 1.06 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.56 ⁽⁺⁺⁾	1.56	1	7	7	-
<i>Serratia marcescens</i>	47.33 ± 3.21 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.56 ⁽⁺⁺⁾	1.56	1	9	9	-

Gram +								
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	51.83 ± 2.46 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	8	8	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	63.33 ± 3.05 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.56 ⁽⁺⁺⁾	1.56	1	12	6	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	51.83 ± 2.56 ⁽⁺⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	8	8	-	

Note :

DI^a = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 5 µl d'huile essentielle.

DI^b = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 150 µg d'extrait.

DI^c = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 5 µl de méthanol.

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice (mg /ml).

CMB = Concentration Minimale Bactéricide (mg /ml).

Pour les souches Gram négatif, les diamètres d'inhibition (DI) varient entre 43.66 ± 1.44 mm et 59 ± 2.64 mm et entre 0.78 mg/ml et 1.56 mg/ml pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Exception faite pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui est moins sensible (DI = 15 ± 1.73 mm et CMI = 6.25 mg/ml), alors que *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus résistante à l'huile avec un DI = 8.33 ± 1.15 mm.

Les souches Gram positif sont également extrêmement sensibles: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont montré des DI à 51.83 ± 2.46 mm et 51.83 ± 2.56 mm, respectivement ; les valeurs de leurs CMI étaient à 0.78 mg/ml. *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible avec un DI = 63.33 ± 3.05 mm.

Notant que les valeurs de CMB ont été les mêmes que celles des CMI excepté pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 où CMB est égale à 3.125 mg/ml.

Les rapports CMB/CMI indiquent des valeurs inférieures à 4, ce qui prouve que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* exhibe un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes testées.

On peut en déduire que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* est plus active que l'antibiotique de référence (Gentamicine) sur toutes les souches bactériennes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui sont résistantes à cette huile.

Ces résultats sont nettement plus élevés comparés aux précédents rapports sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* de chémotype thymol. **Sari et al. (2006)** ont évalué l'activité antibactérienne de cette huile vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P et *Enterococcus hirae* ATCC 10451. Les résultats ont donné des diamètres d'inhibition allant de 8 à 18 mm. **Bendahou et al. (2008)** et **Bekhechi et al. (2008)** ont également décrit des diamètres d'inhibition variant entre 8-25 mm et 08-26 mm dans leurs travaux respectifs effectués sur une large gamme de bactéries.

Aussi, les travaux de **Béjaoui et al. (2013b)**, sur *O. glandulosum* issu de Tunisie avec une composition en huile essentielle riche en carvacrol, ont démontré une activité antibactérienne moindre, présentant des diamètres d'inhibition entre 16-36 mm sur l'ensemble des souches testées.

La résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à l'huile testée n'est pas surprenante. En effet, cette bactérie possède une résistance aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe (**Mann et al. 2000**). Les résultats obtenus dans notre présent travail quant à cette résistance corroborent plusieurs autres études (**Dorman et Dean, 2000 ; Sari et al., 2006 ; Bendahou et al., 2008 ; Béjaoui et al., 2013b**).

La présence de para-cymène (25.615%), thymol (23.129%) carvacrol (20.321%) et gamma-terpinène (16.612%) comme composants dominants dans l'huile essentielle d'*O. glandulosum* étudiée et le phénomène de synergie potentielle entre eux pourrait être impliqués dans cette grande activité antibactérienne.

Le thymol est structurellement très similaire au carvacrol, ayant le groupe hydroxyle en un emplacement différent sur le noyau phénolique. Les deux substances semblent jouer un rôle synergique en rendant la membrane cellulaire perméable (**Lambert et al., 2001**). Le thymol a été précédemment décrit comme capable d'interrompre la membrane bactérienne, en affectant à la fois le gradient de pH et le flux d'électrons à travers la membrane (**Helander et al., 1998 ; Lambert et al., 2001**). On pense que le carvacrol forme des canaux à travers la membrane en s'intercalant entre les chaînes d'acides gras des phospholipides (**Ultee et al.,**

1999). Cette déstabilisation de la membrane, augmenterait la fluidité membranaire, augmentant à son tour la perméabilité passive (Ultee et al., 2002).

Bien que le para-cymène soit un agent antibactérien inefficace seul, mais combiné avec le carvacrol, il conduit à une activité synergique provoquée par l'augmentation de la perméabilité et la déstabilisation des membranes cellulaires bactériennes à une plus grande mesure que ne le fait le carvacrol. Par ce mécanisme, le para-cymène permet probablement au carvacrol d'être plus facilement transportés à travers la membrane cytoplasmique de sorte qu'un effet synergique est atteint lorsque les deux sont utilisés ensemble (Dorman et Dean, 2000 ; Oke et al, 2009).

6-2-1-3- *Mentha pulegium* :

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* sont présentés dans le tableau 15. Les valeurs obtenues à partir de la méthode de diffusion sur disque et celle de microdilution, indiquent que l'huile essentielle présente une activité antibactérienne modérée sur les germes étudiés comparée avec celle de l'antibiotique. Alors que la totalité des souches bactériennes testées a montré une extrême résistance au 5 µl de l'extrait méthanolique de la menthe pouliot.

Tableau 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* contre les souches bactériennes testées

Souches testées	Huile essentielle				Extrait méthanolique		
	DI ^a	CMI	CMB	CMB/ CMI	DI ^b	DI ^c	CMI
Gram -							
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15.66 ± 2.08 ⁽⁺⁺⁾	3.12 ⁽⁺⁾	3.12	1	11	11	-
<i>Escherichia coli</i>	22.83 ± 3.58 ⁽⁺⁺⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	11	11	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18.66 ± 0.67 ⁽⁺⁺⁾	6.25 ⁽⁺⁾	6.25	1	11	11	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20.66 ± 3.78 ⁽⁺⁺⁺⁾	6.25 ⁽⁺⁾	6.25	1	11	11	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22 ± 3.77 ⁽⁺⁺⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	9	9	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	11.66 ± 1.15 ⁽⁺⁾	25 ⁽⁻⁾	25	1	10	10	-
<i>Proteus mirabilis</i>	13.33 ± 1.15 ⁽⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	9	9	-
<i>Proteus vulgaris</i>	16.66 ± 1.54 ⁽⁺⁺⁾	6.25 ⁽⁺⁾	6.25	1	10	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ⁽⁻⁾	-	-	-	10	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 ⁽⁻⁾	-	-	-	0	0	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>	14.33 ± 1.15 ⁽⁺⁺⁾	0.78 ⁽⁺⁺⁾	0.78	1	10	10	-
<i>Serratia marcescens</i>	20.66 ± 4.50 ⁽⁺⁺⁺⁾	6.25 ⁽⁺⁾	6.25	1	9	9	-
Gram +							
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13.33 ± 1.52 ⁽⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	10	10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 ⁽⁺⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	10	10	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13 ± 1 ⁽⁺⁾	12.5 ⁽⁺⁾	12.5	1	11	11	-

Note :

DI^a = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 5 µl d'huile essentielle.

DI^b = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 150 µg/disque d'extrait.

DI^c = Diamètre d'inhibition (mm) autour du disque (6 mm) imprégné avec 5 µl de méthanol.

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice (mg /ml).

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition et des CMI des souches bactériennes face à l'huile essentielle varient de 8 à 22.83 ± 3.58 mm et 0.78 à 25 mg/ml, respectivement. *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont les bactéries les plus sensibles à l'huile essentielle de *M. pulegium* avec des DI de 22.83 ± 3.58 mm et 22 ± 3.77 mm respectivement, suivi par *Serratia marcescens* (DI = 20.66 ± 4.50 mm) et *Klebsiella oxytoca* (DI = 20.66 ± 3.78 mm). On note qu'*Escherichia coli* est la seule souche bactérienne plus sensible à cette huile essentielle qu'à l'antibiotique de référence. L'huile essentielle exhibe une activité modérée contre *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* et *Staphylococcus aureus*. Les autres souches sont moyennement sensibles à l'huile à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui sont résistantes. Les valeurs des CMB sont équivalentes à celles des CMI.

Les rapports CMB/CMI donnent des valeurs inférieures à 4, ce qui indique que l'huile essentielle de *M. pulegium* exhibe un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes.

Ces résultats sont en accord avec les précédents rapports sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la menthe pouliot. A propos de *Mentha pulegium* d'Iran à chémotype pipéritone/pipéritenone, **Mahboubi et Haghi (2008)** ont noté une bonne activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition et des valeurs de CMI de l'ordre de 8-21 mm et 0.25-4 µl/ml, respectivement, cependant cette huile n'a présenté aucune activité sur *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, contrairement à nos résultats.

Aussi, l'activité antibactérienne des huiles essentielles riche en pulégone a été rapportée. **Hajlaoui et al. (2009)** ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* de Tunisie présentait une grande activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 10 à 31 mm. **Benabdallah (2008)** décrit des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de la menthe pouliot algérienne entre 10 et 22 mm, dont le diamètre le plus important concernait *E. coli*.

Dans l'étude **d'Ait-Ouazzou et al. (2012)**, l'huile essentielle générant des diamètres d'inhibition de 12.6 ± 0.5 mm à 35.6 ± 0.6 mm contre une gamme de bactéries, alors que *Pseudomonas aeruginosa* y était résistante.

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* a été testée sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et contrairement à nos résultats, ces souches y ont été sensibles avec des diamètres d'inhibition de 17.5 ± 0.35 et 15.25 ± 0.35 , respectivement (**Khaled-Khodja et al., 2014**). Néanmoins, nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Hajlaoui et al. (2009)**, où aucune activité antibactérienne n'a été notée pour l'extrait méthanolique de *M. pulegium*.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, elle peut être attribuée à la teneur élevée de l'huile essentielle en un composé oxygéné : le pipéritone (65%). En effet, cette activité concerne toujours les composés majoritaires de l'huile essentielle, impliquant soit une concentration élevée de pipéritone (38%) et les effets synergiques des autres constituants (**Mahboubi et Haghi, 2008**), soit une teneur élevée en pulégone (61.11%) (**Hajlaoui et al., 2009**). Quel que soit le cas, en général, les monoterpènes oxygénés, qui sont nettement plus actifs que les monoterpènes hydrocarbonés (**Carson et Riley, 1995**) sont généralement présents à des concentrations significatives dans les huiles essentielles de *M. pulegium*.

Selon les résultats obtenus, il est possible de conclure que les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* ont un grand spectre d'activité antibactérienne, contrairement aux extraits méthanoliques.

Il est connu dans la littérature que les bactéries Gram-positif sont plus sensibles aux huiles essentielles et extraits végétaux que les bactéries Gram-négatif (**Karaman et al., 2003 ; Şahin et al., 2002**). Cette résistance des bactéries à Gram négatif peut être attribuée à la présence d'une membrane externe entourant la paroi de la cellule, pratiquement imperméable aux composés lipophiles grâce aux charges négatives de surface de son revêtement lipopolysaccharidique. Les bactéries Gram-positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, vu que le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 kDa (**Nikaido et Vaara, 1985; Hogan et Kolter, 2002**). Cependant, les résultats de la présente étude ont montré que les huiles essentielles des plantes étudiées n'ont pas eu une activité antibactérienne sélective sur la base des différences de la paroi cellulaire des microorganismes bactériens.

6-2-2- Activité antifongique :

6-2-2-1- Antifongigramme :

Deux antifongiques du commerce ont été utilisés comme témoins vis-à-vis des champignons testés : le vapcotop et le propinebe. Leurs activités est donné dans le tableau 16, les valeurs étant exprimées en moyennes \pm SD de trois mesures parallèles.

Tableau 16 : Résultats des antifongigrammes

Fongicides	Pourcentage d'inhibition mycélienne	
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
Propinebe	11.11 \pm 0.00	56.11 \pm 3.85
Vapcotop	55.55 \pm 0.00	67.22 \pm 7.69

Les résultats montrent que le Propinebe est moins efficace sur la souche *Fusarium. sp* que le Vapcotop. Cependant, il a donné un pourcentage d'inhibition mycélienne supérieur à 50% sur la souche *Aspergillus* sp. Vapcotop a montré une forte activité antifongique avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50% pour les deux souches fongiques.

6-2-2-2- Cinétique de la croissance mycélienne :

La croissance des deux espèces de champignons au cours des neuf jours en présence de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique à différentes concentrations est représentée dans les figures 36, 37, 38 et 39 pour *O. glandulosum* et les figures 40, 41, 42 et 43 pour *M. pulegium*.

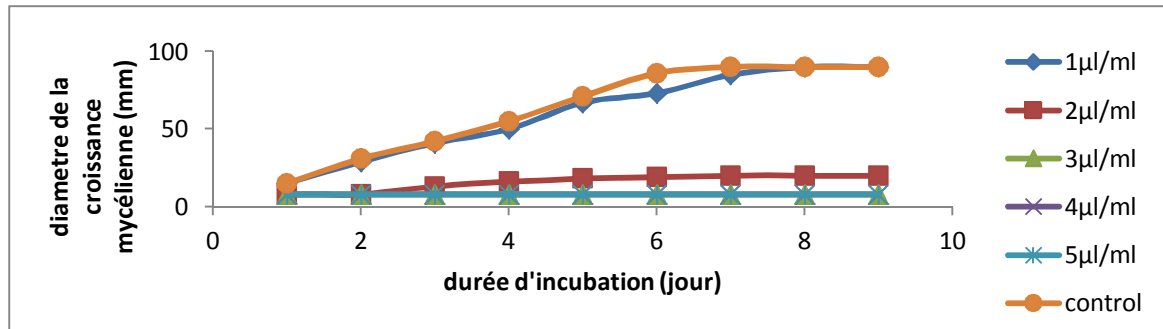


Figure 36 : Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur *Fusarium* sp.

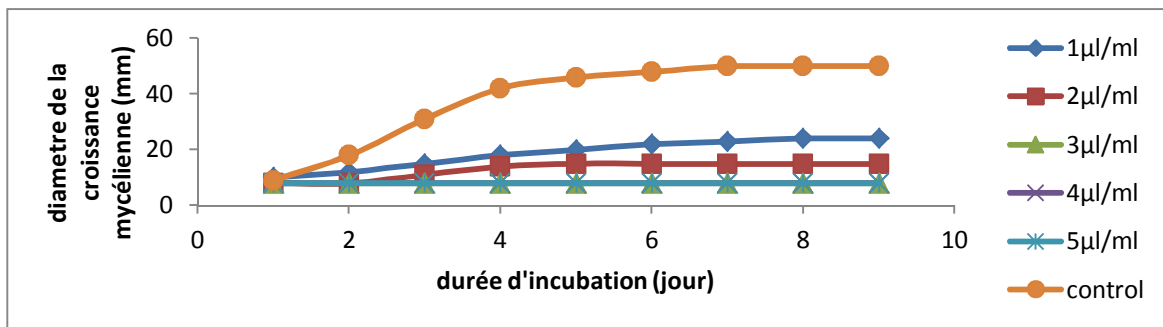


Figure 37 : Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur *Aspergillus* sp.

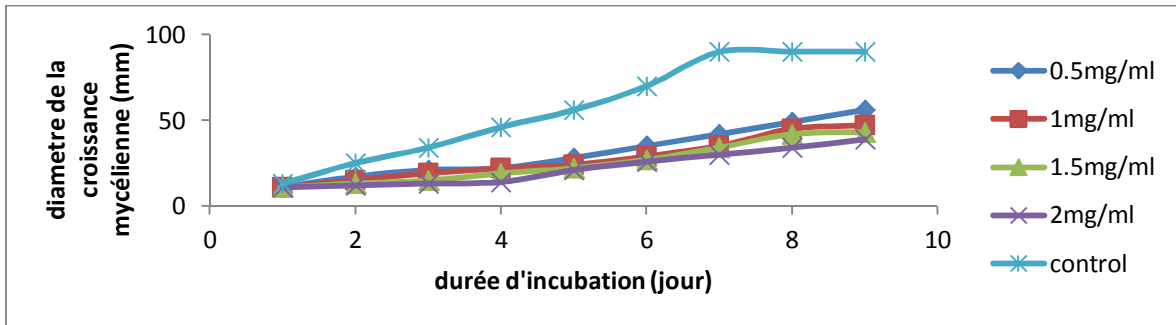


Figure 38 : Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* sur *Fusarium* sp.

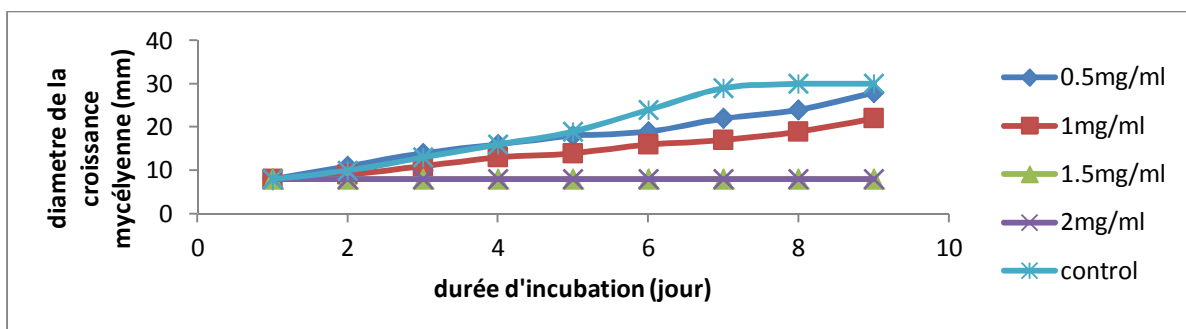


Figure 39 : Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* sur *Aspergillus* sp.

Les résultats des contrôles ont montré que la croissance mycélienne augmente en fonction du temps d'incubation. Cependant, en général, le diamètre des mycéliums diminue considérablement avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles ou des extraits méthanoliques.

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* exhibe un fort pouvoir antifongique sur les souches de *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp. aux concentrations de 3, 4 et 5 $\mu\text{l/ml}$ avec des diamètres de croissance mycéliennes nuls. Alors qu'à la concentration de 2 $\mu\text{l/ml}$, la croissance est retardée de deux jours pour les deux espèces fongiques.

Le résultat obtenu avec l'extrait méthanolique dévoile une activité antifongique importante sur la souche *Aspergillus* sp. aux concentrations de 1.5 mg/ml et 2 mg/ml avec aucune croissance mycélienne. Cependant, *Fusarium* sp. s'est montré plus résistante vu qu'aucune des concentrations testées n'a été apte à éliminer la croissance mycélienne.

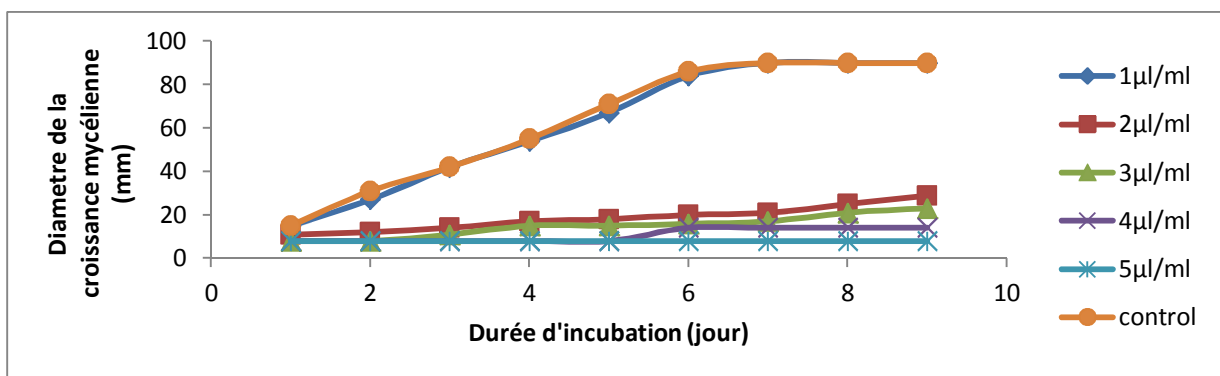


Figure 40 : Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle de *M. pulegium* sur *Fusarium* sp.

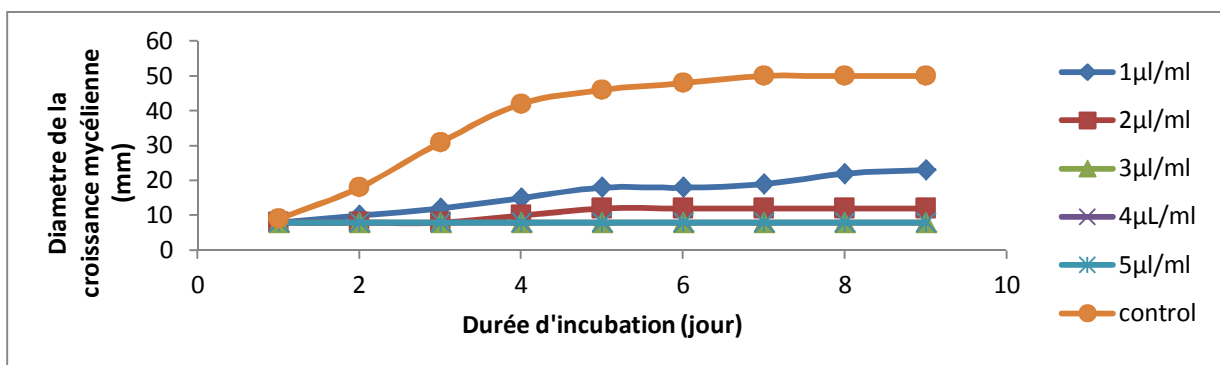


Figure 41 : Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle de *M. pulegium* sur *Aspergillus* sp.

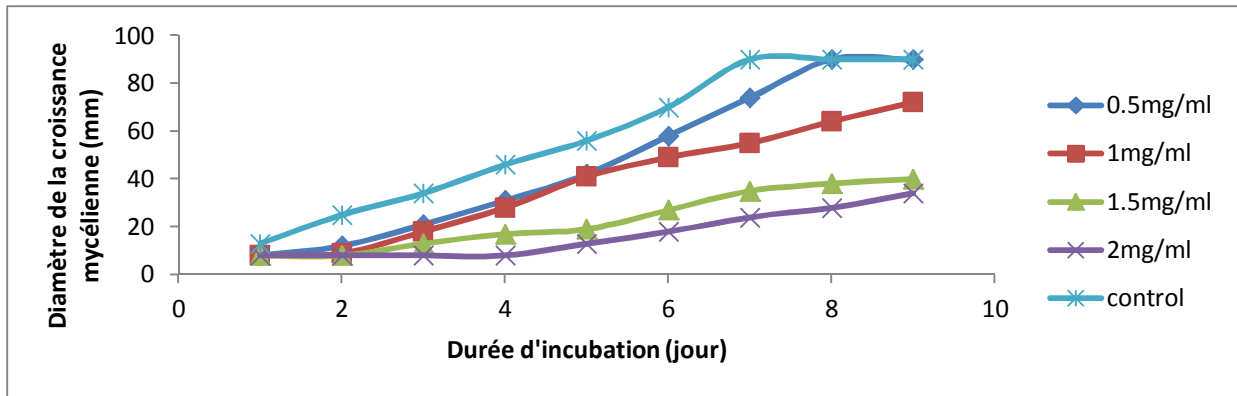


Figure 42 : Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* sur *Fusarium* sp.

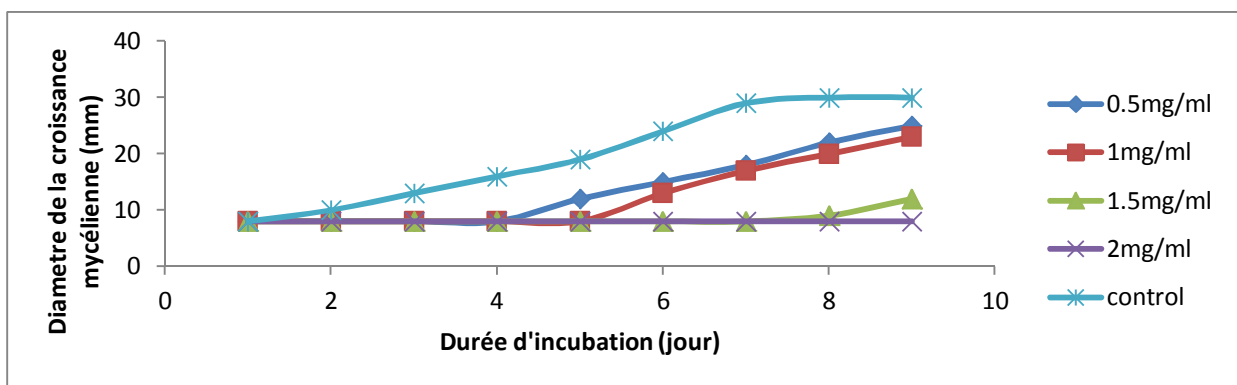


Figure 43 : Effets des différentes concentrations de l'extrait méthanolique *M. pulegium* sur *Aspergillus* sp.

Concernant, l'huile essentielle de *M. pulegium*, on remarque qu'elle retarde la croissance mycélienne la souche *Fusarium* sp. de deux et cinq jours aux concentrations de 3 μ l/ml et 4 μ l/ml, respectivement. Alors qu'à 5 μ l/ml on enregistre aucune croissance mycélienne. Néanmoins, l'huile essentielle s'est avéré plus active contre la souche d'*Aspergillus* sp., où on note aucune croissance mycélienne à partir de 3 μ l/ml, alors qu'elle retarde sa croissance de trois et un jour aux concentrations de 2 μ l/ml et 1 μ l/ml, respectivement.

L'extrait méthanolique de *M. pulegium* n'a pas été actif sur la souche de *Fusarium* sp., on remarque une croissance mycélienne à partir du quatrième et deuxième jour aux concentrations de 2 mg/ml et 1.5 mg/ml. Toutefois l'extrait montre un bon pouvoir antifongique sur la souche *Aspergillus* sp. à la concentration de 2 mg/ml et une légère croissance mycélienne survenue après 7, 5 et 4 jours d'incubation aux concentrations de 1.5 mg/ml, 1 mg/ml et 0.5 mg/ml, respectivement.

6-2-2-3- Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne :

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* testés séparément *in vitro* sur les souches fongiques sélectionnées sont représentés sur les figures 44 et 45. Ces figures enregistrent le pourcentage d'inhibition antifongique noté pour chaque concentration d'huile essentielle ou extrait méthanolique des plantes testées au neuvième jour d'incubation.

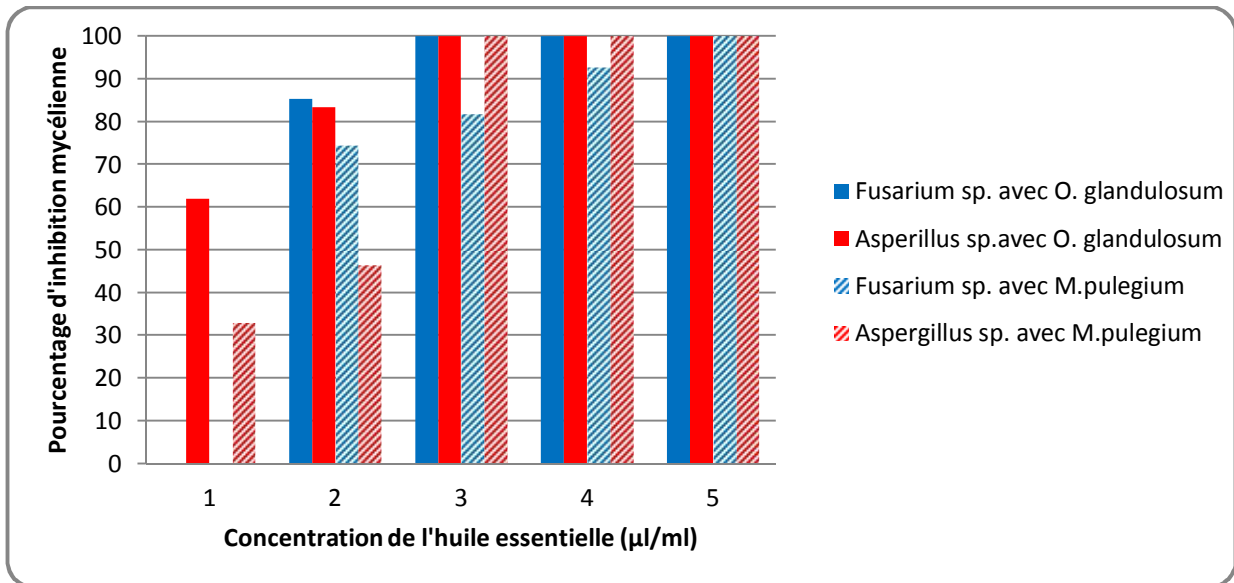


Figure 44 : Analyse comparative des pourcentages d'inhibition des différentes concentrations des deux huiles essentielles sur *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp.

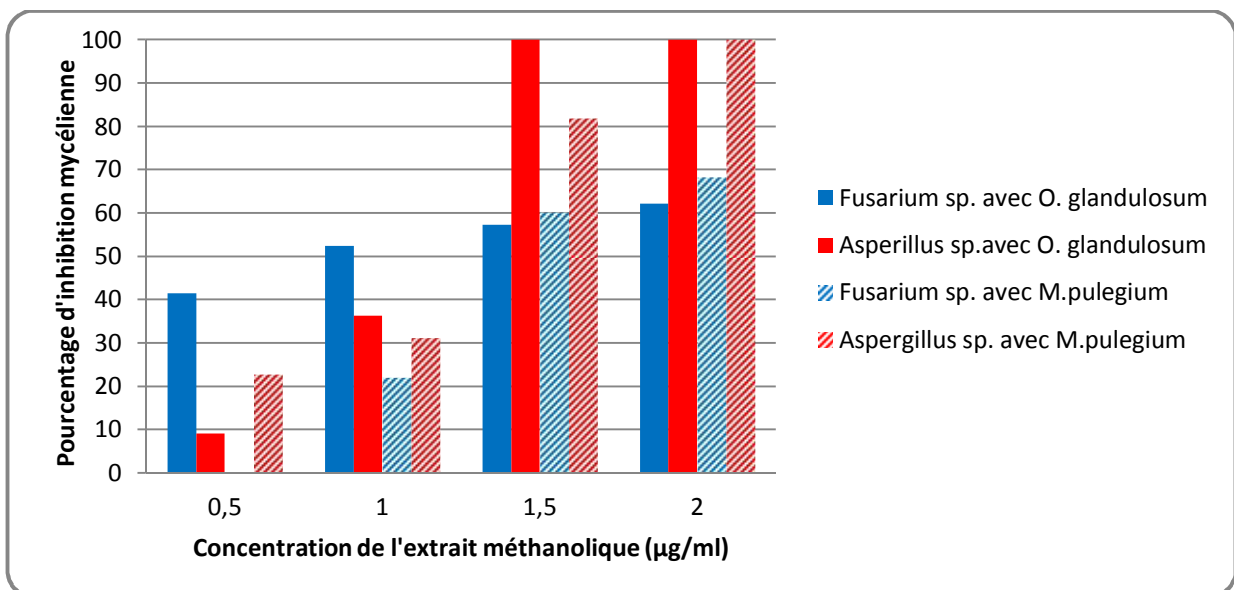


Figure 45 : Analyse comparative des pourcentages d'inhibition des différentes concentrations des deux extraits méthanoliques sur *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp.

Les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et de *M. pulegium* à 1 µl/ml sont inefficaces contre la souche *Fusarium* sp. Celle d'*O. glandulosum* a réduit significativement la croissance des deux souches fongiques à une concentration de 2 µl/ml avec des pourcentages d'inhibition de 85.36% et 83.33% pour *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp., respectivement. La croissance des champignons a été complètement inhibée aux concentrations de 3 µl/ml, 4 µl/ml et 5 µl/ml. On note alors une CMI égale à 3 µl/ml pour l'huile essentielle d'*O. glandulosum* contre les deux souches étudiées.

L'huile essentielle de *M. pulegium* est légèrement moins active. On note un pourcentage d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus* sp. égal à 100 aux concentrations de 3 µl/ml, 4 µl/ml et 5 µl/ml (CMI = 3µl/ml). Aussi, un taux d'inhibition de 100% est observé sur la souche *Fusarium* sp à 5 µl/ml (CMI).

On remarque la diminution du taux d'inhibition des deux souches avec la diminution de la concentration en huile essentielle.

L'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* a montré un fort pouvoir antifongique sur la souche *Aspergillus* sp. avec un pourcentage d'inhibition égal à 100% aux concentration de 2 mg/ml et 1.5 mg/ml, la CMI étant alors égale à 1.5 mg/ml. Cette même valeur du pourcentage d'inhibition est enregistrée pour l'extrait méthanolique de *M. pulegium* à la concentration de 2 mg/ml qui représente donc la CMI. Ce taux diminue considérablement avec la diminution de la concentration des extraits. *Fusarium* sp. a été moins sensible aux extraits avec un maximum d'inhibition de 62.19% et 68.29% pour *O. glandulosum* et *M. pulegium* respectivement.

On peut remarquer que l'huile essentielle et l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* ont été relativement plus actifs que ceux de *M. pulegium* contre les souches fongiques testées, et pour certaines concentrations, il se sont montrés plus actifs que les antifongiques du commerce.

Des études antérieures ont démontré la capacité de l'huile essentielle des différentes espèces d'origan à retarder et inhiber la croissance de diverses souches fongiques d'origine alimentaire y compris les espèces d'*Aspergillus* (Paster et al., 1995 ; Rahbar et al., 2012). Cette huile s'est avéré plus active que celle du romarin, la sauge, le thym et le clou de girofle (Baratta et al., 1998 ; Bouchra et al., 2003 ; Viuda-Martos et al., 2007).

Concernant, la sous espèce étudiée, **Belhattab et al. (2004)** ont rapporté que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* montre un effet inhibiteur sur les levures et moisissures isolées à partir de l'hôpital central de Sétif. L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* sur 2 levures et 4 champignons a aussi été étudiée par **Bendahou et al. (2008)**, les résultats affichent une bonne activité de l'huile avec des diamètres d'inhibition allant de 20 à 34 mm.

L'activité antifongique de l'extrait méthanolique d'*O. glandulosum* est rapportée pour la première fois dans notre présente étude.

L'huile essentielle de *M. pulegium* a été étudiée par **Mahboubi et Hagi (2008)**, et son activité sur *Aspergillus niger* a montré un faible pouvoir antifongique avec une CMI égale à 8 µl/ml. Aussi, **Hajlaoui et al. (2009)** ont révélé que l'huile essentielle des feuilles de cette plante n'avait pas d'effet sur les différentes espèces fongiques testées à la concentration de 1 µl/ml. Même à 100 µl/ml le taux d'inhibition demeure inférieur à 100% (74–90.6%).

Selon la littérature, **Hajlaoui et al. (2009)** ont révélé que l'extrait méthanolique des feuilles de *M. pulegium* n'avait aucune activité sur les différentes espèces fongiques étudiées.

Il semblerait possible que la nature antifongique des huiles essentielles étudiées pourrait être attribuée à la présence de composés phénoliques tels que le para-cymène, le thymol, le carvacrol et le gamma-terpinène pour *O. glandulosum* et pipéritone pour *M. pulegium*. Le carvacrol et le thymol ont été largement étudiés pour leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries, levures et champignons (**Didry et al., 1993 ; Kirimer et al., 1995 ; Knowles et al., 2005**). Une étude a montré que la pipéritone inhibait complètement les souches d'*Aspergillus flavus* à de faibles concentrations (**Cárdenas-Ortega et al., 2005**), alors que **Romagnoli et al. (2005)** n'ont enregistré aucune activité antifongique pour ce composé.

La variabilité dans l'activité antifongique des extraits méthanoliques des deux plantes est peut être due à la différence dans la teneur en polyphénols. L'acide rosmarinique, composant majoritaire des extraits méthanoliques des deux plantes étudiées, est considéré comme un bon antifongique par plusieurs auteurs, et l'activité des extraits pourrait être due à la dominance de ce composé (**Stanojković et al., 2013**).

La présence du groupe hydroxyle sur le thymol, le carvacrol et la pipéritone et son implication dans la dépolarisation membranaire en modifiant ses propriétés physiques et chimiques peut justifier l'activité antimicrobienne remarquable des huiles essentielles étudiées **(Arfa et al., 2006)**.

On suppose que les huiles essentielles peuvent avoir une activité antimicrobienne en influençant des cibles bactériennes et fongiques impliquées dans le métabolisme cytoplasmique et membranaire. Plusieurs études ont montré que ce sont spécialement les monoterpènes qui sont impliqués dans cette activité. En effet, on a montré que le groupe hydroxyle est capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs de la membrane cytoplasmique de la cellule ciblée, modifiant ainsi les propriétés physiques et chimiques de la membrane et affectant à la fois la structure lipidique et la stabilité de la bicouche, ce qui induit une augmentation de la fluidité et de la perméabilité membranaire et ainsi il y'a modification des processus de transport d'ions **(Reichling et al., 2006, Arfa et al., 2006 ; Derwich et al., 2010)**.



Conclusion et perspectives

L'Algérie jouit, de par sa situation géographique, d'une grande variation climatique et de grandes ressources hydriques, ce qui en fait un pays qui regorge d'espèces végétales dotées de pouvoirs thérapeutiques divers.

Dans le présent travail, on a tenté de contribuer à la valorisation de deux plantes aromatiques très utilisées en médecine traditionnelle algérienne pour leurs vertus thérapeutiques en établissant une relation entre leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques.

Origanum glandulosum et *Mentha pulegium* récoltées toutes les deux dans la région de Nechmaya (Guelma) en Juin 2012 ont fait l'objet d'une étude phytochimique, une extraction de leurs huiles essentielles et une réalisation d'extraits méthanoliques ainsi qu'une évaluation de leur potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique.

Le rendement moyen a été de 2.52% et 2.69% pour les huiles essentielles, et de 14.35% et 24.87% pour les extraits méthanoliques d'*O. glandulosum* et *M. pulegium*, respectivement.

Les analyses chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*, par CPG/SM, ont permis d'identifier environ 98.55% des produits volatiles totaux de cette essence dont le paracymène (25.615%), le thymol (23.129%), le carvacrol (20.321%) et le gamma-terpinène (16.612%) sont les composés majoritaires des 43 composés identifiés.

Pour *M. pulegium*, son huile essentielle est constituée de 32 composants présents à 99.58%. La pipéritone constitue le principal composé identifié avec un pourcentage de 65.019% de la totalité de l'huile suivi de sabinène (7.685%), beta-pinène (6.923%) et limonène (5.710%).

Les extraits méthanoliques ont révélé une forte teneur en polyphénols totaux de l'ordre de 52,67% et 38.63% pour *O. glandulosum* et *M. pulegium*, respectivement. L'analyse HPLC/UV, a permis de détecter la dominance de l'acide rosmarinique dans les deux extraits de plantes.

L'ensemble des résultats montre qu'*Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* sont doués d'activités remarquables. En effet, la sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles suggère leur possible utilisation en thérapeutique comme alternative naturelle aux agents chimiothérapeutiques dont le spectre d'action est en réduction continu. De même les huiles essentielles et les extraits des plantes représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antifongiques et antioxydants sont considérées comme alternative importante pour résoudre le problème d'altération post-récolte lié à la croissance mycélienne des phytopathogènes et d'éviter la perte en qualité et en quantité des fruits et légumes pendant l'entreposage.

Il est également noté dans cette étude que ces plantes sont de puissants capteurs de radicaux libres, possédant ainsi diverses propriétés biologiques liées à cette activité antioxydante. Ces sources potentielles d'antioxydants naturels peuvent être exploitées dans des préparations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Cette importante bioactivité des huiles essentielles et des extraits méthanoliques est en relation avec leurs compositions chimiques, riches en substances phénoliques.

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité des extraits étudiés :

- Fractionnement et isolement des différents constituants des huiles essentielles et des extraits méthanoliques, afin de connaître la ou les molécules à l'origine des effets antioxydants, antibactériens et antifongiques et l'éventuelle synergie entre elles.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante *in vivo* sur un modèle biologique.
- Etude de l'efficacité de ces extraits dans le domaine alimentaire afin d'établir leur utilité comme agents antimicrobiens ou antioxydants naturels dans la sécurité alimentaire.
- Utilisation dans la stérilisation de l'atmosphère des hôpitaux ainsi que dans les bibliothèques et les musées pour la conservation des objets de valeurs.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abderrazak M. & Joël R., 2007. La botanique de A à Z. Ed. Dunod, Paris. 177 p.

Adams R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA. 455 p.

Agnihotri V.K., Agarwal S.G., Dhar P.L., Thappa Baleshwar R.K., Kapahi B.K., Saxena R.K. & Qazi G.N., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Frag. J.* **20**: 607–610.

Ait Mbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A. & Ziad A., 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 839-847.

Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. & Conchello P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res. Int.* **45**: 313–319.

Albuquerque C.C., Camara T.R., Marian R.D.R., Willadino L., Marcelino C. & Ulisses C., 2006. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **49**: 527–35.

Allegrini J., Bouchberg M.S. & Maillols H., 1973. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier.* **33**: 73-86.

Ames B.M., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. *Science.* **221**: 1256–1263.

Amič D., Davidović-Amić D., Beslo D. & Trinajstić N., 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta.* **76**: 55-61.

Arfa B.A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N. & Chalier P., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 149–154.

Arvy M.P. & Gallouin F., 2003. Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris. 412 p.

Association française de normalisation (AFNOR), 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ». 2^{ème} éd. Ed AFNOR, Paris.

Association française de normalisation (AFNOR), 2000. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ». Tome 2 : Monographie relative aux huiles essentielles. Ed. AFNOR, Paris.

Astani A., Reichling J. & Schnitzler P., 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother. Res.* **24(5)**: 673–679.

Astani A., Reichling J. & Schnitzler P., 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* Article ID 253643, 8 pages. doi:10.1093/ecam/nep187.

Attou A., 2004. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Thèse de Magister, université Tlemcen, Algérie.

Aziz E.E. & Abbass M.H., 2010. Chemical composition and efficacy of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on vigna radiate seeds. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **8**: 411-419.

Baba Aissa F., 1991. Les plantes médicinales d'Algérie: identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel des plantes communes en Algérie. Ed. Bouchène et Ad. Diwan, Alger. p: 121.

Bachelot C., Blaise A., Corbel T. & Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles : extraction et comparaison. Licence de Biologie, U.C.O. Bretagne Nord, France. pp: 1-18

Bahorun T., 1997. Substances naturelles actives. La flore Mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. pp: 83- 94.

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

Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Biondi D.M. & Ruberto G., 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.* **10**: 618–627.

Barhouchi B., Aouadi S. & Abdi A., 2014. Determination of eugenol and its derivative isoeugenol in *Globularia alypum* using solvent system extraction and comparative study of their antioxidant activities with various oxidation conditions. *J. Chem. Pharm. Res.* **6(12)**:776-784.

Barhouchi B., Aouadi S. & Abdi A., 2016. Essential oil chemical composition of myrtle growing in northeastern Algeria and estimation of its antibacterial effectiveness. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **12(2)**: 110-121.

Barlow S.M., 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: Hudson B.J.F. Food antioxidants. Ed. Elsevier, London. pp: 253-307.

Baser K.H.C. & Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oil: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, Florida, USA.

Beghidja N., Bouslimani N., Benayache F., Benayache S. & Chalchat J.C., 2007. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the east of Algeria. *Chem. Nat. Comp.* **43**: 481-483.

Béjaoui A., Boulila A. & Boussaid M., 2013a. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare subsp. glandulosum Desf.* from Tunisia. *J. Med. Plants Res.* **7**: 2429-2435.

Béjaoui A., Chaabane H., Jemli M., Boulila A. & Boussaid M., 2013b. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare subsp. glandulosum Desf.* at different phenological stages. *J. Med. Food.* **16(12)**: 1115–20

Bekhechi C., 2008. Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN ¹³ C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie.

Bekhechi C., Atik-Bekkara F. & Abdelouahid D.E., 2008. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. **6**: 153–159.

Belaiche P., 1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme. Ed. Maloine, Paris.

Belhattab R., Larous L., Figueiredo C.A., Santos P.A.G., Barroso J.C. & Pedro L.G., 2005. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Frag. J.* **20**: 209-212.

Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Boskou D. & Exarchou V., 2004. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *J. Food Agric. Environ.* **2(1)**: 69–73.

Benabdallah A., 2008. Contribution à l'étude histologique, phytochimique et antimicrobienne d'une plante aromatique et médicinale: *Mentha pulegium* L. Thèse de Magister, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie.

Benayad N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Faculté des Sciences Rabat, Maroc.

Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. & Costa J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* **106**: 132-139.

Bendifallah L., Tchoulak Y., Djouabi M., Oukili M. & Ghezraoui R., 2015. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) in Boumerdes mountainous region (Algeria). *J. Med. Bioeng.* **4(6)**: 471-474

Benjilali B., 2004. Extraction des plantes aromatiques et médicinales, cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. pp: 17-59.

Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-alaoui M. & Ayadi A., 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. **20**: 155-167.

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

Berrehal D., Boudiar T., Hichem L., Khalfallah A., Kabouche A., Al-Freihat A., Ghannadi A., Sajjadi E., Mehrabani M., Safaei-Ghomi J. & Kabouche Z., 2010. Comparative composition of four essential oils of *Oregano* used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Nat. Prod. Commun.* **5**: 957 – 960.

Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle. France.

Billing J. & Sherman P.W., 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *Q. Rev. Biol.* **73**: 3-49.

Binov L., 2001. Oxydants/antioxydants : un équilibre important. **68**: 53-62.

Boizot N. & Charpentier J.P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA*. pp: 79-82.

Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 1021-1043.

Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. & Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan labiate against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 165–169.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. & Marzouk B., 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biol.* **331**: 48–55.

Boyle W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* **66**: 25-28.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Anackov G., Zlatkovic B. & Igie R., 2006. Variability of content and composition of *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) essential oil in different phenophases. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **9(3)**: 223-9.

Brahmi F., Madani K., Stévigny C., Chibane M. & Duez P., 2014. Algerian mint species: high performance thin layer chromatography quantitative determination of rosmarinic acid and *in vitro* inhibitory effects on linoleic acid peroxidation. *J. Coast. Life Med.* **2(12)**: 986–992.

Braithwaite A. & Smith F.J., 1999. Chromatographic methods. 5th ed. Kluwer Academic Publishers, London.

Brand-Williams W., Cuvelier M. & Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28(1)**: 25-30.

Bravo L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56(11)**: 317-333.

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes Médicinales. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Bubonja-Sonje M., Giacometti J. & Abram M., 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem.* **127**: 1821-1827.

Buchanan B.B., Grisse W. & Jones R.L., 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD. p: 1367.

Buchbauer G. & Jirovetz L., 1994. Aromatherapy-use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour Frag. J.* **9**: 217-222.

Burt S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223–253.

- Cakir A., Mavi A., Kazaz C., Yildirim A. & Küfreviöglu O.I., 2006.** Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium orientale L. var. orientale*. *Turk. J. Chem.* **30**: 483–494.
- Cano N., Barnoud D., Schneider S., Vasson M.P., Hasselmann M. & Leverve X., 2007.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 3^{ème} Edition. Ed. Springer Verlag, Paris.
- Cantino P.D., 1998.** Binomials, hyphenated uninominals, and phylogenetic nomenclature. *Taxon.* **47**: 425–429.
- Capo M., Courilleau-Haverlant V. & Valette C., 1990.** Chimie des couleurs et des odeurs. Culture et techniques, Nantes. 204 p.
- Cárdenas-Ortega N.C., Zavala-Sánchez M.A., Aguirre-Rivera J.R., Pérez-Gonzalez C. & Pérez-utiérrez S., 2005.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactiniamexicana* Gray. *J. Agric. Food Chem.* **3**: 4347–4349.
- Carson C.F. & Riley T.V., 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Food Microbiol.* **78**: 264–269.
- Carson C.F., Mee B.J. & Riley T.V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1914-1920.
- Chalchat J.C. & Pasquier B., 1998.** Morphological and chemical studies of *Origanum* clones: *Origanum vulgare L. ssp vulgare*. *J. Essent. Oil Res.* **10**: 119-125.
- Chalchat J.C., Gorunovic M.S., Maksimovic Z.A. & Petrovic S.D., 2000.** Essential oil of wild growing *Mentha pulegium L.* from Yugoslavia. *J. Essent. Oil Res.* **12**: 598–600.
- Chang C.L., Wang G.J., Zhang L.J., Tsai W.J., Chen R.Y., Wua Y.C. & Kuo Y.H., 2009.** Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquesetinervius*. *Phytochemistry.* **10**: 1–9.
- Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L. & Zhao J.W., 2008.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* **448 (2)**: 175- 179.

Cheng S.S., Liu J.Y., Chang E.H. & Chang S.T., 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresour. Technol.* **99(11)**: 5145-5149.

Chidouh A., Aouadi S. & Heyraud A., 2014. Extraction, fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. *Food Hydrocolloids.* **35**: 733-739.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H. & Kim S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **163**: 1161-1168.

Ciulei J., 1982. Methodology for analysis of vegetable drugs. Practical manuals on industrial utilization of medicinal and aromatic plants. Ed. Ministry of Chemical Industry, Bucharest, Romania.

Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CASFM), 2012. Recommandations 2012, Paris, France.

Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. & Palmas F., 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* **29(2)**: 103-105.

Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12(4)**: 564- 582.

Crozier A., Clifford M.N. & Ashihara H., 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Ed. Blackwell Publishing Ltd, UK.

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

Daglia M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23(2)**: 174-181.

Dai J. & Mumper R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**: 7313–7352.

Dayal B. & Purohit R.M., 1971. Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *flavour ind.* **2**: 484-485.

De Billerbeck V.G., 2002. Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air, In : Contamination biologique des biens culturels : causes, prévention et traitements. Elsevier, Paris. pp: 345-358.

De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E. & Senatore F., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare L. ssp hirtum (Link) Ietswaart* growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules.* **14**: 2735-2746.

De Sousa A.C., Alviano D.S., Blank A.F., Alves P.B., Alviano C.S. & Gattass C.R., 2004. *Melissa officinalis L.* essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 677-681.

Delattre J., Beaudeau J.L. & Bonnefont-Rousselot D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 87-108.

Delattre J., Durand G. & Jardillier J.C., 2003. Biochimie pathologique aspects moléculaires et cellulaires. 2^{ème} édition. Ed. Médecine-science Flammarion, Paris.

Delille L., 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger. 240 p.

Derwich E., Benziane Z. & Taouil R., 2010. GC/MS analysis of volatile compounds of the essential oil of the leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco. *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara).* **55(69)**: 103-106.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. & Capasso F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65 (4)**: 337-53.

Diaz-Maroto M.C., Castillo N., Castro-Vazquez L., Gonzalez-Vinas M.A. & Perez-Coello M.S., 2007. Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) plants. *Flavour Frag. J.* **22**: 114-118.

Didry N., Dubreuil L. & Pinkas M., 1993. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie.* **48**: 301-304.

Dixon R.A., Dey P.M. & Lamb C.J., 1983. Phytoalexins: Enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **55**: 1-136.

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

Dorman H.J.D. & Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308–316.

Dorman H.J.D., Kosar M., Kahlos K., Holm Y. & Hiltunen R., 2003. Anti-oxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4563–4569.

Drugeon H.B., Le Gallou F. & Caillon J., 1990. Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. In: Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P. & Goldstein F. Bactéricidie, Aspects théoriques et thérapeutiques. Ed. Maloine, Paris.

Dubois G.E., Grosbay G.A. & Saffron P., 1977. Non-nutritive sweeteners: Taste-structure relationships for some new simple dihydrochalcones. *Science.* **195**: 397-399.

Dubois J., Mitterand H., & Dautzat A., 2005. Grand dictionnaire étymologique et historique du français, Larousse, Paris.

Duh P.D., 1999. Antioxidant activity of water extract of four Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) varieties in soybean oil emulsion. *Food Chem.* **66**: 471–476.

Dziedzic S.Z. & Hudson B.J.F., 1983. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible foods. *Food Chem.* **12**: 205–212.

Ece A., Gürkan F., Celik F., Boşnak M., Yel S., Balik H. & Erel O., 2007. Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clin. Biochem.* **40(9-10)**: 634-639.

El Gharras H., 2009. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44(12)**: 2512-2518.

El Kalamouni C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Toulouse, France.

Erdogan O.I, Belhatab R., 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind. Crop. Prod.* **32**: 566–71.

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

Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A. & Boskou D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *J. Agr. Food Chem.* **50(19)**: 5294–5299.

Favier A., 2003. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique.* 108-115.

Favier A., 2006. Oxidative stress in human disease. *Ann. Biol. Clin.* **64(6)**: 390-396.

Figueredo G., 2007. Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat, Université Clermont-Ferrand, France.

Figueredo G., Cabassu P., Chalchat J.C. & Pasquier B., 2006. Studies of Mediterranean oregano populations. VIII– chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. *Flavour Frag. J.* **21**: 134–139.

Fletcher R.S., Slimmon T., McAuley C.Y. & Kott L.S., 2005. Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata L.*). *J. Sci. Food Agric.* **85**: 2429 – 2436.

France-Ida J., 1996. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles.* **3**: 5-6.

Gao L.P., Wei H.L., Zhao H.S., Xiao S.Y. & Zheng R.L., 2005. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie.* **60**: 62 – 65.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. & Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

Garnier J.P., Le Moel G. & Beaudeau J.L., 2005. Actualité en pharmacie et biologie. 13^{ème} Série. Ed. John Libbey Eurotext, Paris.

Gauche E., Hausswirth C., 2006. Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Sci. Mot.* **58**: 43-66.

Gee J.M. & Johnson I.T., 2001. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr. Med. Chem.* **8**: 1-182.

Ghestem A., Seguin E., Paris M. & Orecchioni A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2 : Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Gibbons S., 2008. Phytochemicals for bacterial resistance - Strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* **74**: 594-602.

Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A. & Fernandez-Gutierrez A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 1220-1234.

Gong H.Y., Liu W.H., GY L.V. & Zhou X., 2014. Analysis of essential oils from *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Rev. Bras. Farmacogn.* **24**: 25-32.

Grigonis D., Venskutonis P.R., Sivik B., Sandahl M. & Eskilsson C.S., 2005. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *J. Supercrit. Fluids.* **33(3)**: 223-233.

Guba R., 2001. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *Int. J. Aromather.* **11**: 76-83.

Guerin-Fauble V. & Carret G., 1999. L'antibiogramme, principes, méthodologies, intérêts et limites. Journées nationales GTV-INRA, Nantes, France. pp: 5-12.

Guignard J.L., & Dupont F., 2004. Botanique : Systématique moléculaire, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.

Guignard J.L., 1996. Abrégés en botanique. 10 ème éd. Ed. Masson, Paris. 278 p.

Guinoiseau E., 2010. Molécules antibactérienne issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, université de Corse, France.

Gulluce M., Şahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. & Ozkan H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem.* **103**: 1449–1456.

Hajlaoui H., Mighri H., Hamdaui G. & Aouni M., 2015. Antioxidant activities and RP-HPLC identification of polyphenols in the methanolic extract of *Mentha* genus. *Tunisian J. Med. Plants Nat. Prod.* **14**: 1-11.

Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., & Bakhrouf A., 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 2227–2238.

Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86(6)**: 985-990.

Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K. & Kinoshita T., 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry.* **48**: 125-129.

Harborne J.B. & Williams C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55**: 481-504.

Harborne J.B., 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne J.B. Methods in plant biochemistry, Volume 1: Plant Phenolics. Ed. Academic Press, London.

Heimeur N., Idrissi Hassani L.M., Amine Serghini M., 2004. Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Rev. Biol. Biotechnol.* **3(1)**: 37-42.

Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Leon G.M.G. & Atte V.W., 1998. Characterization of the action of selected essential oils on gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3590-3595.

Hilliard J.J., Krause H.M., Bernstein J.I., Fernandez J.A., Nguyen V., Ohemeng K.A. & Barrett J.F., 1995. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **390**: 59-69.

Hirata T., Fujii M., Akita K., Yanaka N., Ogawa K., Kuroyanagi M. & Hongo D., 2009. Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorgan. Med. Chem.* **17**: 25–28.

Hogan D. & Kolter R., 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 272–4.

Ietswaart J.H., 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). PhD Thesis. Leiden Botanical Series, vol. 4. Leiden University Press, The Hague, Netherlands.

Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruangrunsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H. & Furukawa H., 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry.* **66**: 567–572.

Jahandiez E. & Marie R., 1934. Catalogues des plantes du Maroc, spermatophytes et ptéridophytes. Tome III. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

Javanmardi J., Khalighi A., Kashi A., Bais H.P. & Vivanco J.M., 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J. Agr. Food Chem.* **50**: 5878–5883.

Jones J.D.G. & Dangel J.L., 2006. The plant immune system. *Nature.* **444**: 323-329.

Joubert T.L, Chambon P. & Gattefosse M., 1958. Détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des essences pures et mélanges. *Bull. Tech. Gatte.* **5**: 7-16.

Kamkar A., Javan A.J., Asadi F. & Kamalinejad M., 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1796–1800.

- Karaman I., Şahin F., Gulluce M., Öğütçü H., Şengül M. & Adıgüzel A., 2003.** Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J. Ethnopharmacol.* **85**: 231–235.
- Karray-Bouraoui N., Ksouri R., Falleh H., Rabhi M., Abdul Jaleel C., Grignon C. & Lachaal M., 2010.** Effects of environment and development stage on phenolic content and antioxidant activities of *Mentha pulegium* L. *J. Food Biochem.* **34**: 79–89.
- Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L. & Madani K., 2014.** Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Ind. Crop. Prod.* **61**: 41–48.
- Khalfi O., Sahraoui N., Bentahar F. & Boutekedjiret C., 2008.** Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil from Algeria. *J. Agr. Food Chem.* **88**: 1562–1566.
- Khan M.T.H., Ather A., Thompson K.D. & Gambari R., 2005.** Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antivir Res.* **67(2)**: 107-119.
- Kim J., Marshall M.R. & Vei C., 1995.** Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *J. Agr. Food Chem.* **43**: 2839-2845.
- Kintzios S., Papageorgiou K., Yiakoumettis I., Baricevic D. & Kusar A., 2010.** Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**: 773-776.
- Kintzios S.E., 2002.** Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E. *Oregano – The Genera Origanum and Lippia*. Ed. Taylor & Francis, London. pp: 3–8.
- Kirimer N., Baser K.H.C. & Tumen G., 1995.** Carvacrol rich plants in Turkey. *Chem. Nat. Comp.* **31**: 37-41.
- Knowles J.R., Roller S., Murray D.B. & Naidu A.S., 2005.** Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*, Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 797-803.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J. & Collins J.J., 2010.** How antibiotics kill bacteria. *Microbiol.* **8**: 423 – 435.

Kokkini S., Hanlidou E., Karousou R. & Lanaras T., 2004. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *J. Essent. Oil Res.* **16**: 588-593.

Kotan R., Cakir A., Dadasoglu F., Aydin T., Cakmakci R., Ozer H., Kordali S., Mete E. & Dikbas N., 2010. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 145–160.

Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. & Abdelly C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 244-249.

Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A. & Abdelly C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.* **331**: 865–873.

Kula J., Majda T., Stoyanova A. & Georgiev V., 2007. Chemical composition of *Origanum vulgare* L. essential oil from Bulgaria. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **10**: 215-220.

Labiod R., Aouadi S. & Bouhaddouda N., 2015a. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7(7)**: 208-211.

Labiod R., Aouadi S. & Bouhaddouda N., 2015b. Chemical composition of the essential oil extracted from the aerial parts of sage (*Salvia officinalis* collected from north east of Algeria. *Saudi J. Med. Pharm. Sci.* **1(3)**: 83-86.

Laguerre M., Lecomte J. & Villeneuve P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **46**: 244-282.

Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., & Carde J .P., 1994. Biogénèse des monoterpènes, I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* **133**: 69-78.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 453–462.

Laouer H., 2004. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Farhat Abbes, Sétif, Algérie.

Lawrence B.M., 1998. Progress in essential oils. *Perfum. flav.* **23**: 63-68.

Le K., Chiu F. & Ng K., 2007. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem.* **105**: 353-363.

Lee K.G. & Shibamoto T., 2001. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *J. Sci. Food Agr.* **81**: 1573-1597.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. & Lee C.Y., 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.

Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. & Prost M., 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *Presse med.* **30(21)**: 1076-1081.

Leonard E., Yan Y., Koffas M.A., 2008. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **8**: 172-181.

Leong L.P. & Shui G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* **76**: 69-75.

Leopoldini M., Russo N. & Toscano M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **125(2)**: 288-306.

Lewis K., 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 247-254.

Lis-Balchin M., Buchbauer G., Hirtenlehner T. & Resch M., 1998. Antimicrobial Activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* **27(4)** : 207-210.

- Litvinenko V.I., Popova T.P., Simonjan A.V., Zoz I.G. & Sokolov V.S., 1975.** Tannins and derivatives of hydroxycinnamic acid in Labiatae. *Planta Med.* **27**: 372–380.
- Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., & Cañigüeral S., 2002.** Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Techn.* **45(4)**: 519–524.
- Lukas B., Schmiderer C. & Novak J., 2013.** Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* (Lamiaceae) From Austria. *Biochem. Syst. Ecol.* **50**: 106-113.
- Luque de Castro M.D., Jiménez C.M.M. & Fernández P., 1999.** Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trend. Anal. Chem.* **18(11)**: 708-716.
- Lutge U., Kluge M. & Bauer G., 2002.** Botanique 3 ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier, Paris. 211p.
- Macheix J.J., 1996.** Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Acta bot. Gallica.* **143 (6)**: 473-479.
- Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, Collection Biologie, Lausanne. pp: 4-5, 192.
- Mahboubi M. & Haggi G., 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **119**: 325–327.
- Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A. & Hay A.J., 1993.** Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* **46(7)**: 1257-1271.
- Mahmoudi Y., 1990.** La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Ed. Palais du livre, Blida. 150 p.
- Malik B., Sharma N.R. & Soni G., 2013.** Influence of agro-climatic conditions on antioxidant potential of *Mentha* species. *J. Pharm. Res.* **7(5)**: 427-432.
- Manach C., Mazur A. & Scalbert A., 2005.** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**: 1–8.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. & Jimenez L., 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79(5)**: 727-747.

Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 294-297.

Mechergui K., Coelho J.A., Serra M.C., Lamine S.B., Boukhchina S. & Khouja M.L., 2010. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp *glandulosum* (Desf.) letsvaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agr.* **90**: 1745-1749.

Merken H.M. & Beecher G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agr. Food Chem.* **48(3)**: 577-599.

Michel F., Bonnefont Rousselot D., Mas E., Draï J. & Thérond P., 2008. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects. *Ann Biol Clin.* **66(6)** : 605-620.

Middleton E., Kandaswami C. & Theoharides T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**: 673-839.

Miguel M.G., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules.* **15**: 9252-9287.

Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat, Strasbourg, France

Milos M., Mastelic J., Jerkovic I., & Katalinic V., 2000. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) grown wild in Croatia. *Riv. Ital. Eppos.* 617–624.

Mimica-Dukic N., Popovic M., Jakovljevic V., Szabo A. & Gasic O., 1999. Pharmacological studies of *Mentha longifolia* phenolic extracts. II. Hepatoprotective activity. *Pharm. Biol.* **37(3)**: 221–224.

Mkaddem M., Bousaid M. & Ben Fadhel N., 2007. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium*L. (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.* **19**: 211–214.

Mockute D., Bernotiene G. & Judzentiene A., 2001. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry*. **57**: 65-69.

Möller K., 2008. La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Ed. UNICO, Paris.

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

Mompon B., Lemaire B., Mengal P. & Surbled M., 1998. Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris.

Montoro P., Tuberoso C.I.G, Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P. & Pizza C., 2006. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 1614–1619.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. & Carlos Parajo J., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **72(2)**: 145-171.

Muanda F.N, 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, université Paul Verlaine, Metz. France.

Müller-Riebau F.J., Berger B.M., Yegen O. & Cakir C., 1997. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 4821–4825.

Mulvihill E.E. & Huff M.W., 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can. J. Cardiol.* **26**: 17-21.

Naczk M. & Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.* **1054**: 95-111.

Newman D.J., Cragg G.M. & Snader K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *J. Nat. Prod.* **66**: 1022 – 37.

Nikaido H. & Vaara M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**: 1–32.

O’Kennedy R. & Thornes R.D., 1997. Coumarins: biology, applications and mode of action. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York.

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

Oukil N., Bedjou F., Maiza-Benabdesselam F. & Chibane M., 2011. Antioxidant activity and separation of phenolic compounds of *Origanum glandulosum* from north Algeria by high performance liquid chromatography (HPLC). *Afr. J. Biotechnol.* **10(17)**: 3451-3454.

Paré J., 1997. Procédé assisté par micro-ondes. *Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles.* **4**: 4.

Paris M. & Hurabielle M., 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies. Ed. Masson, Paris.

Paster N., Menasherov M., Ravid U. & Juven B., 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking store grain. *J. Food Protect.* **58**: 81–85.

Peiwu L., Hopia A., Jari S., Yrjonen T. & Vuorela H., 1999. TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. In: Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Pelt J.M., 2001. Les nouveaux actifs naturels. Ed. Marabout, Paris. pp: 219-124.

Penchev P.I., 2010. Étude des procédés d’extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Petrakis E.A., Kimbaris A.C., Pappas C.S., Tarantilis P.A. & Polissiou M.G., 2009. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 10044–10048.

Petti S. & Scully C., 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. dent.* **37**: 413-423.

Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat ès science. EPFL, Lausanne, Suisse.

Pino J.A., Rosado A. & Fuentes V., 1996. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium L.* from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* **8**: 295-296.

Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Uberegge E. & Conte L., 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agr.* **82**: 1645–1651.

Platzer N., 2002. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.

Pradeau D. & Cohen Y., 1992. L'analyse pratique du médicament, Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 418-428.

Prakash B., Singh P., Kedia A. & Dubey N.K., 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Res. Int.* **49**: 201–208.

Prieur C., Rigaud J., Cheynier V. & Moutounet M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry.* **36(3)**: 781-784.

Proestos C., Sereli D. & Komaitis M., 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **95**: 44-52.

Quézel P. & Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

Quézel P. & Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. & Pouységou L., 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50(3)**: 586-621.

Rahal S., 2004. Chimie des produits naturels et des êtres vivants. Ed. O.P.U. p: 162.

- Rahbar N., Shafaghat A. & Salimi F., 2012.** Antimicrobial activity and constituents of the hexane extracts from leaf and stem of *Origanum vulgare L. ssp. Viride (Boiss.) Hayek.* growing wild in Northwest Iran. *J. Med. Plants Res.* **6(13):** 2681-2685.
- Rai M. K., Acharya D. & Wadegaonkar P., 2003.** Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, in: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects.* Haworth press , New York. p: 51.
- Rana B.K., Singh U.P. & Taneja V., 1997.** Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos.* *J. Ethnopharmacol.* **57:** 29–34.
- Ranilla L.G., Kwon Y. I., Apostolidis E. & Shetty K., 2010.** Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technol.* **101:** 4676-4689.
- Reichl F.X., Benecke J., Benecke M., Eckert K.G., Erber B., Golly I.C., Kreppel H., Liebl B., Muckter H., Szinicz L. & Zilker T., 2004.** Guide pratique de toxicologie. 1^{ère} éd. Ed. De Boeck Université, Bruxelles.
- Reichling J., Suschke U., Schneele J. & Geiss H.K., 2006.** Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components-structure-activity relationship. *Nat. Prod. Commun.* **1:** 1003-1012.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* **20(7):** 933-956.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwer P.G., Bramley P.M. & Ridham J.B., 1995.** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* **22:** 375-383.
- Rim I.S. & Jee C.H., 2006.** Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol.* **44:** 133–138.
- Robbins R.J., 2003.** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agr. Food Chem.* **51(10):** 2866-2887.

- Rock E., 2003.** Stress oxydant, micronutriments et santé. INRA – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments, Université d'été de nutrition Clermont-Ferrand, France. pp: 37-42.
- Rodriguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D. & Cocero M.J., 2012.** Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* **109**: 98-103.
- Romagnoli C., Bruni R., Andreotti E., Rai M.K., Vicentini C.B. & Mares D., 2005.** Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula L. Protoplasma.* **225**: 57–65.
- Ruberto G. & Baratta M.T., 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* **69**: 167–174.
- Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. & Kaabexhe M., 2002.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum Desf. Flavour Frag. J.* **17**: 251–254.
- Şahin F., Gulluce M., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., Agar G. & Ozer H., 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* **15**: 549–557.
- Şahin F., Karaman I., Gulluce M., Ögütçü H., Şengül M., Adıgüzel A., Öztürk S. & Kotan R., 2002.** Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis L. J Ethnopharmacol.* **87**: 61–65.
- Sahraoui N., Bentahar F. & Boutekedjiret C., 2007.** Analytic study of the essential oil of *Origanum glandulosum (Desf.)* from Algeria. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **10(2)**: 145 – 150.
- Salzer U.J., 1977.** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings- a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**: 345-373
- Sari M., Biondi D.M., Kaabeche M., Mandalari G., Manuela D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C. & Ruberto G., 2006.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum Desf. Flavour Frag. J.* **21**: 890–898.

Sarikurkcu C., Eryigit F., Cengiz M., Tepe B., Cakir A. & Mete E., 2012. Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium L.* from Turkey. *Spectrosc. Lett.* **45**: 352-358.

Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono L. & Maeda H., 1999. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *J. Agr. Food Chem.* **47**: 397–402.

Scalbert A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* **30**: 3875-3883.

Scalbert A., Manach C., Morand C. & Rémésy C., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**: 287–306.

Scheffer J.J.C., 1997. Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.* **10**: 6-7.

Scherer R. & Godoy H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* **112**: 654–658.

Semra I., Benmerache A., Chibani S., Kabouche A., Abuhamdah S. & Kabouche Z., 2013. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Origanum glandulosum Desf.* from Algeria. *Der Pharmacia Lettre.* **5(3)**: 381-385

Serrano M., Martinez-Romero D., Guillen F., Valverde J. M., Zapata P.J., Castillo S. & Valero D., 2008. The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends Food Sci. Tech.* **19**: 464- 471.

Sharififar F., Dehghn-Nudeh G. & Mirtajaldini M., 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium L.* *Food Chem.* **112**: 885–888.

Sharma A., Gupta S., Sarethy I.P., Dang S. & Gabrani R., 2012. Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chem.* **135**: 672-675.

Siegenthaler W. & Luthy R., 1978. Current chemotherapy. In: proceedings of 10th international congress of chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.

Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269(11)**: 8022-8028.

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

Singh S.B., 2012. Natural products in the 21st Century. In: Dougherty T.J. & Pucci M.J. Antibiotic Discovery and Development. Ed. Springer, New York. pp: 821– 841.

Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R. & Sarkinas A., 2006. Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *J. Essent. Oil Res.* **18**: 698-703.

Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T. & Arsenakis M., 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 2384–2388.

Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} éd. Ed. De Boeck Université, Bruxelles.

Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G. & Johnson C.B., 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry.* **52**: 649–657.

Slinkard K. & Singleton V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* **28**: 49–55.

Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., 2002. Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.* **33**: 575–86.

Sokmen A., Jones B.M. & Erturk M., 1999. The *in vitro* antibacterial activity of Turkish plants. *J. Ethnopharmacol.* **67**: 79–86.

Solfo R.R., 1973. Etude d'une plante médicinale malgache *Buxus madagascariensis* Baill. et ses variétés. Ed. Office de la recherche scientifique et technique outre-mer, Paris.

Spada P. & Perrino P., 1996. Conservation of *Origanum* species in national and international collections: an assessment. In: *Origanum*: proceedings of the IPGRI International workshop on *Origanum*, 8–12 May. Valenzano, Italy. pp: 14–23.

Sroka Z., Fecka I. & Cisowski W., 2005. Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Z. Naturforsch.* **60**: 826 – 832.

Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A. & Kouretas D., 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem. Toxicol.* **50**: 4115–4124.

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

Stanojković T., Kolundžija B., Ćirić A., Soković M., Nikolić D. & Kundaković T., 2013. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* wierz. *Ex heuff* (lamiaceae). *Dig. J. Nanomater. Bios.* **8(2)**: 845 – 854.

Stoilova I., Bail S., Buchbauer G., Krastanov A., Stoyanova A., Schmidt E. & Jirovetz L., 2008. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil of *Origanum vulgare* L. from Bosnia. *Nat. Prod. Commun.* **3**: 1043-1046.

Sutour S., 2010. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de Doctorat, université de Corse, France.

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

Teisseire P.J., 1991. Chimie des substances odorantes. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

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

Teuscher E., Anton R. & Lobstein A., 2004. Plantes aromatiques: Epices, aromates condiments et huiles essentielles. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Tharib S.M., Gnan S.O. & Veitch G.B.A., 1983. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *J. Food. Prot.* **46**: 681-685.

Tomi F., Bradesi P., Bighelli A. & Casanova J., 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **1**: 25-34

Tsimogiannis D.I. & Oreopoulou V., 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* **7**: 140-146.

Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T. & Linuma M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Ethnopharmacol.* **50**: 27-34.

Turkmen N., Velioglu Y. S, Sari F. & Polat G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules.* **12**: 484-496.

Ultee A., Bennink M.H.J. & Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(4)**: 1561–1568.

Ultee A., Kets E.P.W. & Smid E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* **65(10)**: 4606-4610.

Ultee A., Smid E.J., 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 373-378.

Van Acker S., Van Balen G.P., Van den Berg D.J. & Van der Vijgh W.J.F., 1996. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **56**: 935– 943.

Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P. & Brumaghim J.L., 2011. Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *J. Inorg. Biochem.* **105**: 1314-1322.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. & Pérez-Álvarez J., 2007. Antifungal activities of thyme, clove and origano essential oils. *J. Food Safety.* **27**: 91–101.

Wang L. & Waller C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**: 300 – 312.

Wang W., Wu N., Zu Y.G. & Fu Y.J., 2008. Antioxydative activity of *Rosemarinus officinalis L.* essential oil compared to its main components. *Food chem.* **108**: 1019-1022.

Werker E., Putievsky E., Ravid U., Dudai N. & Katzir I., 1993. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum L.* (Lamiaceae). *Ann. bot.* **71 (1)**: 43-50.

Wichtel M. & Anton R., 1999. Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Wink M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* **64**: 3–19.

Woodman O.L., Meeker W.F. & Boujaoude M., 2005. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**: 302-309.

Wu J.H., Wang X.H., Yi Y.H. & Lee K.H., 2003. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos.* *Bioorg Med Chem Lett.* **13(10)**: 1813-1815.

Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J. & Li H.B., 2011. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11(2)**: 622-646.

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. & Ouar Korich M.N., 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* **91**: 5-12.

Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H. & Raneva V.G., 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* **64**: 59–66.

Yrjönen T., 2004. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Academic dissertation, University of Helsinki, Finlande. p: 19.

Yu R., Mandlekar S. & Tony Kong A.N., 2000. Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome C. *Mol. Pharmacol.* **58**: 431- 437.

- Zargari A., 1990.** Herbal Medicines. Publication of Tehran University, Iran. pp: 14-18.
- Zekri N., Amalich S., Boughdad A., El Belghiti M.A. & Zair T., 2013.** Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium L.* oils from Morocco against *Sitophilus oryzae*. *Mediterr. J. Chem.* **2(4)**: 607-619.
- Zeraia L., 1983.** Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. I.N.F. Alger.
- Zhang H., Kong B., Xiong Y .L. & Sun X., 2009.** Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Sci.* **81**: 686-692.
- Zhang Y., Vareed S.K. & Nair M.G., 2005.** Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci.* **76**: 1465-1472.
- Zheng W. & Wang S.Y., 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5165 – 5170.
- Zhiri A. & Baudoux D., 2005.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir Development, Luxembourg.
- Zhiri A., 2006.** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé. Ed. Fondation pour le libre choix. 12: 8.
- Zhou H.Y., Hong J.L., Shu P., Juan Ni Y. & Qin M. J., 2009.** A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia.* **80**: 283–285.
- Zwaving J.H. & Smith, D., 1971.** Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Phytochemistry.* **10**: 1951-1953.
- Zygadlo J.A. & Juliani H.R., 2003.** Recent progress in medicinal plants. In: Majundar D.K., Govil J.N., Singh V.K., Shailaja M.S. & Gangal S.V. Phytochemistry and Pharmacology II, Vol. 8. Studium Press, Houston, Texas. pp: 273-281.

Références électroniques:

<http://plantgenera.org/> (consulté le 24/07/2016)

<http://www.branche-rouge.org/> (consulté le 24/07/2016)

ANNEXES

Annexe 2 : Profils chromatographiques des extraits méthanoliques analysés par HPLC/UV

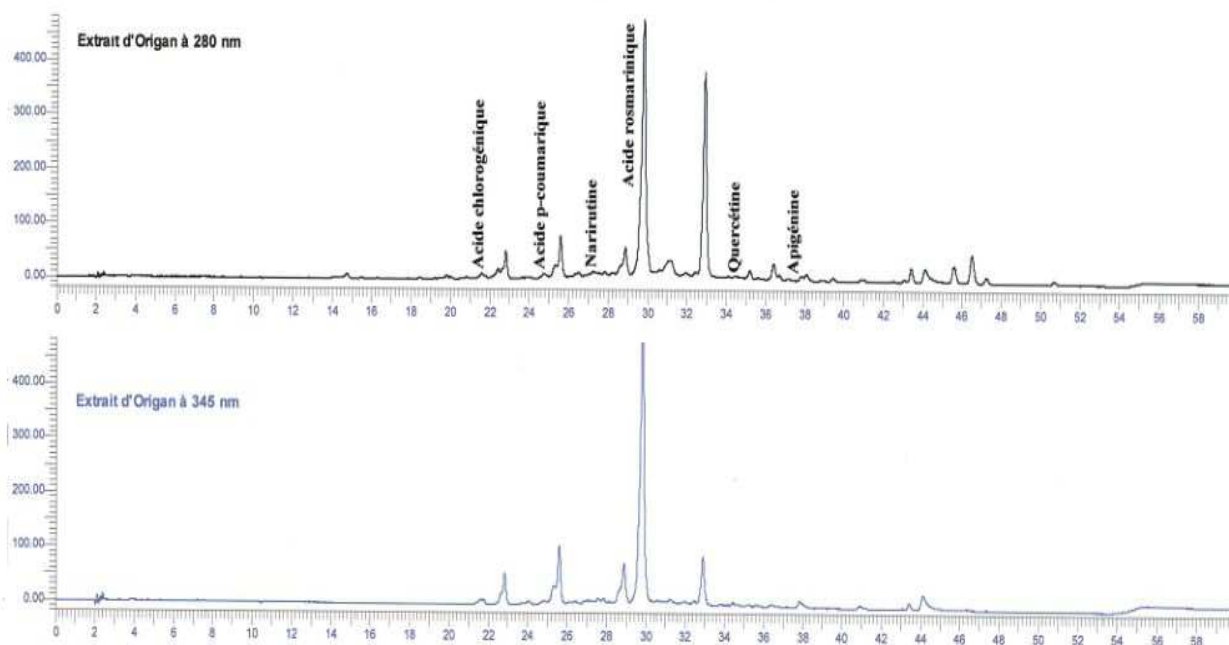


Figure 48 : Profil des polyphénols de l'extrait méthanolique de *Origanum glandulosum* par HPLC/UV

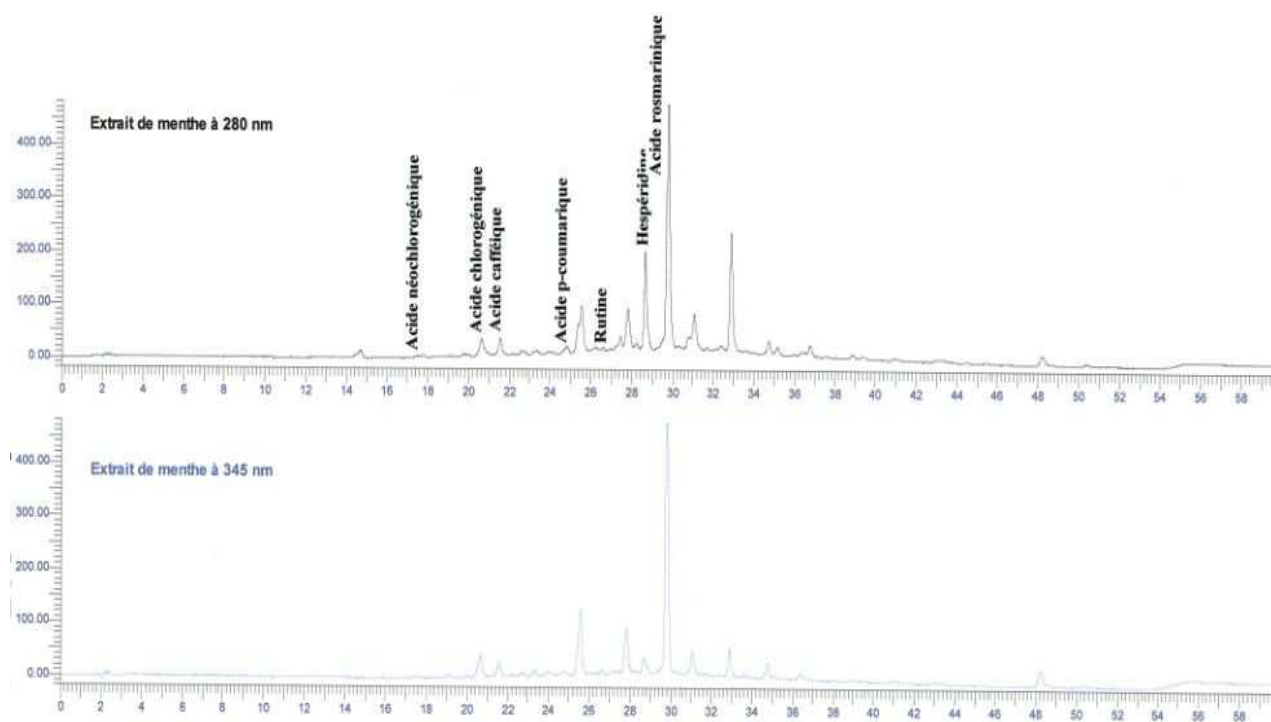


Figure 49 : Profil des polyphénols de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* par HPLC/UV

Annexe 3 : Photos représentant les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

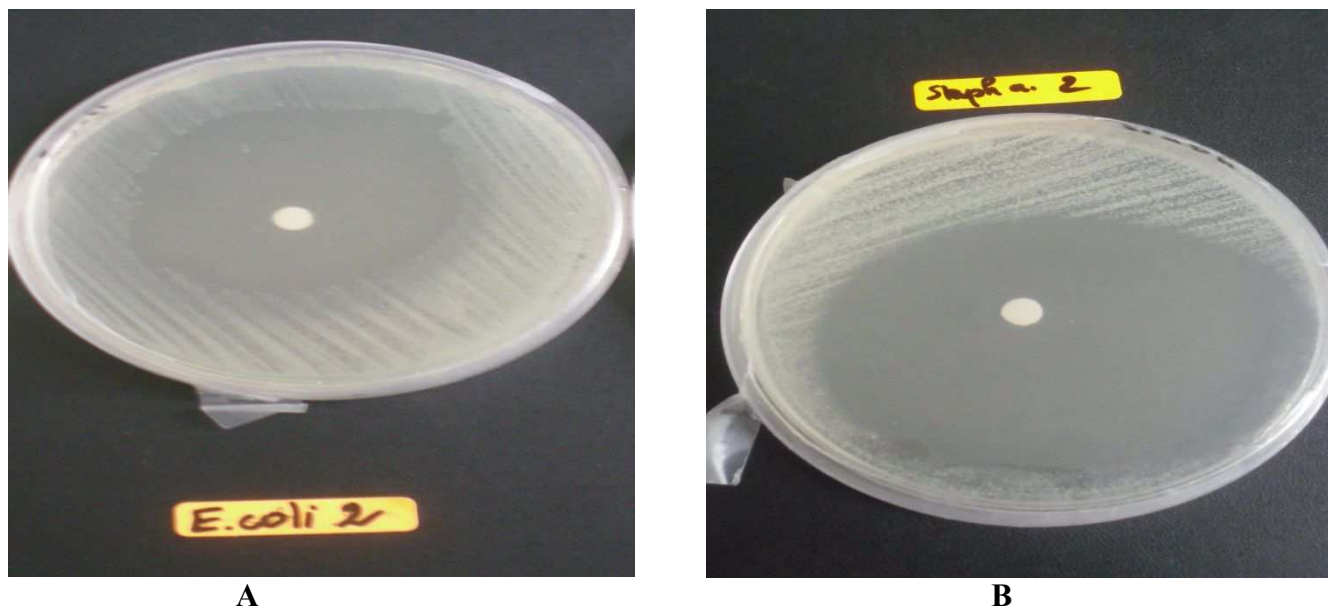


Figure 50 : Photos représentant la sensibilité d'*Escherichia coli* (A) et de *Staphylococcus aureus* (B) à l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*



Figure 51 : Photos représentant la sensibilité d'*Escherichia coli* (A) et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) à l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Annexe 4 : Photos représentant les résultats de la détermination des valeurs de CMI des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*

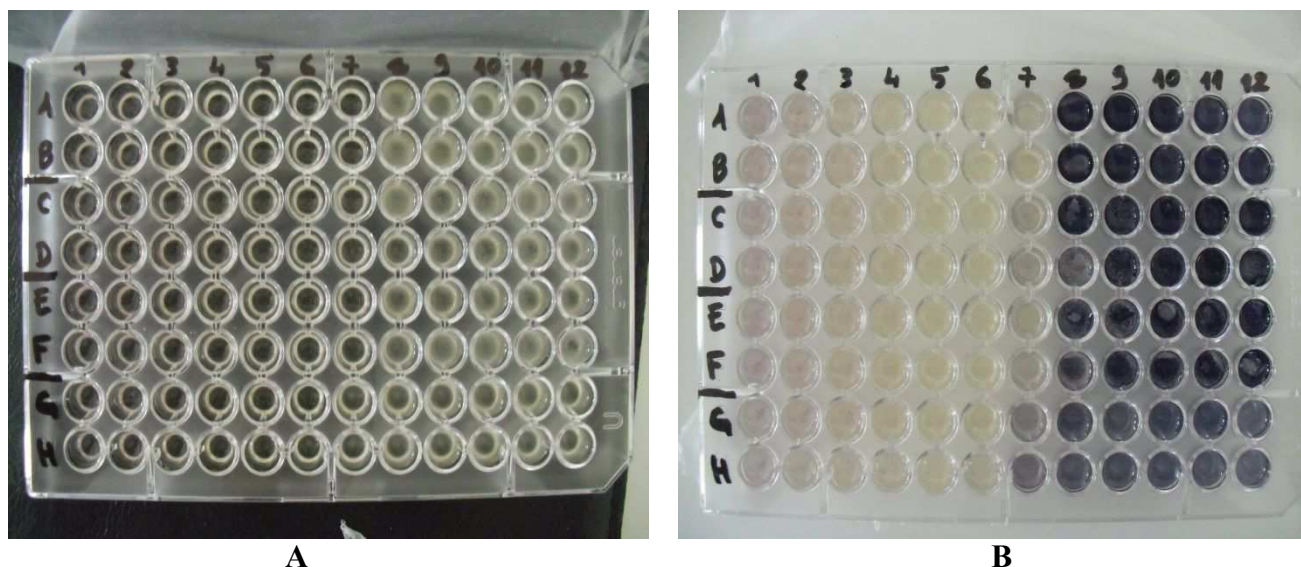
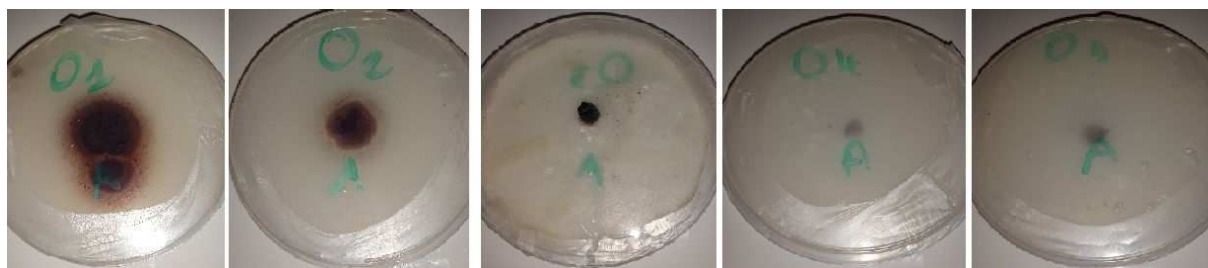


Figure 52 : Photos représentant la détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* avant (A) et après révélation par le NBT. (A, B : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; C, D : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; E, F : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ; G, H : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)



Figure 53 : Photos représentant la détermination des valeurs de CMI par la méthode de microdilution de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* avant (A) et après révélation par le NBT. (A, B : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; C, D : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; E, F : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ; G, H : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)

Annexe 5 : Photos représentant les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles



A



B

Figure 54 : Photos représentant la sensibilité d'*Aspergillus* sp. (A) et de *Fusarium* sp. (B) à l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*. (O₁: 1 µl/ml; O₂: 2 µl/ml; O₃: 3 µl/ml; O₄: 4 µl/ml; O₅: 5 µl/ml)



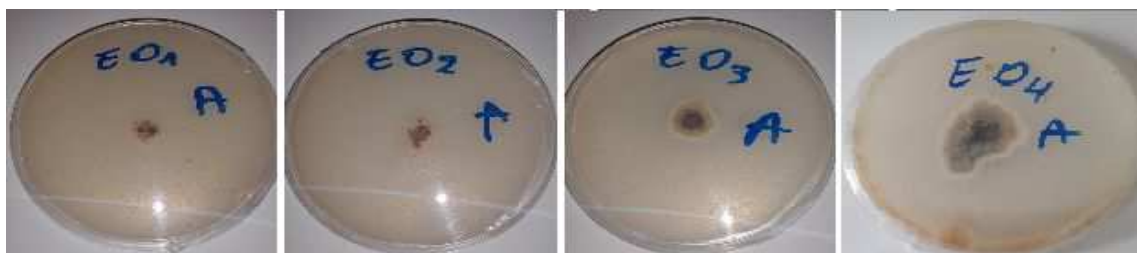
A



B

Figure 55: Photos représentant la sensibilité d'*Aspergillus* sp. (A) et de *Fusarium* sp. (B) à l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. (MP₁: 1 µl/ml; MP₂: 2 µl/ml; MP₃: 3 µl/ml; MP₄: 4 µl/ml; MP₅: 5 µl/ml)

Annexe 6 : Photos représentant les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanoliques



A



B

Figure 56 : Photos représentant la sensibilité d'*Aspergillus* sp. (A) et de *Fusarium* sp. (B) à l'extrait méthanolique d'*Origanum glandulosum*. (O₁: 2 mg/ml; O₂: 1.5 mg/ml; O₃: 1 mg/ml; O₄: 0.5 mg/ml)



A



B

Figure 57 : Photos représentant la sensibilité d'*Aspergillus* sp. (A) et de *Fusarium* sp. (B) à l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium*. (MP₁: 2 mg/ml; MP₂: 1.5 µl/ml; MP₃: 1 µl/ml; MP₄: 0.5 mg/ml)

**PUBLICATION
SCIENTIFIQUE**

Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Origanum vulgare L. ssp. glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Algeria

Bouhaddouda N*, Aouadi S, Labiod R

Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology (LABM), Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

Available Online: 22nd December, 2015

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the chemical composition of *O. vulgare L. ssp. glandulosum* (Desf.) Ietswaart essential oil (EO), to determine total phenolic constituent in methanolic extract and investigate the antibacterial and antioxidant activities of essential oil and methanolic extract. For antibacterial activity, susceptibility tests were expressed as inhibition zone by the disc diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) by broth microdilution method. Antioxidant activity was evaluated using DPPH scavenging capacity assay. GC and GC/MS analyses of the oil resulted in the identification of 43 compounds, representing 98.55% of the oil; para-cymene (25.615%), thymol (23.129%), carvacrol (20.321%) were the main components. The methanolic extract showed total phenolic contents of 526.75 µgGAE/mg. EO was particularly found to possess strong antibacterial capacity while methanolic extract remained inactive. In antioxidant activity, methanolic extract exhibited very high scavenging ability on DPPH radicals with IC₅₀= 25.59 µg/ml whereas EO presented an IC₅₀= 461.62 µg/ml.

INTRODUCTION

The essential oils and various extracts of plants have attracted considerable academic attention as well as industrial interest due to their various properties, particularly, the antimicrobial and antioxidant activities. The plant oils and extracts have formed the basis of many applications because of the resistance that pathogenic microorganisms have built against antibiotics¹ and the increasing popular concern about the safety of food and the potential toxicities of the synthetic antioxidants on health². There are several food plants (spices in particular) with a significant volatile organic compounds content (e.g. *Levisticum officinale*, *Origanum vulgare*, *O. majorana*, *Cinnamomum ssp.*, *Zingiber ssp.*, *Citrus ssp.*, *Elettaria cardamomum*, *Foeniculum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum*, *Pimpinella anisum* and *Ocinum ssp.*, to name a few examples)³.

Essential oil composition may vary considerably between plant species and varieties, and, within the same variety, from different geographical origin influenced by soil and environmental conditions³. Essential oils are usually characterized by two or three major components at quite high concentrations (up to 80%) compared to other components present only in trace amounts⁵.

The essential oils and some of their components can often be used in different forms for human consumption. It was observed that potato starch or sunflower oil concentrations of above 5%, reduced the efficacy of oregano and thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*⁶. Their use in foods as preservatives is limited because of flavor considerations. Hence, for the study of biodiversified

application, a complete investigation including the chemical composition, efficacy as antibacterial and/or antioxidant agents of an essential oil and/or extract was considered important.

Origanum vulgare L. (oregano), without focusing on specific subspecies, is the most widespread and known species of Lamiaceae family. It is an important aromatic plant widely used in many countries for seasoning foods⁷. *Origanum vulgare ssp. glandulosum* (Desf.) Ietswaart, synonymous *O. glandulosum* Desf., is an endemic spontaneous plant, growing in North Africa (Algeria and Tunisia)⁸. In Algeria, *O. glandulosum* Desf. is an aromatic shrub called “zaâter” which is mostly used as a medicinal plant against whooping cough, cough, fever and bronchitis⁹.

Carvacrol and thymol, the two main phenols that constitute about 78–82% of the essential oil of oregano, are principally responsible of its antibacterial and antioxidant activities^{10, 11}. In addition, other minor constituents such as γ -terpinene and ρ -cymene, two monoterpenes hydrocarbons that constitute about 5 and 7% of the total oil, respectively, also contribute to these activities^{10, 12}.

In recent years, the essential oil of *Origanum* species have intensively been investigated for their chemical composition and potential use as natural antimicrobial and antioxidant agents all over the world: from France¹³, Austria¹⁴, Southern Italy¹⁵, China and Pakistan¹⁶, Bosnia¹⁷, Bulgaria¹⁸, Lithuania¹⁹, Tunisia²⁰ and different Mediterranean populations²¹.

As far as our literature survey could ascertain chemical composition and antibacterial activities of *O. vulgare* from

east of Algeria have been previously published. Amrouni et al.²² have studied antibacterial activity on nosocomial bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, and reference strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but no information is available on the action on other microorganisms, antioxidative nature of this plant, and its potential use as natural foods preservative.

The chemical composition of Algerian *O. glandulosum* Desf. essential oil have been studied^{23, 24, 25, 26, 27, 28} and all reports have identified thymol and carvacrol as the main components. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils have been proved^{23, 25, 28}. However, there is no report on the biological activities of methanolic extract of *O. glandulosum* Desf.

Therefore, due to high utilization of the endemic *O. glandulosum* Desf. by local population to treat many diseases we were interested in this plant. For this reason, the aims of the present study was: to analyze the chemical composition of a hydrodistilled essential oil of *O. glandulosum* Desf collected from Guelma city in east Algeria by a GC/FID and GC/MS system in order to determine the essential oil chemotype and compare it with oregano essential oil from other localities of Algeria and world region; to determine total phenolic constituent in methanol extract and investigate the antimicrobial and antioxidant activities of both essential oil and methanol extracts from *O. glandulosum* Desf.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

O. glandulosum Desf. plants at flowering stage were collected from Nechmaya region of Guelma city (north-eastern part of Algeria) in June 2012. The aerial parts (leaves and flowers) were dried in the shade at room temperature.

Preparation of the extracts

Isolation of the essential oil

The air-dried and ground flowering parts of the plants were submitted for 2 hours to water-distillation, using a Clevenger-type apparatus. The essential oil was collected, dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C until tested and analyzed. Yield based on dried weight of the sample was calculated.

Preparation of the methanol extracts (MeOH)

The air-dried and finely ground samples were extracted with methanol (99.7%) by using a Soxhlet apparatus for about 6 hours²⁹. The methanolic extracts were filtered using Whatman filter paper (No. 1) and then concentrated in vacuo at 40°C using a rotary evaporator. The residues obtained were stored in a freezer until further tests.

GC and GC-MS analysis

GC/FID

The GC-FID analysis was performed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a DB5 MS column (30 m X 0.25 mm, 0.25 µm, Agilent Technologies, USA)

and fitted to FID (Flame Ionisation Detector). The injector and detector were operated at 280 and 300°C, respectively. Oven temperature program was 5 min isothermal at 50°C then raised to 300°C at a heating rate of 5°C/minute, and

finally isothermally held for 5 minutes. As a carrier gas, Hydrogen at 1.0ml/min was used. 1µL of the essential oil diluted in hexane (1/30) was injected in a split mode in the ratio of 1: 60. The percentage of composition of the essential oil was calculated by electronic integration of FID peak areas.

GC/MS

The analyses of the volatile constituents were run on a Hewlett-Packard GC-MS system: Gas Chromatograph Model 7890 coupled to a 5975 Mass Selective Detector; and equipped with a DB5 MS column (20 m X 0.18 mm, 0.18 µm, Agilent Technologies, USA).

The injector and detector were operated at 280 and 300°C, respectively. Oven temperature was programmed (50°C for 3.2 minutes, then 50 to 300°C at 8°C/minute and subsequently, held isothermally for 5 minutes). As a carrier gas, Helium with a flow rate of 1.0ml/minute was used. 1µL of the essential oil diluted in hexane (1/30) was injected in a split mode in the ratio of 1:250. The MS working in electron impact mode at 70 eV; and anionization energy of 1800 V; ion source temperature, 230°C; mass spectra data were acquired in the scan mode in *m/z* range 33-550.

The identification of components was based on comparison of retention time of each component (Rt) and their mass spectra with those of Wiley 275 mass spectra and NIST (National Institute of Standards and Technology) libraries and those described by Adams³⁰. Also, a homemade MS library with the spectra corresponding to pure substances and components of known essential oils was used.

Antimicrobial activity

Microbial strains

The essential oil and extracts were individually tested against a panel of microorganisms, including: five Laboratory reference strains obtained from the American Type Culture Collection: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; nine clinical isolates: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella thyphimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and one foodborne pathogen *Klebsiella oxytoca*.

Antimicrobial screening

Disc diffusion method

The dried plant extracts were dissolved in the same solvent (methanol) to a final concentration of 30 mg/ml. The agar disc diffusion method was employed for the determination of antimicrobial activities of the essential oil and methanolic extract according to Vuddhakul et al.³¹ with slight modification. For the experiments, a loopful of the bacterial working stocks were enriched on a tube containing 9 ml of Mueller-Hinton broth, then incubated at 37°C for 18–24 hours. The overnight cultures were used for the antibacterial activity of the essential oil and extract used in this study and the optical density was adjusted at 0.5McFarland turbidity standards. The inocula of the respective bacteria were streaked onto MHI agar plates

using a sterile swab. After inoculum absorption by agar, sterile filter discs (diameter 6 mm, Whatman paper N°1) were impregnated with 5 µl of essential oil or the 30 mg/ml extracts (150 µg/disc) and placed on the inoculated agar, using forceps dipped in ethanol and flamed, as described previously by Gulluce et al.³². Standard disc of Gentamycin (10 µg/disc) and blank discs (impregnated with methanol) were used as positive and negative controls, respectively. All Petri dishes were sealed with sterile laboratory parafilm to avoid eventual evaporation of the essential oils. And kept at 4°C for 2 hours, and then incubated at 37°C for 24 hours. After the incubation period, the mean diameter of inhibition halo where test microorganism did not grow (clearly visible inhibition zone) was measured in millimeters and recorded as the mean standard deviation (SD). All tests were performed in triplicate

Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)

The minimal inhibition concentration (MIC) values were studied for the bacterial strains which were sensitive to the essential oil and/or extracts in disc diffusion assay. The inocula of the bacterial strains were prepared from 12 hours broth cultures and suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity. Essential oil, which was dissolved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO), was first diluted to the highest concentration (50 mg/ml) to be tested, and then serial two-fold dilutions were made in a concentration range from 0.048 to 50 mg/ml in 5 ml sterile test tubes containing nutrient broth. MIC values of *O. vulgare* essential oil against bacterial strains were determined based on a microwell dilution method³².

The 96-well plates were prepared by dispensing into each well 95 µl of nutrient broth and 5 µl of the inoculum. A 100 µl aliquot from the stock solutions of *O. vulgare* essential oil initially prepared at the concentration of 50 mg/ml was added into the first wells. Then, 100 µl from the serial dilutions were transferred into ten consecutive wells. The last well containing 195 µl of nutrient broth without essential oil and 5 µl of the inoculum on each strip was used as negative control. The final volume in each well was 200 µl. The plates were covered with a sterile laboratory parafilm and then incubated at 37°C for 18–24 hours. The bacterial growth was indicated by the presence of a white “pellet” on the well bottom. As an indicator of microorganism growth, 10 µl of 2 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT) dissolved in water were added to the wells and incubated at 37 °C for 30 min³³. The nitroblue tetrazolium (NBT) salt acts as an electron acceptor and the yellow colored NBT is reduced to a purple-blue formazan product by biologically active organisms (Viable bacteria). The MIC was defined as the lowest concentration essential oil to inhibit the growth of the microorganisms. The MBC values were interpreted as the highest dilution (lowest concentration) of the sample, which showed clear fluid with no development of turbidity and without visible growth. All tests were performed in duplicate.

Antioxidant activity

Determination of total phenolic contents

Total phenolic constituents of the methanolic extracts of *O. glandulosum* Desf. were determined by the literature methods involving the Folin–Ciocalteu reagent and gallic acid as standard³⁴. 0.1 ml of extract solution, containing 1000 µg extract, was taken in a volumetric flask, 46 ml distilled water and 1 ml Folin-Ciocalteu reagent were added, and flask was shaken thoroughly. After 3 minutes, 3 ml of a solution of 2% Na₂CO₃ were added and the mixture was allowed to stand for 2 hours with intermittent shaking. Absorbance was measured at 760 nm. The same procedure was repeated for all standard gallic acid solutions. The concentration of total phenolic compounds in the methanolic extract was determined as µg of gallic acid/mg dry plant material by using the regression equation that was obtained from the calibration curve of the gallic acid standard. All tests were carried out in triplicate, and gallic acid equivalent values were reported as X ± SD of triplicates.

DPPH radicals scavenging capacity assay

The ability of the plant essential oil and extract to scavenge diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radicals was assessed using the method described by Takao et al.³⁵, along with antioxidant activity index (AAI). The stock solution of the plant essential oil and extract was prepared in methanol to achieve the concentration of 2000 µg/ml. Further, two-fold dilutions were made to obtain concentrations from 1000 µg/ml to 7.81 µg/ml. Diluted solutions of extract (2 ml each) were mixed with 2 ml of DPPH methanolic solution (80 µg/ml). After 30 minutes in darkness at room temperature, the absorbance was read in a spectrophotometer at 517 nm. The control samples consisted of 2 ml of methanol added to 2 ml of DPPH solution. Ascorbic acid was used as a positive control. The experiment was performed in triplicate. Scavenging activity is expressed as the inhibition percentage calculated using the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 \times [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}]$$

Where A_{control} is the absorbance of the control and A_{sample} is the absorbance of the extract.

The IC₅₀ value is the effective concentration at which 50% of DPPH radicals were scavenged. It was obtained from the graph of scavenging activity (%) versus concentration of samples. Low IC₅₀ value indicates strong ability of the extract to act as DPPH scavenger.

The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated using the following equation:

$$\text{AAI} = \text{final concentration of DPPH (\mu g/ml)} / \text{IC}_{50}(\mu \text{g/ml})$$

The estimation of AAI was: if AAI < 0.5 → poor antioxidant activity; AAI > 0.5-1 → moderate antioxidant activity; AAI > 1-2 → strong antioxidant activity and AAI > 2 → very strong antioxidant activity.

DPPH assay on TLC

This procedure was applied for extracts and the essential oil of *O. glandulosum* Desf. following Tepe et al.³⁶. Five microlitre of a 1:10 dilution of the extracts in methanol were applied to the TLC plate and methanol – ethyl acetate (1:1) mixture was used as developer. The plate was sprayed with a 0.2% DPPH reagent in methanol and left at

Table 1: Chemical composition of *O. glandulosum* Desf. essential oil.

	RT ^a	Compounds ^b	% FID	KI ^c
1	5,78	Alpha-Thujène	0,895	924
2	5,92	Alpha-Pinène	0,716	932
3	6,25	Camphène	0,12	946
4	6,71	Sabinène	0,018	696
5	6,8	Béta-Pinène	0,154	974
6	6,87	Octène-3-ol	0,52	974
7	6,97	Octanone-3	0,161	979
8	7,04	Myrcène	1,494	988
9	7,35	Alpha-Phellandrène	0,188	1002
10	7,38	Delta-3-Carène	0,072	1008
11	7,55	Alpha-Terpinène	1,787	1014
12	7,72	Para-Cymène	25,615	1020
13	7,77	Limonène	0,403	1024
14	7,8	Béta-Phéllandrène	0,207	1025
15	7,83	Eucalyptol	0,05	1031
16	7,89	(Z)-Béta-Ocimène	0,074	1032
17	8,08	(E)-Béta-Ocimène	0,06	1044
18	8,31	Gamma-Terpinène	16,612	1054
19	8,5	Cis-Hydrate de Sabinène	0,197	1065
20	8,74	Terpinolène	0,065	1086
21	8,83	Para-Cyménène	0,066	1089
22	8,99	Linalol	0,87	1095
23	9,05	Trans-Hydrate de Sabinène	0,12	1098
24	9,78	Camphre	0,012	1141
25	10,17	Bornéol	0,214	1165
26	10,3	Terpinène-4-ol	0,311	1174
27	10,39	Para-Cymène-8-ol	0,216	1179
28	10,53	Alpha-Terpinéol	0,386	1186
29	10,99	Thymol méthyl-Ether	0,051	1232
30	11,12	Carvacrol méthyl-Ether	0,18	1241
31	11,71	Isomère Thymol MW 150	0,163	1258
32	11,87	Thymol	23,129	1289
33	11,99	Carvacrol	20,321	1298
34	13,58	Béta-Caryophyllène	0,848	1417
35	13,75	Thymohydroquinone	0,487	1553
36	14,02	Alpha-Humulène	0,047	1452
37	14,62	Béta-Bisabolène	0,283	1505
38	14,7	Gamma-Cadinène	0,018	1513
39	14,75	Delta-Cadinène	0,025	1522
40	14,81	Béta-Sesquiphellandrène	0,539	1521
41	14,99	(E)-Alpha-Bisabolène	0,422	1529
42	15,46	Spathuléol	0,02	1577
43	15,54	Oxyde de Caryophyllène	0,41	1582
	Total		98,546	

Notes :

^a Retention time (as minutes).^b Compounds listed in order of their elution^c Kovats Index

room temperature for 30 minutes. Yellow spots formed from bleaching of purple colour of DPPH reagent, were evaluated as positive antioxidant activity.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition of the essential oil

Yield of the essential oil obtained by hydrodistillation from the aerial part of *O. vulgare* was 2.52 (w/w). As shown in Table 1, GC/MS analysis resulted in the identification of

forty three compounds representing 98.546% of the oil. The major constituents of the oil were para-cymene (25.615%), thymol (23.129%) and carvacrol (20.321%). Gamma-terpinene (16.612%) and alpha-terpinene (1.787%) were also present at significant concentrations. Amrouni et al.²² reported a different composition for this essential oil which showed a carvacrol chemotype with 33.85% carvacrol, 23.64% thymol and 20.85% para-cymene.

Table 2: Antimicrobial activities of *Origanum vulgare* L. essential oil and methanolic extract against the bacterial strains tested

Test microorganisms	Essential oil			extract (MeOH)			Antibiotic	
	Plant	MIC	MBC	IZ ^b	IZ ^c	MIC	IZ ^d	MIC
Gram -								
Acinetobacter baumannii	55.33±1.25	0.78	0.78	9	9	-	54	-
Escherichia coli	49.66±1.15	0.78	0.78	9	9	-	16	-
Escherichia coli ATCC 25922	54.83±1.25	0.78	0.78	8	8	-	31	-
Klebsiella oxytoca	59±1.73	0.78	0.78	7	7	-	30	-
Klebsiella pneumoniae	46.66±1.52	1.56	1.56	7	7	-	32	-
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	57.16±3.25	1.56	3.125	8	8	-	28	-
Proteus mirabilis	59±2.64	1.17	1.17	9	9	-	31	-
Proteus vulgaris	43.66±1.44	0.78	0.78	8	8	-	29	-
Pseudomonas aeruginosa	8.33±1.15	>50	>50	8	8	-	35	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	15±1.73	6.25	6.25	7	7	-	33	-
Salmonella thyphimurium	50.25±1.06	1.56	1.56	7	7	-	19	-
Serratia marcescens	47.33±3.21	1.56	1.56	9	9	-	18	-
Gram +								
Enterococcus faecalis ATCC 29212	51.83±2.46	0.78	0.78	8	8	-	31	-
Staphylococcus aureus	63.33±3.05	1.56	1.56	12	6	-	28	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	51.83±2.56	0.78	0.78	8	8	-	29	-

Notes :

IZ^a = Inhibition zone in diameter (mm) around the discs (6 mm) impregnated with 5µl of essential oil.

IZ^b = Inhibition zone in diameter (mm) around the discs (6 mm) impregnated with 150 µg/disc.

IZ^c = Inhibition zone in diameter (mm) around the discs (6 mm) impregnated with 5 µl of methanol.

IZ^d = Diameter of disc diffusion (mm); Gentamycin (10µg/disc) were used as positive reference standards antibiotic discs

MIC = Minimal inhibitory concentrations as (mg /ml)

Except Egyptian *Origanum vulgare* essential oil with an important concentration of Pulegone³⁷, most essential oils from southern Mediterranean presented four main components with different percentages : carvacrol, thymol, p-cymene and γ-terpinene^{20, 23, 24,38}.

Algerian *O. glandulosum* Desf. From Jijel²⁷, Constantine²⁷, Setif^{25,26} and Tlemcen²⁸ presented a low p-cymene content compared to our essential oil (7.5%, 6.6%, 14.6%, 7.9% and 17,1% respectively). And all showed a thymol and/or carvacrol chemotype. However it is important to note that the compositions of these essential oils obtained by hydrodistillation may vary from one region to another. This variability concerns particularly carvacrol for which food manufacturers have a particular interest.

To the best of our knowledge, there are many reports on the chemical composition of the essential oil isolated from different *O. vulgare* subspecies from different regions. Most of them indicate the presence of two main chemotypes of this essential oil, one contains as major components the phenols thymol and/or carvacrol^{39, 40} and other consists mainly monoterpene alcohols^{41, 42}.

It is known that *O. vulgare* species presents great variability in its essential oil composition due to the existence of different subspecies, but also to a numerous of parameters where mainly are the local climatic, seasonal, geological and geographical factors⁴³.

However, the chemical composition of the studied essential oil differ completely with those previously reported on the literature and displayed a different specific oil chemical profile with para-cymene, thymol and carvacrol as dominant components.

Antimicrobial activity

The antimicrobial activities of *O. glandulosum* Desf. essential oil and methanolic extract against microorganisms were studied in the present work and their potency was qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones, zone diameter, and MIC values. The results are given in Table 2.

According to the results given in Table 2, *O. glandulosum* Desf. essential oil displayed a great in vitro potential of antimicrobial activity, however the methanolic extract showed no antimicrobial activity. In disc diffusion assay and Micro-well dilution assay, Gram negative strains were extremely sensitive to the 5 µl of essential oil with IZ between 43.66 ± 1.44 (mm) and 59 ± 2.64 (mm), also MIC values ranged from 0.78 (mg/ml) to 1.56 (mg/ml) ; Gram positif strains have also been extremely sensitive: Enterococcus faecalis ATCC 29212 and Staphylococcus aureus ATCC25923 showed a IZ at 51.83 ± 2.46 and 51.83 ± 2.56 respectively, MIC/MIB values were at 0.78 mg/ml. Staphylococcus aureus have been the most sensitive strain with IZ = 63.33 ± 3.05.

Table 3: Free radical scavenging capacities of *Origanum vulgare* L. essential oil, extract and Vitamin C measured in DPPH assay

Sample	IC50 (µg/ml)	AAI
Essential oil	461,62	0,17
Methanolic extract	25,59	3,12
Vitamin C	6,35	12,6

On the other hand *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was sensitive (IZ=15 ± 1.73 mm and MIC= 6.25 mg/ml) but *Pseudomonas aeruginosa* were less sensitive to oil with IZ at 8.33 ± 1.15 (mm) and MIC value >50 (mg/ml).

However, all strains seems to be not sensitive to methanolic extract, except *Staphylococcus aureus* which was moderately sensitive with IZ 12 mm. MBC values were the same as those of MIC for all strains except for *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (MIC 1.56 mg/ml MBC 3.125 mg/ml).

O. glandulosum Desf. essential oil was more active than antibiotic (Gentamycin) on all bacterial strains except for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 which was very resistant to the oil.

These results are significantly higher compared to previous reports of antibacterial investigation on *O. glandulosum* essential oil^{25,28} who described IZ ranged between 8-18mm and 8-25 mm respectively.

However, Amrouni et al.²² essential oil, have been less active against reference strains *E.coli* and *S. aureus* than our *Oregano* essential oil, also, it shows moderate antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* strains (21.6 mm and 1.71 mg/ml). The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains is in concordance with other studies⁴⁴.

The presence of para-cymene, thymol and carvacrol as dominant components in this essential oil and the potential synergistic phenomenon between them might be involved in this great antimicrobial activity.

Thymol is structurally very similar to carvacrol, having the hydroxyl group at a different location on the phenolic ring. Both substances appear to make the cell membrane permeable⁴⁵. Thymol has been previously described as able to interrupt the bacterial membrane, by affecting both the pH gradient and the electron flow across the membrane⁴⁵, and it may justify the highest antimicrobial activity of the essential oil.

It was shown that hydroxyl group gets inserted in cytoplasmic membrane, changes the membrane physical and chemical properties and affects both lipid ordering and stability of bilayer, inducing an increase of proton passive flux across the membrane⁴⁶.

Despite the p-cymene was an ineffective antimicrobial agent lonely, but combined with carvacrol has led to a synergistic activity resulted by swelling bacterial cell membranes to a greater extent than carvacrol does. By this mechanism p-cymene probably enables carvacrol to be more easily transported across the cytoplasmic membrane so that a synergistic effect is achieved when the two are used together⁴⁷.

Antioxidant activity

Amount of total phenolic compounds

The amounts of total phenolics in the extract was determined spectrophotometrically according to the Folin–Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalents.

Folin–Ciocalteu reagent consists of a yellow acidic solution containing complex polymeric ions formed from phosphomolybdic and phosphotungstic heteropoly acids. These reagent oxidises phenolates resulted in the production of complex molybdenum-tungsten blue which can be detected spectrophotometrically at 725 nm.

Curve equation is: y (absorbance) = 0.0004 µg gallic acid + 0.1203; $R^2 = 0.9966$

The absorbance value of the methanol extract solution reacted with Folin–Ciocalteu reagent was inserted in the above equation and the total amount of phenolic compound was calculated. The amount of total phenols in the plant methanolic extract was very high and estimated as 526.75 µg GAE/mg.

The results indicated superior total phenolic compounds for methanolic extract compared to Barros et al.⁴⁸ who measured high concentration of total phenols (369.18 mg GAE/g extract) in methanol extract of *Origanum vulgare* subsp. *virens*. Sahin et al.⁴² also reported a concentration of 220 µg/mg dry extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*.

DPPH radicals scavenging capacity assay

Antioxidant activities of the essential oil and the methanolic extract from *O. glandulosum* have been evaluated by DPPH radical scavenging test.

It is well known that when a solution of DPPH is mixed with that of a substance containing antioxidants, the stable free radical DPPH (deep violet color) is converted to 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine with rise to no color⁴⁹.

Free radical scavenging properties of the essential oil and the methanolic extract are presented in Table 3. The activity was expressed in the form of IC50 values. Lower IC50 value indicates higher antioxidant activity.

The methanolic extract showed a very strong scavenging ability on DPPH radicals with IC50 = 25.59 µg/ml and AAI (antioxidant activity index) of 3.12.

On the other hand, the essential oil present poor antioxidant activity with IC50 = 461.62 µg/ml and AAI 0.17. However, DPPH scavenging ability of both methanolic extract and the oil is low compared to reference compound, Vitamin C (IC50 = 6.35 µg/ml and AAI = 12.6).

Previous papers, also, confirmed high radical scavenging ability of different oregano extracts. Sahin et al.⁴² observed similar order in their study (synthetic antioxidant > methanolic extract > essential oil), with a strong methanolic extract free radical scavenging activity providing IC50 at 9,9µg/ml. In the free radical scavenging activity, superiority of the methanol extract could be attributed to the presence of phenolics as they comprise 52.67% of the extract.

Compared to prior reports, *O. glandulosum* essential oil, in our study, develop a less DPPH radical scavenging activity. Mechergui et al.²⁰ have unregistered an essential

oil IC50 at 105.29 mg/L and 142.86 mg/L. This difference depends on chemical composition of essential oils.

The antioxidant properties of the chemical components of essential oils have shown that monoterpenes, such as p-cymene, have a significant antioxidant effect⁵⁰.

According to these results, there is a relationship between total phenol contents and antioxidant activity. Phenolic compounds, biologically active components, are the main agents that can donate hydrogen to free radicals and thus break the chain reaction of lipid oxidation at the first initiation step⁴⁷. This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups⁵¹.

DPPH assay on TLC

In order to visualize qualitatively the radical scavenging capacity of the essential oil and extract, they were subjected to silica gel TLC plates. With DPPH reagent, one big yellow spot appeared after spraying the TLC trace of both essential oil and methanolic extract. Their intensity and reaction speed were also various, suggesting that spots may contain individually different characteristics some of which have a fast radicals scavenging capacity, reducing the DPPH radical very rapidly, while others have a slower RSC, taking a longer time to react⁵².

According to color intensities, *Origanum vulgare* methanolic extract has more important radicals scavenging capacity comparing to essential oil. And these results are in agreement with the results by DPPH spectrophotometric assay.

CONCLUSION

The results of this work have shown that *O. vulgare* possess compounds with antimicrobial and antioxidant properties. Essential oil shows a great antibacterial activity against reference clinical strains, and also possesses a moderate antioxidant activity. Moreover, methanolic extract exhibits no antibacterial activity but a high antioxidant activity.

These findings suggest the possibility of using the *O. vulgare* essential oil and methanolic extract as natural alternative to traditional food preservatives and thus enhance food safety and shelf life, and as potential source of antibacterial ingredients in pharmaceutical industry and natural therapies of infectious diseases in human, and controlling of plant disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Pr. Ladjama Ali, the director of Applied Microbiology and Biochemistry laboratory (Department of Biochemistry, Annaba, Algeria).

REFERENCES

1. Lis-Balchin M, Deans SG. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1997; 82: 759–762.
2. Chaveron H. Molécules toxiques In: Introduction à la toxicologie nutritionnelle. Ed. TEC and DOC, Lavoisier, Paris 1999, 98.
3. Maffei ME, Gertsh J, Appendino G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*. 2011; 28: 1359–1380.
4. Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E, Lanaras T. Essential oil composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) oregano: a tool for their distinction. *Journal of Essential Oil Research*. 2004; 4: 336–338.
5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446–475.
6. Gutierrez J, Barry Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*. 2008; 124: 91–97.
7. Quiroga PR, Grosso NR, Lante A, Lomolino G, Zygadlo JA, Nepote V. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013; 48: 642–649.
8. Ietswaart JHA. Taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Ed. Leiden University Press, Vol 4, LaHague, Netherland, 1980.
9. Baba Aissa F. Les plantes médicinales en Algérie. Ed. Bouchène and Diwan, Alger, 1991.
10. Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* susp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 1739–1745
11. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 1999; 64: 59–66.
12. Kokkini S. Herbs of the Labiatae. In *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Ed. Macrae R, Robinson R, Sadler M, Fuellerlove G, Academic Press, London, 1994. 2342–2348
13. Chalchat JC, Pasquier B. Morphological and chemical studies of origanum clones : *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*. *Journal of essential oil research*. 1998; 10: 119–125.
14. Lukas B, Schmiderer C, Novak J. Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *Vulgare* (Lamiaceae) From Austria. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013; 50, 106–113
15. De Martino L, De Feo V, Formisano C, Mignola E, Senatore F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 2009; 14: 2735–2746.
16. Gong HY, Liu WH, GY LV, Zhou X. Analysis of essential oils from *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2014; 24 : 25–32.
17. Stoilova I, Bail S, Buchbauer G, Krastanov A, Stoyanova A, Schmidt E, Jirovetz L. Chemical

- composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of an essential oil of *Origanum vulgare* L. from Bosnia. *Natural Product Communications*. 2008; 3: 1043-1046
18. Kula J, Majda T, Stoyanova A, Georgiev V. Chemical composition of *Origanum vulgare* L. essential oil from Bulgaria. *Journal of essential oil Bearing Plants*. 2007; 10: 215-220.
19. Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry*. 2001; 57: 65-69.
20. Mechergui K, Coelho JA, Serra MC, Lamine SB, Boukhchina S, Khouja ML. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp *glandulosum* (Desf.) letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010; 90: 1745-1749.
21. Figueredo G, Cabassu P, Chalchat JC, Pasquier B. Studies of Mediterranean oregano populations. VIII—chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006; 21: 134–139
22. Amrouni S, Touati M, Hadeif Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliates* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase. *Phytothérapie*. 2014; 12: 309-313.
23. Ruberto G, Barata MT, Sari M, Kaabexhe M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils From Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002; 17: 251–254
24. Belhattab R, Larous L, Figueiredo CA, Santos PAG, Barroso JC, Pedro LG. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 2005; 20: 209-212.
25. Sari M, Biondi DM, Kaabeche M, Mandalari G, Manuela D'Arrigo M, Bisignano G, Saija A, Daquino C, Ruberto G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006; 21: 890–898.
26. Khalfi O, Sahraoui N, Bentahar F, Boutekdjiret C. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 88: 1562–1566.
27. Berrehal D, Boudiar T, Hichem L, Khalfallah A, Kabouche A, Al-Freihat A, Ghannadi A, Sajjadi E, Mehrabani M, Safaei-Ghomi J, Kabouche Z. Comparative Composition of Four Essential Oils of Oregano Used in Algerian and Jordanian Folk medicine. *Natural Product Communications*. 2010; 5: 957 – 960.
28. Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF, Costa J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 2008; 106: 132-139.
29. Lin J, Opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE, Jager AK, van Staden J. Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68: 267–274 (1999).
30. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th edn, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2001.
31. Vuddhakul V, Bhoopong P, Hayeebilana F, Subhadhirasakul S. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*. 2007; 24: 413-418
32. Gulluce M, Şahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*. 2007; 103: 1449–1456
33. Sharma A, Gupta S, Sarethy IP, Dang S, Gabrani R. Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chemistry*. 2012; 135: 672-675
34. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977; 28: 49–55).
35. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1994; 58: 1780-1783.
36. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 2005; 90: 333–340.
37. Badawy MEI, and Abdelgaleil SAM. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*. 2014; 52: 776–782.
38. Derwich R, Benziane A, Manar A, Taouil R. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 2010; 5: 120-129.
39. Barros JC, Conceição ML, Neto NJG, Costa AVC, Siqueira JPI, Basílio IDJ, Souza EL. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT-Food Science and Technology*. 2009; 42: 1139-1143.
40. Castilho PC, Savluchinske-Feio S, Weinhold TS, Gouveia SC. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control*. 2012; 23: 552-558.

41. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 2001; 49: 4168-4170 .
42. Şahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G, Ozer H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 2004; 15: 549–557.
43. Perry NB, Anderson RE, Brennan NJ, Douglas MH, Heaney AJ, McGimpsey JA, Smallfield BM. Essential oils from Dalmation Sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47: 2048–2054.
44. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 308–316.
45. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. 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.
46. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 43:149–154.
47. Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*. 2009; 112: 874–879.
48. Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT-Food Science and Technology*. 2010; 43: 544-550.
49. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2004; 26: 211–219.
50. Ruberto G, Barata MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 2000; 69:167–174
51. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono L, Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47: 397–402.
52. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 2002; 163: 1161-1168.