

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة أمحمد بوقرة- بومرداس

Université M'hamed Bougara de Boumerdes

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Evaluation de quelques activités biologiques
des huiles essentielles d'une plante médicinale

Présenté par :

M^{elle} BOUANANE Naima

M^{elle} GAMGANI Souad

Soutenu le 29 Juin 2017 devant le jury composé de :

M^{me} OUKALA.N

M.A.B (FS/UMBB)

Présidente

M^{me} DAHAK.K

M.C.A (FS/UMBB)

Examinatrice

M^r BOUDJEMA.K

M.C.B (FS/UMBB)

Promoteur

M^{me} FAZOUANE.F

Professeur (FS/UMBB)

Co-promotrice

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier en premier lieu, Dieu tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage à fin de réaliser cette étude.

*Nos vifs remerciements vont en particulier à **M^r BOUDJEMA.K** de nous avoir proposé ce sujet et de diriger notre travail par ses précieux conseils et encouragements.*

*Nous exprimons nos respectueuses reconnaissances à **M^{me} FAZOUANE.F** pour Ses aides techniques et ses orientations.*

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail;

*À **M^{me} OUKALA.N** d'avoir accepté de présider ce jury et à **M^{me} DAHAK.K**, qui a consacré leur temps pour l'examen de ce travail.*

*Que **M^{me} LAOUFI.R**, trouve ici l'expression de nos profondes gratitude pour avoir facilité notre tâche.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à toutes les techniciennes des laboratoires pédagogiques **M^{elle} Kamilia, M^{elle} Dalila et M^{elle} Safia**, pour leurs orientations et leurs innombrables services.*

*Nos exprimons nos sincères gratitude à **M^r BEN AYAD.T** directeur de laboratoire centrale de la police scientifique, pour le service qu'il nous a rendu.*

Nous tenons tout particulièrement à remercier l'équipe du laboratoire de biochimie appliquée pour leurs encouragements et orientations, ainsi que tous les enseignants de Département de Biologie qui ont contribué à notre formation universitaire.

C'est avec un réel plaisir que nous adressons nos sincères reconnaissances et nos profondes gratitude à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour réaliser cette étude.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

*À mes très chers parents, mes frères, ma sœur, mes oncles, mon cher cousin et
ma chère copine qui m'ont donné
la tendresse et le courage pour que je réussisse ;*

À tous mes amis et collègues

M^{elle} GAMGANI.S

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

*À mes très chers parents, mes frères, mes tantes et mes oncles qui m'ont
donné la tendresse et le courage pour que je réussisse ;*

À tous mes amis et collègues

M^{elle} BOUANANE.N

Table de matière

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Matière végétale

I.1-Présentation de l'espèce étudiée	3
I.1.1- Nomenclature de plante	3
I.1.2- Systématique	3
I.1.3- Culture et répartition géographique	3
I.1.4- Description botanique	4
I.1.5- Utilisations traditionnelles de la plante.....	5

Chapitre II : Métabolites secondaires

II.1- Définition	6
II.2- Rôle	6
II.3- Classification	6
II.3.1- Les alcaloïdes	6
II.3.1.1- Définition	6
II.3.1.2- Structure	7
II.3.1.3- Localisation	7
II.3.1.4- Classification	7
II.3.1.5- Rôle et propriétés.....	7
II.3.2- Les composés phénoliques.....	8
II.3.2.1- Définition	8
II.3.2.2- Structure chimique et classification	8

Chapitre III : Les huiles essentielles

III.1- Historique.....	13
------------------------	----

III.2- Définition	13
III.3- Répartition et localisation	13
III.4- Propriétés physico-chimiques	14
III.5- Rôle.....	15
III.6- Composition chimique.....	15
III.6.1-Les composés terpéniques	15
III.6.1.1-Les monoterpènes.....	16
III.6.1.2-Les sesquiterpènes	16
III.6.2-Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.....	17
III.6.3-Les composés d'origines diverses	17
III.7-Les facteurs influençant de la variabilité de la composition chimiques des huiles essentielles	18
III.8- Biosynthèse	19
III.8.1- Voie des terpénoïdes.....	19
III.8.2- Voie des phenyl-propanoïdes.....	19
III.9- Toxicité des huiles essentielles	20
III.10- Procèdes d'extraction	20
III.10.1-Hydrodistillation	21
III.10.2- Entrainement à la vapeur d'eau.....	21
III.10.3-Hydrodiffusion	21
III.10.4- Autres méthodes.....	21
III.10.4.1-Extraction par solvant.....	21
III.10.4.2-Extraction par micro-onde sou vide	22
III.10.4.3-Extraction par CO ₂ super-critique	22
III.11-Méthodes d'identification.....	22
III.11.1- Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	22
III.11.2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	22

Chapitre IV: Les activités biologiques

IV.1- Activité antimicrobienne.....	24
IV.1.1- Définition	24
IV.1.2- Principales substances antibactériennes	24
IV.1.2.1- Les antibiotiques	24
IV.1.2.2- Les huiles essentielles	24
IV.1.3-Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes	24
IV.1.3.1- Mode d'action contre les bactéries.....	24
IV.1.3.2 Mode d'action contre le champignon	25
IV.1.4 - Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	25
IV.1.4.1 - Méthode de contact direct	26
IV.1.4.2- Méthode de diffusion sur gélose	26
IV.1.4.3- Méthode de dilution sur milieu liquide.....	26
IV.1.4.4- Micro atmosphère.....	26
IV.2- Activité antioxydante	27
IV.2.1- Définition	27
IV.2.2- Stress oxydatif et radicaux libres	27
IV.2.3- Les antioxydants	28
IV.2.3.1-Définition	28
IV.2.3.2- Types d'antioxydants	28
IV.2.4-Mécanisme d'action des antioxydants	30

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1- Matériel.....	31
I.1.1- Matériel non biologique.....	31
I.1.2- Matériel biologique.....	31
I.1.2.1- Souches microbiennes et milieux de culture	31
I.1.2.2- Matériel végétal.....	32
I.2- Méthodes	33

I.2.1- Screening phytochimique	34
I.2.2- Détermination de la teneur en eau	36
I.2.3- Extraction des huiles essentielles	37
I.2.3.1- Extraction par hydrodistillation	37
I.2.3.2- Conservation des huiles essentielles.....	38
I.2.3.3- Détermination du rendement.....	38
I.2.4- Identification des huiles essentielles par Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse GC/MS	39
I.2.5- Evaluation des activités biologiques	40
I.2.5.1- Etude de l'activité antioxydante	40
I.2.5.2- Activités antimicrobiennes	42

Chapitre II : Résultats et discussion

II- Résultats et discussion.....	48
II.1- Screening phytochimique	48
II.2- Détermination de la teneur en eau.....	51
II.3- Huiles essentielles.....	51
II.3.1- Propriétés organoleptiques.....	51
II.3.2- Rendement d'extraction	52
II.4- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par GC/ MS	53
II.5- Evaluation des activités biologiques.....	56
II.5.1- Activité antioxydante.....	56
II.5.2- Activité antimicrobienne	58
II.5.2.1- Activité antibactérienne	58
II.5.2.2- Activité antifongique.....	60
Conclusion et perspectives	63

Références bibliographique

Annexes

Glossaire

Résumés

Liste des tableaux

Tableau I: Les différents composés des métabolites secondaires	6
Tableau II: Principales classes des flavonoïdes	9
Tableau III: Caractéristiques générales des microorganismes utilisés.....	31
Tableau IV: Résultats de screening phytochimique de la plante <i>S.calamintha</i>	48
Tableau V: Résultats d'analyses chromatographiques (GC/MS) des fractions volatiles de <i>S.calamintha</i>	53
Tableau VI: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i> et antibiogramme.	60
Tableau VII: Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i> et de Fongenal (Anti-candida)	61
Tableau VIII: Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i> et de la nystatine (Anti-moisissure).....	62

Liste des figures

Figure 1 : Photo des parties aériennes de la plante <i>Satureja calamintha</i>	4
Figure 2 : Structure des flavonoïdes.....	9
Figure 3 : Structure de base des coumarines	11
Figure 4 : Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille	14
Figure 5 : Formule développée de l'isoprène.....	16
Figure 6 : Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielle	18
Figure 7 : Biosynthèse des constituants chimiques des huiles essentielles.....	20
Figure 8 : Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	25
Figure 9 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR.....	28
Figure 10: Photo de la plante fraîche, sèche et broyée.....	32
Figure 11: Diagramme représentant les différentes étapes de l'extraction ainsi que les analyses effectuées sur l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i>	33
Figure 12: Dispositif de l'hydrodistillation à l'échelle de laboratoire	37
Figure 13: Diagramme représentant les différentes étapes de l'extraction des huiles essentielles de la plante <i>S.calamintha</i>	38
Figure 14: Réduction du radical libre DPPH (Molyneux ,2004)	41
Figure 15: Photo des souches bactériennes revivifiées dans le BN	43
Figure 16: Photo de la préparation de l'inoculum.....	43
Figure 17: Illustration de la méthode des antibiogrammes sur boîte de pétri (Pibiri, 2005)....	44
Figure 18: Schéma simplifier du principe de la méthode de l'antibiogramme	45
Figure 19: Photo originale des souches fongiques (moisissures).....	46
Figure 20: Photo originale de l'huile essentielle de la plante <i>S.calamintha</i>	52
Figure 21: Rendement d'extraction en huile essentielle	52
Figure 22: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i>	53
Figure 23: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S.calamintha</i>	54
Figure 24: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle (%).....	56
Figure 25: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique (%).....	57
Figure 26: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations du BHT en (%)	57

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé

ATCC : American Type Culture Collection

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

S.calamintha : *Satureja calamintha*

HE : Huiles essentielles

ATB : Antibiotique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

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

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

BHT: Hydroxytoluène butylé

AA : Acide ascorbique

MH : Muller Hinton

GN : Gélose Nutritive

BN : Bouillon Nutritif

GS : Gélose Sabouraud

pH : Potentiel hydrogène

UV : Ultra-Violet

DO : Densité optique

Nm : Nanomètre

Rd : Rendement de la plante en huile essentielles

Rda : Rendement de la plante séché à l'air libre

Rde : Rendement de la plante séché dans l'étuve

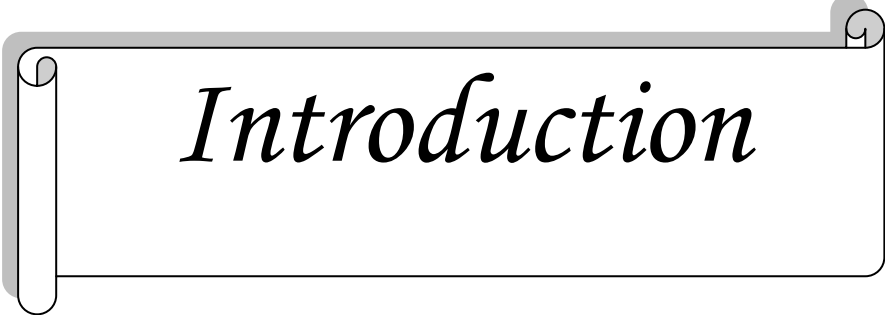
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Cp: Chloramphénicol

Ax: Amoxicilline

HS: Hospital Strain

DIV: Division



Introduction

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et par fois dans ses rites religieux.

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

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi eux, les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales qui se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodiques, carminatives, hépato-protecteurs, antiviraux, anticancéreux et antioxydants (**Viuda-Martos et al., 2011**). En outre, les huiles essentielles ont reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments (**Lahlou, 2004**).

L'Algérie, pays connu par sa biodiversité, dispose d'une flore particulièrement riche et variée. Nous comptons environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique (**Labioud, 2016**).

Parmi ces plantes, nous citons l'espèce *Satureja calamintha* qui appartient à la famille de lamiacée qui se trouve au Nord-Est d'Algérie.

Durant ce travail nous nous sommes intéressé d'une part à la recherche des substances naturelles volatiles et d'autre part à l'étude de leur activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne). Dans cette optique, notre étude est organisée en deux parties :

- La première partie visera la synthèse bibliographique en résumant les principales caractéristiques de l'espèce sélectionnée, ainsi que les huiles essentielles et leurs activités biologiques ;

- La deuxième partie consistera à une étude expérimentale, elle comporte :
 - ❖ Un screening phytochimique de la partie aérienne de l'espèce étudiée
 - ❖ Détermination du taux d'humidité de la plante
 - ❖ Extraction des huiles essentielles et détermination de leur rendement.
 - ❖ Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS.
 - ❖ L'évaluation in vitro de leurs activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne).

*Partie I : Synthèse
bibliographique*

A decorative frame resembling a scroll, with a grey shadow on the left and top edges. The frame has rounded corners and a small scroll-like detail at the top right.

Chapitre I :
Matière végétale
(Satureja calamintha)

I.1-Présentation de l'espèce étudiée

Le nom *Satureja* dérive du latin « saturare = nourrir » ou « satura= pot à fleurs ». Il existe plusieurs espèces, toutes sont remarquables par leur odeur forte et aromatique, qui rappelle à celle de la menthe (Vârban et al., 2009).

I.1.1- Nomenclature de plante

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

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

Nom italien : La nepitella.

Nom vernaculaire : Nabta, tourte, menta.

I.1.2- Systématique

La classification botanique de *Satureja calamintha* selon **Quezel et Santa (1963)** est :

Règne : Plantae

Sous règne : Plantes vasculaires

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Satureja*

Espèce : *S. calamintha*

I.1.3- Culture et répartition géographique

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

La sarriette pousse dans les lieux ensoleillés et bien drainés. Elle est souvent cultivée comme plante d'agrément (Iserin, 2001) et elle se rencontre dans les sous-bois mais aussi sur les terrains incultes, le bord des routes et dans le tell, surtout en montagne, jusqu'à 1500

mètres d'altitude (**Quezel et Santa, 1963**). Elle est originaire d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie), Asie tempérée : Ouest Asiatico (Turquie), du Caucase (Arménie Azerbaïdjan, Géorgie, Russie, Cis Caucasic, Daghestan) et en Europe (Royaume-Uni, Angleterre, Autriche, Hongrie, Suisse, Moldavie, Ukraine, Albanie, Bulgarie, Grèce, Italie, Yougoslavie, France, et Espagne) (**Quezel et Santa, 1963**).

I.1.4- Description botanique

C'est une petite plante vivace qui ne dépasse pas 40 cm de haut au parfum mentholé. Les tiges sont molles et velues, elles portent des feuilles opposées, à pétiole moyen, légèrement dentées. Les fleurs, visibles de juillet à octobre, d'un joli rose ou pourpre, sont groupées sur un pédoncule commun par deux ou trois (figure 1). Le fruit est formé de quatre akènes ovales et lisses (**Baba Aissa, 2000**).

Les inflorescences sont en cymes lâches et pédonculées. Le calice reste tubuleux à maturité. Les corolles roses ou violacées sont bien plus longues que le calice. Ce dernier est de 6-7 mm, à dents subégales, les inférieures à peine plus longues que les supérieures. La corolle est violet pâle et celle des fleurs hermaphrodites, est longue de 7-10 mm (**Quezel et Santa, 1963**).



Figure 1: Photo des parties aériennes de la plante *Satureja calamintha*
(**Labioud, 2016**)

I.1.5- Utilisations traditionnelles de la plante

Satureja calamintha est une plante considérablement utilisée en phytothérapie. En effet, une infusion des extrémités fleuries de cette plante est indiquée en cas de douleurs gastriques d'origine nerveuse, de diarrhée, de crampes abdominales et de toux (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Elle est utilisée aussi comme antifongique, antibactérien et antiviral quelques fois. Ainsi, elle possède des propriétés antiseptique et convient également dans l'anémie et dans l'atonie intestinale, c'est un bon antispasmodique (**Garnier et al., 1961**).

De plus, cette plante est préconisée pour traiter la fatigue psychique, asthénie, manque de concentration, arthrite, douleurs, problèmes de la libido, rhumatismes, cystite et stress (**Buronzo, 2008**).

Chapitre II :
Métabolites secondaires

II.1- Définition

Le terme **métabolite secondaire** est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Ils sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultant de réactions chimiques ultérieures) (**Laurent, 2012**).

II.2- Rôle

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui intervient dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits. Certains assurent une protection contre les radiations solaires (**Judd et al., 2002**).

II.3- Classification

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires (**Vigneau, 1985**). Ils sont classés en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Tableau I). Chacun de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Vigneau, 1985**).

Tableau I : Les différents composés des métabolites secondaires (**krief, 2003**)

Classe	Origine	Nombre de structure
Les terpènes	Isopentenylidiphosphate, une molécule à 5C (IPP)	25000
Les alcaloïdes	Acides aminés	12000
Les composés phénoliques	Voie de l'acide shikimique et acétate/malonate	8000

II.3.1- Les alcaloïdes

II.3.1.1- Définition

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils ont une structure complexe et leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils possèdent aussi une activité pharmacologique significative (**krief, 2003**).

II.3.1.2- Structure

La plupart des alcaloïdes sont des dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'aspartate, l'anthranilate, la phénylalanine, et la tyrosine. Ces acides sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés (**Cyril, 2001**).

II.3.1.3- Localisation

Les alcaloïdes sont stockés dans les cellules végétales aux niveaux de vacuole. Ils possèdent de nombreuses propriétés soit pour la plante, soit pour l'homme (**Bruneton, 2009**).

II.3.1.4- Classification

Il existe plus de six mille alcaloïdes mais ce chiffre est en constante augmentation (**Judd et al., 2002**), ils sont divisés en trois groupes:

- **Les alcaloïdes vrais**

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (**Badiaga, 2011**).

- **Les pseudo-alcaloïdes**

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (**Badiaga, 2011**).

Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (**Rakotonanahary, 2012**).

- **Les proto-alcaloïdes**

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (**Badiaga ; 2011**). En pratique, il est admis que ne sont pas des alcaloïdes : les amines simples, les bétalaïnes, les peptides, les acides aminés, les amino-sucres, les porphyrines, les alkylamines et les arylalkylamines (**Rakotonanahary, 2012**).

II.3.1.5- Rôle et propriétés

Les alcaloïdes ont un rôle important dans la défense de la plante contre les herbivores et les prédateurs. Ils agissent au niveau du système nerveux central comme dépresseur et antalgique (morphine), comme stimulant (caféine), certains jouent un rôle d'anesthésique

local (cocaïne) et d'autres antipaludiques (quinine) et certains (scopolamines) sont utilisés aussi pour prévenir les nausées et les vomissements.

D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes tels que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) (**Badiaga, 2011**). Ils sont aussi utilisés comme médicaments relaxants musculaires (**Hopkins, 2003**).

II.3.2- Les composés phénoliques

II.3.2.1- Définition

Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils sont des molécules hydrosolubles présentes partout dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de tous les végétaux. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**).

II.3.2.2- Structure chimique et classification

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (**Manallah, 2012**).

Selon leurs structures, les composés phénoliques sont divisés en deux classes : simples et complexes

a- Polyphénols simples

1- Les flavonoïdes

- **Définition**

Le terme flavonoïde (de **flavus**, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Bouakaz, 2006**). Les flavonoïdes constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havasteen, 2002**). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides. Ils sont aussi très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines, ou encore les racines des plantes) (**Fiorucci, 2006**).

- **Structure**

Les flavonoïdes possèdent un squelette carboné à 15 atomes de carbones constitués de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliées entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W-Erdman *et al.*, 2007) (Figure 2).

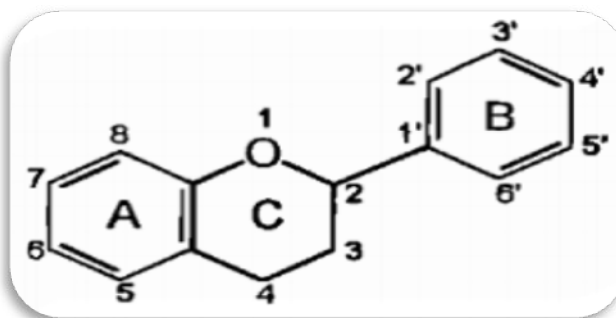


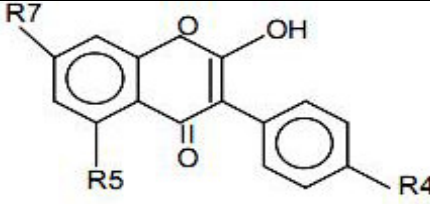
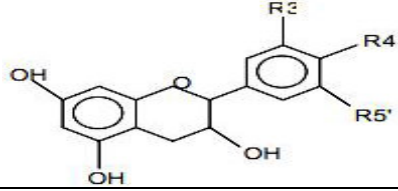
Figure 2: Structure des flavonoïdes (Tringali, 2001)

- **Classification**

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques (Tableau II).

Tableau II: Principales classes des flavonoïdes (Medic Sanic *et al.*, 2004)

Classes	Structures chimiques
Flavonols	
Flavones	
Flavanones	

Isoflavones	
Flavanols	

- **Rôle**

De nos jours, les propriétés pharmacologiques des flavonoïdes sont largement étudiées. L'activité la plus remarquable c'est qu'ils sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants, effets antiallergiques, antivirales, anti- tumorales, anti-inflammatoires, antioxydantes et anticancéreuses (**Meddleton et Kardasnam, 1993**).

Les flavonoïdes préviennent le diabète en inhibant l'aldose réductase (**Tringali, 2001**) et possèdent aussi des propriétés préventives sur les neurones (**Chen et al., 2008**), et sur les maladies cardiovasculaires dont leurs capacités de diminuer la perméabilité des capillaires et de renforcer leurs résistances (**Lahlah, 2008**).

2- Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2 pyrone (**Iwueke, 2008**). Ils existent différents types qui se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Madhavi, 1996**).

Les coumarines ont un squelette en C6-C3 et ils possèdent un atome d'oxygène hétérocycle dans le cadre de l'unité C3 (**Vermerris et Nicholson., 2006**) (Figure 3). Ils sont aussi cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes...

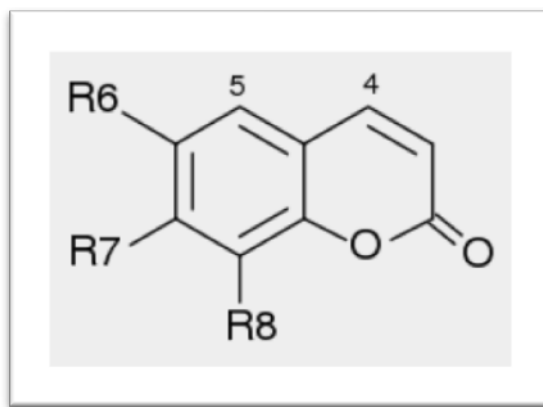


Figure 3: Structure de base des coumarines (Lesley, 1996).

b- Polyphénols complexes

1- Les tanins

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

Les tanins sont d'origine organique que nous les trouvons pratiquement dans tous les végétaux et dans toutes leurs parties (Hemingway, 1992). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Lo Cantore *et al.*, 2004). En plus, ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse ...etc. (Kansole, 2009).

2-Autres substances

- Les quinones

Les quinones peuvent être combinées à des sucres (anthroquinones). Elles se répartissent chez les végétaux supérieurs et proviennent de nombreux processus par différentes voies de biosynthèse. Le potentiel redox du couple quinone-hydroquinone est très important dans de nombreux systèmes biologiques. Les polyprénylquinones (quinones terpénoïdes) dérivent de l'acide 4-hydroxybenzoïque, leur noyau benzoquinone porte des chaînes polyisopréniques. Certains dérivés comme la plastoquinone et l'ubiquinone sont des transporteurs d'électrons. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou

rendent inutilisables. Ceci explique la variété d'effets antimicrobiens potentiels des quinones (**Sasaki et al., 1989**).

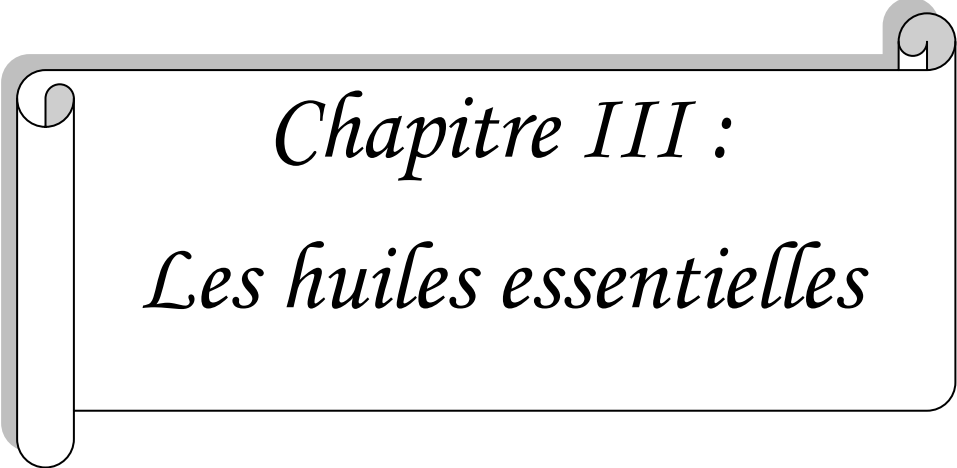
- **Les saponines**

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils se caractérisent par des effets tensio-actifs leur conférant la propriété de former des solutions moussantes lorsqu'ils sont dissous dans l'eau. Ils peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être stéroïdique ou triterpénique.

Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens. Les interactions mises en jeu avec les stérols de la membrane ont pour conséquence des propriétés hémolytiques et une activité spermicide de certaines molécules (**Clark et Russel Masson, 1987**).

- **Les lignanes**

Les lignanes sont les dimères des unités de phenylpropane (C_6-C_4) (**Benarous, 2009**). Ils constituent une classe importante de métabolites secondaire dans le règne végétal. La distribution botanique des lignanes est large: plusieurs centaines des composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les gymnospermes, les lignanes sont surtout rencontrés dans les bois alors que chez les Angiospermes, ils ont été identifiés dans tout les tissus et ont été découverts dans toutes les parties des plantes : les racines, les feuilles, les fruits et les graines (**Midoun, 2011**).

A decorative graphic of a scroll with a grey shadow, containing the chapter title in a black serif font.

Chapitre III :

Les huiles essentielles

III.1- Historique

Les huiles essentielles sont connues depuis des millénaires pour leur action bénéfique sur l'homme. Quatre mille ans avant J.C, Les égyptiens utilisaient déjà les huiles essentielles comme parfum dans les momifications des corps (**Lamaty et al., 1997**).

Selon **Ntezurubanza (2000)**, l'histoire de l'aromathérapie, qui est celle des huiles essentielles, peut se résumer en quatre époques suivantes :

- L'époque au cours de laquelle étaient utilisées des plantes aromatiques telles qu'elles ou sous forme d'infusion ou de décoction.
- Celle dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale. A cette époque, intervient la notion d'activité liée à la substance odorante.
- La troisième correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Apparaît alors le concept d'une huile essentielle qui aboutit à la création et au développement de la distillation.
- La dernière époque qui est la période moderne dans laquelle la connaissance des composants des huiles essentielles intervient et explique les effets physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques et de voies électroniques des arômes végétaux.

III.2- Définition

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux, naturels et donc des substances aromatiques naturelles, volatiles, liquides ou semi liquides, constituées de molécules aromatiques sécrétées par certaines plantes, arbres ou épices. Donc le terme « huile » provient du fait que les volatiles contenus dans le végétal sont visqueux et hydrophobes, et le caractère volatile de ces molécules confère souvent à l'huile essentielle un parfum très odorant. Ce dernier ne contient pas de corps gras.

De plus, elles sont des produits de composition généralement assez complexes, sensibles à l'effet de la chaleur (**Yahyaoui, 2005 ; Bruneton., 2009**) et ont des propriétés de se solubiliser dans les huiles végétales, minérales, les graisses, les alcools et l'éther (**Anton et Lobstein, 2005**).

III.3- Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont très répandues dans le règne végétal, nous les rencontrons surtout dans les phanérogames, mais quelques cryptogames en renferment également. Dans la plupart des cas, les essences se trouvent toutes formées dans les différents organes, elles sont

alors localisées soit dans les glandes des poils sécréteurs (Figure 4), soit dans des réservoirs intracellulaires ayant la forme des canaux (**Danielle Huard, 1999**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (**Bruneton, 1993**).



Figure 4: Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille
(**Svoboda et al., 2000**)

III.4- Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**AFSSAPS, 2008**). Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau, un indice de réfraction élevé et pour la plupart sont colorées exemple : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Les huiles essentielles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et absence de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée (**Couic et al., 2013**).

III.5- Rôle

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, leur rôle dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs (**Deroïn., 1988**).

- Les huiles essentielles sont employées pour Leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums. Des propriétés antiseptiques pour les poumons ou comme bain de bouche. Elles possèdent d'autres fonctions cités par **Daniel (2006) ; Hüsnü et Buchbauer (2010)** telles que :
- Dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires.
- Des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques et aussi des propriétés anti oxydantes.
- Un effet anesthésiant pour soigner les douleurs rhumatismales.
- Effet stimulant sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication.
- Effet sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif, relaxant et déstressant.
- Effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales.

III.6- Composition chimique

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir. Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

III.6.1-Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus 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 (C_5H_8) reconnue par **Wallach dès 1887** (Figure 5). L'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**). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (**Pibiri, 2006**).

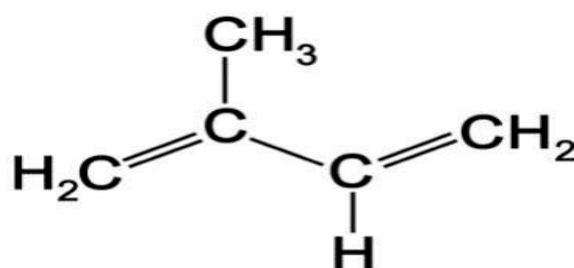


Figure 5: Formule développée de l'isoprène (**Malecky, 2005 ; Benaissa, 2011**)

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (exemple : l'essence de Térébenthine). Dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces derniers. Parmi eux, nous notons d'alcools (géraniol, linalol), d'esters (acétate de linalyle), de cétones (menthone, camphre, thuyone), les éthers, les phénols et les peroxydes (**Paris et Hurabielle, 1981; Svoboda et Hampson, 2000**).

III.6.1.1-Les monoterpènes

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est C₁₀H₁₆ (**Rahal, 2004**). Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques (α- et γ-terpinène, p-cymène) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes, 3-carène, camphène, sabinène) (Figure 6). Selon **Bruneton (1999)**, la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

III.6.1.2-Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes comportent trois unités d'isoprène, leur formule est C₁₅H₂₄ (**Belaiche, 1979**). Ils peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol),

monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (Figure 6) (**Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004**).

III.6.2-Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Paris et Hurabielle, 1981**). **Bruneton (1999)** considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de l'Acore (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol). Nous pouvons également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C6-C1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyle. Les lactones dérivées des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (Figure 6).

III.6.3-Les composés d'origines divers

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. 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. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc... (**Bruneton, 1999**).

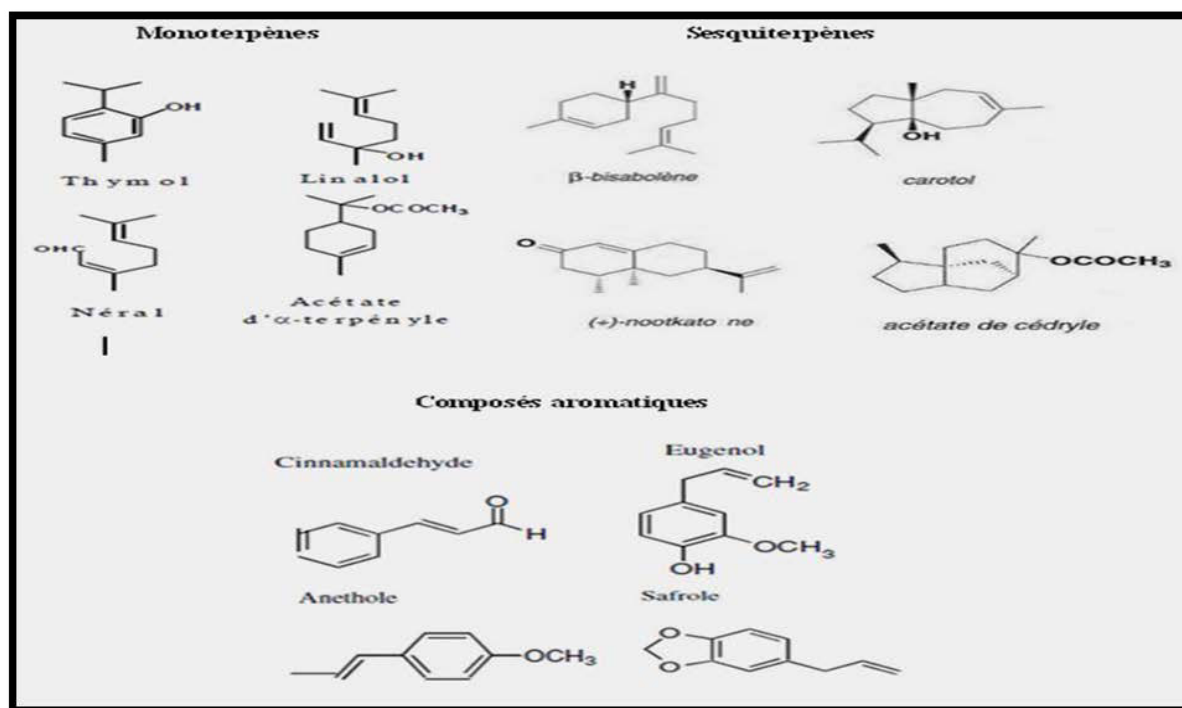


Figure 6: Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielle
(Bruneton, 1999)

III.7-Les facteurs influençant de la variabilité de la composition chimiques des huiles essentielles

La présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs (le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante) (Djibo et al., 2004). En effet, l'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité (Palà-paul et al., 2001), l'altitude et la nature du sol (Oliveira et al., 2005), sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles a été décrite. Certains auteurs se sont préoccupés d'autres facteurs tels que le cycle végétatif (Juteau et al., 2002), l'âge et l'organe végétal (Skoula et al., 1996), la période de récolte (Angelopoulou et al., 2002), les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Smallfield, 2001) qui influent sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (Sefidkon et al., 2007). La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition (Yayi et al., 2004).

III.8- Biosynthèse

La biosynthèse des huiles essentielles a comme point de départ la chlorophylle, « laboratoire central » de tout le monde végétal. Elle se fait suivant deux principales voies (Figure 7) (**Helander et al., 1998**).

III.8.1- Voie des terpénoïdes

Le matériau de base est L'IIP (isopentyl pyrophosphate), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi-alvéolaire. Il est dérivé de L'acétyl COA (Carrefour d'important), lui-même issu du PEP (Phosphoenolpyruvate) provenant directement du fructose. La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu de la même manière par la juxtaposition << Tête à queue >> d'unités isopréniques, unités pentacarbonées ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à 10 carbones (mono terpènes), puis à 15 carbones (sesquiterpènes), à 20 carbones (di terpènes). Le processus peut se poursuivre mais dans d'autres buts que la synthèse des essences (**Hammer et al., 2003**).

III.8.2- Voie des phenyl-propanoïdes

La synthèse des HE par la voie des phenyl Propanoïdes commence par un métabolite du fructose, le PEP (Phosphoenolpyruvate). Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique, les métabolites terminaux importants en thérapeutiques sont les acides aromatiques suivants : acide salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont la salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi les coumarines, quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles comme les tannoïdes et les flavonoïdes se trouvent dans cette voie (**Faleiro et al., 2003**).

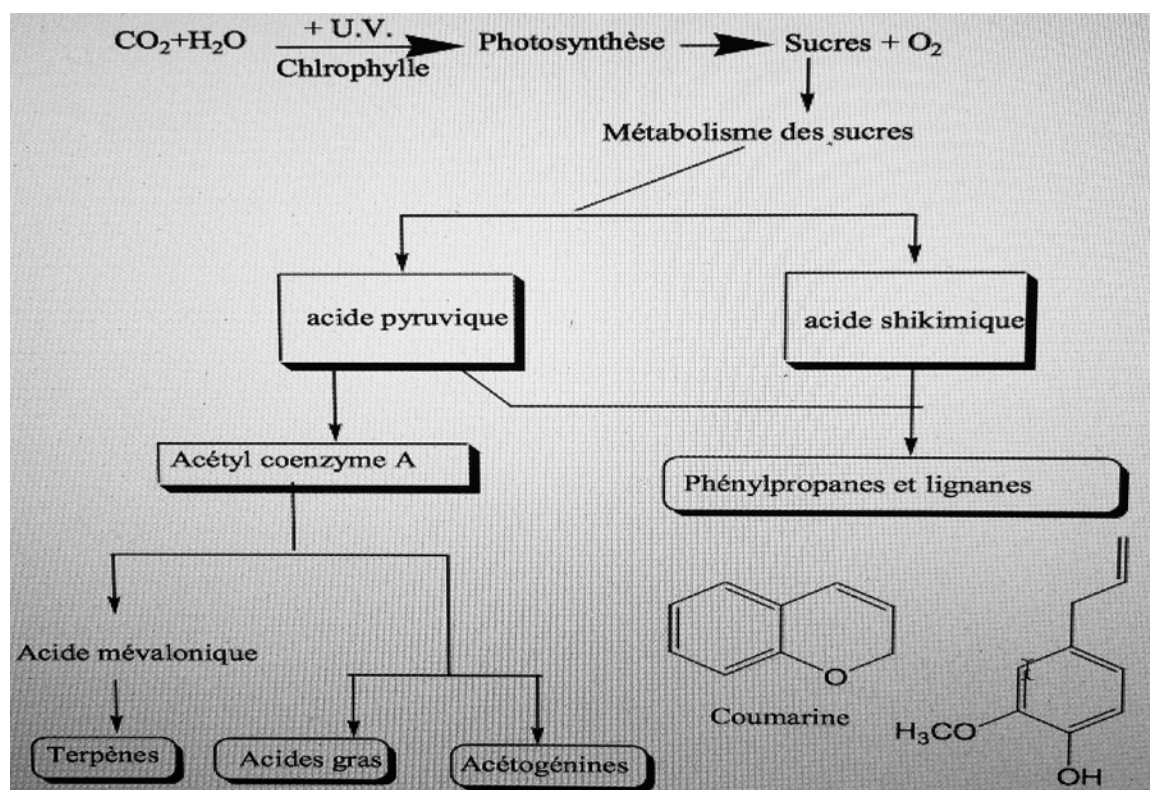


Figure 7: Biosynthèse des constituants chimiques des huiles essentielles (Mann., 1987)

III.9- Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentées, généralement comme « sans danger » mais ces substances naturelles sont aussi des composants puissants (Degryse et al., 2008).

Par leur composition chimique complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome (Benzeggouta, 2005).

Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature (Traoré, 2006). Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles du thym et de la lavande, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact ; à titre d'exemple, elles sont avérées cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées du cancer (Pibiri, 2006).

III.10- Procédés d'extraction

L'extraction a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal. Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation.

L'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation de la plante fraîche ou sèche reste les techniques la plus utilisée. On distingue les procédés suivants :

III.10.1-Hydrodistillation

Le principe de l'hydro distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux (**Chemat, 2009**).

III.10.2- Entraînement à la vapeur d'eau

Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). Nous recueillons alors un mélange de composition défini de ces deux produits (**Dastmalchi et al., 2009**).

III.10.3-Hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (**Chemat, 2009**).

III.10.4- Autres méthodes

III.10.4.1-Extraction par solvant

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants (**Chemat, 2009**).

III.10.4.2-Extraction par micro-onde sou vide

Dans ce procédé la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement de micro onde dans une enceinte dont la pression est réduite de façons séquentielle. L'huile est entraînée dans le mélange isotopique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traité, ce procédés est a l'avantage : très rapide, peu consommateur d'énergie. Ce procédés fournit un produit de qualité et de quantité supérieur à ce lui obtenu de l'hydrodistillation (**Bruneton, 1999**).

III.10.4.3-Extraction par CO₂ super-critique

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (**Chemat, 2009**).

III.11-Méthodes d'identification

III.11.1- Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit. La CPG est aussi une méthode d'analyse qualitative. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative (**Arpino et al., 1995**).

III.11.2- Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée, les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à

ceux de composés de référence, contenu dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales (**Adams, 2001**).

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

*Chapitre IV: Les
activités biologiques*

IV.1- Activité antimicrobienne

IV.1.1-Définition

Lorsque nous parlons de l'activité antimicrobienne, nous distinguons deux sortes d'effets : une activité létale (bactéricide) et une inhibition de la croissance (activité bactériostatique). Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. (**Haddouchi et al., 1999**).

IV.1.2- Principales substances antibactériennes

IV.1.2.1-Les antibiotiques

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

IV.1.2.2- Les huiles essentielles

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus, leur conférant ainsi diverses indications thérapeutiques. Les huiles essentielles antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses. Beaucoup de groupes de recherche ont étudié, par exemple, l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca altemifolia* contre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline «methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* » (**Carson et al., 1995 ; Chan et al. 1998 ; Dryden et al., 2004**).

IV.1.3-Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes

IV.1.3.1- Mode d'action contre les bactéries

Plusieurs travaux sont menés pour comprendre le mécanisme d'action des huiles essentielles (**Chang et al., 2001**). Certains auteurs suggèrent que ces produits naturels pénètrent à l'intérieur de la cellule bactérienne et sont susceptibles d'interférer avec son métabolisme cellulaire (**Marino et al., 2001**). D'autres avancent que les huiles essentielles perturbent le bon fonctionnement de la membrane plasmique et réagissent avec les sites actives des enzymes ou servent de transporteur de protons en réduisant la synthèse de l'ATP (**Ultee et al., 2002**). Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les

différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (Figure 8) (Oussalah *et al.*, 2006) :

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

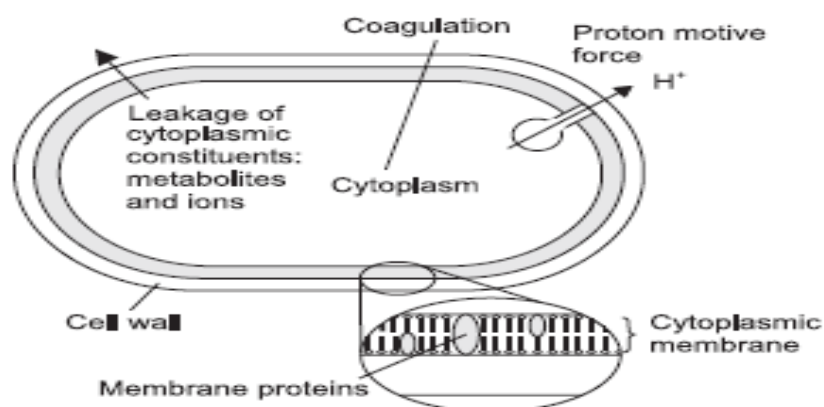


Figure 8: Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles (Burt, 2004)

IV.1.3.2 Mode d'action contre le champignon

L'étude de l'effet fongicide et fongistatique des huiles essentielles vis-à-vis de champignons pathogènes a fait l'objet de plusieurs travaux (Rasooli et Razzaghi Abyaneh, 2004). L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de champignon (Cox *et al.*, 2000).

IV.1.4 - Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles peut être estimé par deux méthodes principales: technique de l'aromatogramme (en milieu solide ou liquide) et technique de micro-atmosphère.

IV.1.4.1- Méthode de contact direct

Cette technique consiste à mettre en contact l'huile essentielle et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé (milieu solide) ou dans un bouillon (milieu liquide) (**Belaiche, 1979**).

IV.1.4.2- Méthode de diffusion sur gélose

C'est une méthode ancienne mais toujours d'actualité. Elle permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile. Ce test est réalisé par dépôt de l'huile essentielle, à l'aide de disques de cellulose imprégnés d'une quantité connue de l'huile essentielle (aromatogramme) ou de puits creusés dans la gélose et remplis par l'huile essentielle. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues sur gélose ensemencée. Cette méthode sert en général à la présélection de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles car:

- Le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HE, les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé.
- Le diamètre d'inhibition varie en fonction de la densité de l'inoculum et de l'épaisseur du milieu de culture. Il est donc nécessaire de standardiser ces conditions pour pouvoir comparer les résultats (**Belaiche, 1979 ; Hulin et al., 1998**).

IV.1.4.3- Méthode de dilution sur milieu liquide

Cette technique permet de donner au clinicien un chiffre correspondant à la dose minimale bactéricide de l'huile essentielle. Son principe consiste à faire agir en phase liquide des dilutions croissantes de l'huile, après adjonction d'un tensioactif sélectionné (**Audhoui et Belaiche, 1979**). A cause de la faible hydrosolubilité des huiles essentielles, les émulsifiants tels que, le Tween 80 (polysorbate 80), le Tween 20 (polyoxyéthylène 2-sorbitan monolaurate) et l'éthanol sont souvent utilisés pour augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans les milieux solides ou liquides (**Suppakul et al., 2003**).

IV.1.4.4- Micro atmosphère

Dans cette méthode, les disques imprégnés par l'huile essentielle sont déposés au centre du Couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (couvercle en bas). Cette méthode est appelée « Méthode de microatmosphères ». Le disque n'est donc plus en Contact avec le milieu gélosé. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (**Baser et Buchbauer., 2010**).

IV.2- Activité antioxydante

IV.2.1- Définition

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont la β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le Picnogénol. La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (**Bartosz, 2003**).

IV.2.2- Stress oxydatif et radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de 10^{-4} secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (**Beckman et Ames, 1998**).

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène ou radicaux primaires (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que l'oxygène singulier, le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite peuvent être des précurseurs de radicaux libres (**Cooper, 1997**).

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (**Aravodis, 2005**).

Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont : l'acide désoxyribonucléique (ADN) (modification des bases, cassure des brins), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Figure 9) (**Hu et al., 2005**). Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies : athérosclérose (**Harrisson et al., 2003**) la cancérogenèse, l'arthrite, l'asthme, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le mongolisme (**Cavin, 1999**), les maladies cardiovasculaires, arthrose, le diabète, chute de cheveux et le vieillissement (**Pastre et Priymenko, 2007**).

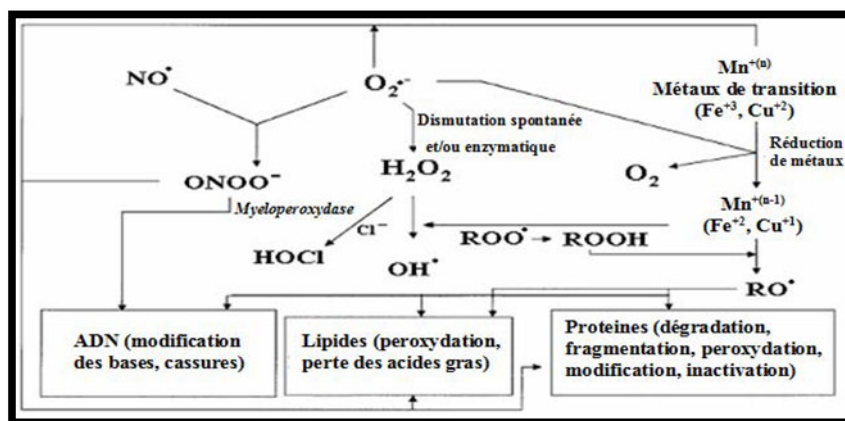


Figure 9: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR
(Kohen et Nyska., 2002).

IV.2.3- Les antioxydants

IV.2.3.1-Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Shahidi, 1997).

IV.2.3.2- Types d'antioxydants

a- Antioxydants enzymatiques

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

- **Le superoxyde dismutase (SOD)**

Accélère la dis mutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) (Piquet et Hubuterne, 2007).

- **Le catalase**

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

- **La glutathion peroxydase (GPX)**

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

b- Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatique, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Wang et al., 2003**). Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la β -carotène et la vitamine C (acide ascorbique). Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Koechlin-Ramonatoxo, 2006**).

- **La vitamine C (Acide ascorbique)**

Est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (**Restky et al., 1999**) Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH^- qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyl ($\text{AscH}^\bullet$), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée ($\text{Asc}^{\bullet-}$) (**Valco et al., 2006**).

c- Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et la vitamine E.

- **La vitamine E**

Est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'homme est comme protecteurs des structures membranaires et des

lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant. Elle prévient l'apparition d'hydropéroxydes en piégeant les radicaux. (Yoshida et *al.*, 1993).

IV.2.4-Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène Singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006). Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

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

*Partie II : Partie
expérimentale*

Chapitre I :
Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée-Université M'hamed Bougara Boumerdes ainsi qu'au niveau du Laboratoire centrale de la Police Scientifique-DPJ- Château neuf- El Abiar durant une période de trois mois allant du mois de Février jusqu'au mois de Mai 2017.

Elle a pour objectif de faire d'une part le screening phytochimique de la partie aérienne de la plante *Satureja calamintha* et d'autre part, l'extraction des huiles essentielles et évaluation de leurs activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne).

I- Matériel et méthodes

I.1- Matériel

I.1.1- Matériel non biologique

Les milieux de culture, verreries, appareillages, solutions ainsi que les solvants utilisés au cours de la réalisation de ce travail sont cités dans l'Annexe 1.

I.1.2- Matériel biologique

I.1.2.1- Souches microbiennes et milieux de culture

Les souches utilisées pour déceler l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *S. calamintha* sont pathogènes, elles sont fournies par l'Institut Pasteur d'Alger ainsi que le laboratoire de Biochimie Appliquée (Département de Biologie, Boumerdes) (Annexe 2). Leurs caractéristiques générales sont présentées dans le Tableau III.

Tableau III: Caractéristiques générales des microorganismes utilisés

Catégories		Nom des souches	Gram	Références
Bactéries		<i>Bacillus cereus</i>	+	ATCC 10876
		<i>Enterococcus faecalis</i>	+	ATCC 49452
		<i>Listeria innucua</i>	+	CLIP 74915
		<i>SARM</i>	+	ATCC 43300
		<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923
		<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
		<i>Klebseila pneumoniae</i>	-	ATCC 700603
		<i>Salmonella enterica</i>	-	ATCC 43972
		<i>Salmonella typhimurium</i>	-	ATCC 13311
		<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	-	ATCC 853
Champignons	Moisissures	<i>Aspergillus Niger 1</i>	/	/
		<i>Aspergillus Niger 2</i>	/	/
		<i>Aspergillus Flavus</i>	/	/
	Levures	<i>Candida Albicans</i>	/	ATCC 1024
		<i>Candida Tropicalis 1</i>	/	DIV13-Z087D0VS
		<i>Candida Tropicalis 2</i>	/	DIV13-Z087B0VS

Durant ce travail, nous avons utilisés les milieux de cultures suivants (Annexe 3) :

- Gélose Muller Hinton et bouillon nutritif pour la croissance bactérienne ;
- Gélose et bouillon Sabouraud pour le développement des champignons (moisissures et levures).

I.1.2.2- Matériel végétal

Le matériel végétal qui a servi comme matière première dans notre étude est représenté par la partie aérienne de la plante *S.calamintha*. Cette dernière a été identifiée au niveau de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

I.1.2.2.1- Récolte

La récolte de la plante *S.calamintha* a été réalisée dans la région de Jijel, durant la période allant du mois de Février jusqu'au mois d'Avril 2017.

I.1.2.2.2- Séchage

La matière végétale a été séchée dans l'étuve pendant 4 à 5 jours ou à l'air libre pendant 15 jours dans le but d'enlever l'eau qu'elle renferme et d'empêcher les contaminations par les insectes ou le développement des champignons à cause du taux d'humidité élevé.

I.1.2.2.3-Broyage

Le broyage permet de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire afin d'augmenter le contact solvant-échantillon et optimiser l'extraction des substances bioactives. Après le séchage, la partie aérienne de la plante a été broyée à l'aide d'un moulin électrique jusqu'à l'obtention presque d'une poudre, qui sera conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés jusqu'à son utilisation (Figure 10).

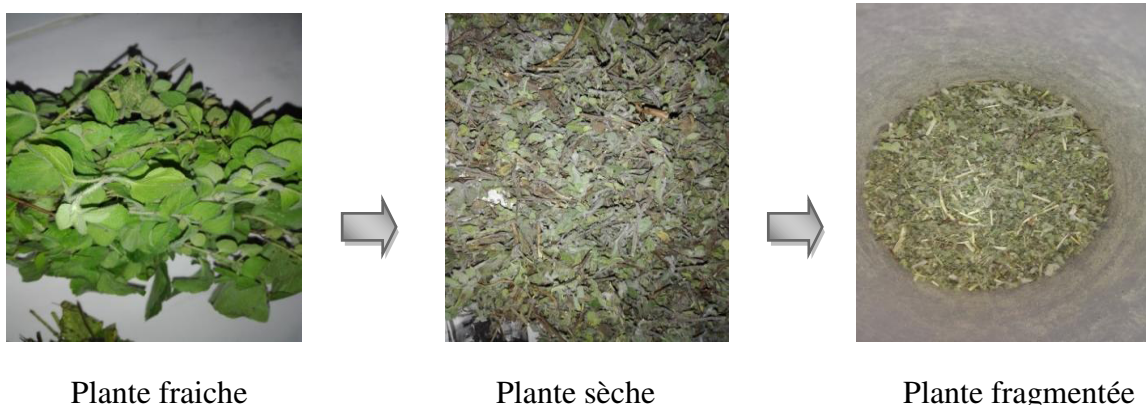


Figure 10: Photo de la plante fraîche, sèche et fragmentée

I.2- Méthodes

L'ensemble des méthodes et des étapes de ce travail sont résumés à travers le diagramme porté par la figure suivante :

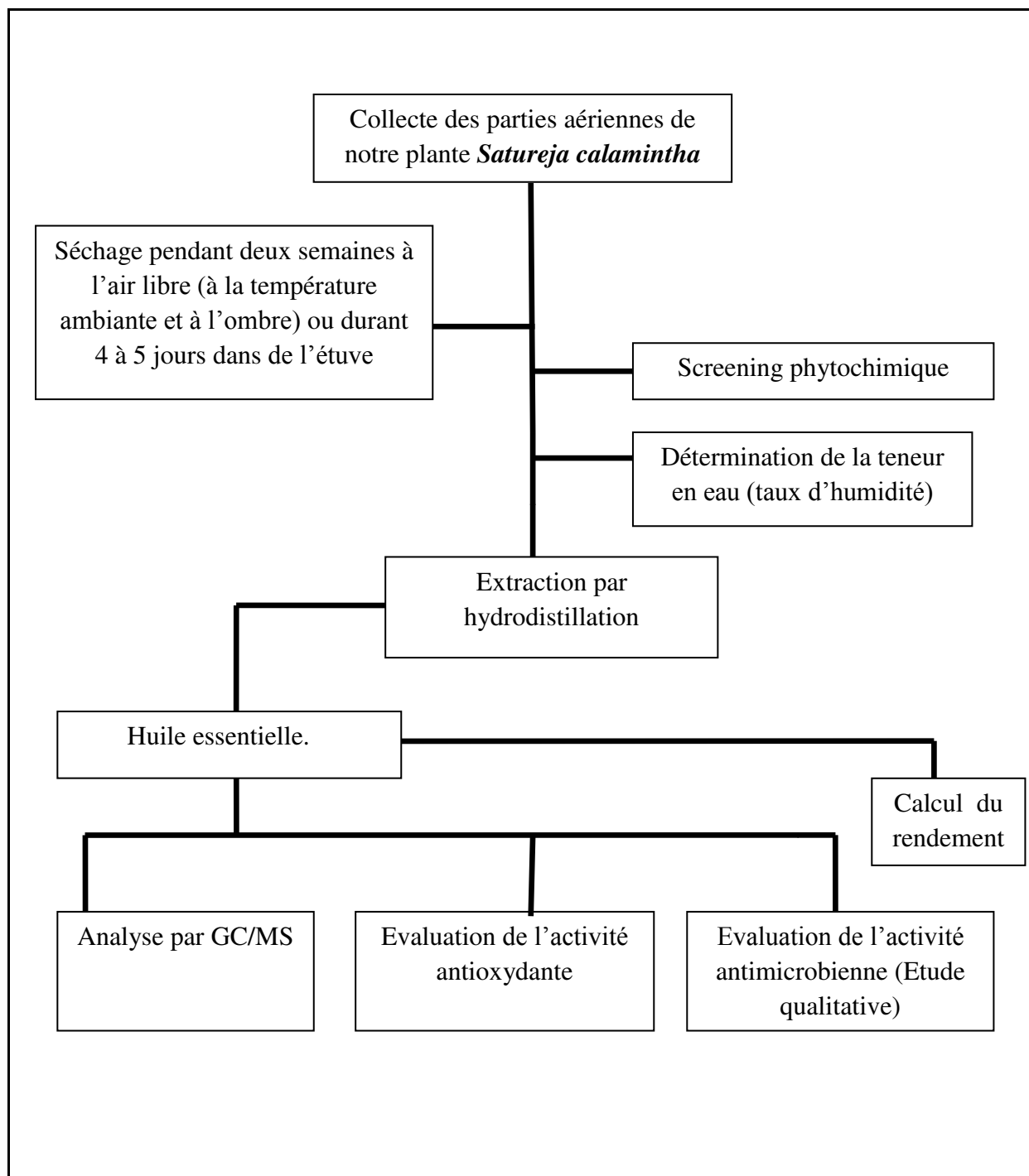


Figure 11: Diagramme représentant les différentes étapes de l'extraction ainsi que les analyses effectuées sur l'huile essentielle de *S. calamintha*

I.2.1- Screening phytochimique

Le but de ces tests est la caractérisation des molécules bioactives contenues dans la partie aérienne de *S.calamintha*. Ils sont basés sur des réactions colorimétriques et de précipitation, la mise en évidence de ces différentes classes de métabolites secondaires que constitue la plante ,nous a permis d'avoir une idée globale sur ces actions pharmacologique.

Ce screening a été réalisé sur la poudre de *S.calamintha*, sur son infusé, sur son décocté ou sur sa macération en se référant aux techniques décrites par **Bruneton (1999)**.

❖ Préparation de l'infusé

Environ 10 g de la poudre végétale sont infusés dans 100 ml d'eau bouillante et gardés au repos pendant 30 min, puis ils sont filtrés sur une gaze. Le filtrat ainsi obtenu est l'infusé à 10 %.

❖ Préparation de la macération

10 g de la poudre végétale et 100 ml d'eau distillée sont laissés pendant 24h, ensuite sont filtrés sur une gaze. C'est le macéré à 10%.

❖ Préparation du décocté

10 g de la poudre végétale sont portés à l'ébullition avec 100 ml de l'eau distillée pour quelques minutes (2 à 15 min), puis laissés se refroidir et filtrer sur une gaze.

I.2.1.1- Recherche des flavonoïdes

❖ Les flavonoïdes libres

A 1 ml de l'infusé ajouter quelques gouttes de HCl concentré et quelques milligrammes de Mg. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

❖ Les anthocyanes

L'identification des anthocyanes a été faite en ajoutant 10 gouttes d'ammoniaque à 5 ml d'infusé de la poudre végétale à 10 %. La réaction donne une coloration bleu verdâtre en présence d'anthocyanes.

❖ Les leucoanthocyanes

2 g de la poudre végétale sont introduits dans 20 ml d'un mélange de propanol /Acide chlorhydrique (1/1). La préparation est placée dans un bain-marie pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

I.2.1.2-Recherche des tannins**❖ Les tannins totaux**

Nous avons pris 5 ml d'infusé à 10 % aux quels, nous avons ajoutés quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5 %. La réaction donne une coloration bleu noire ou verdâtre en présence des tannins.

❖ Les tannins catéchiques

5 ml d'infusé à 10 % avec 1 ml d'HCl sont portés au chauffage pendant 15 min. En présence des tannins catéchiques, il y aura une formation d'un précipité rouge insoluble dans l'alcool isoamylique.

❖ Les tannins galliques

Nous avons introduit à l'aide d'une pipette graduée 5 ml d'infusé dans une fiole puis nous avons rajouté 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 à 1 %. Après agitation, une coloration bleu foncée apparait en présence des tanins galliques.

I.2.1.3-Recherche des glycosides

A 2 g de la poudre végétale, nous avons ajouté 10 ml de H_2SO_4 . La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glycosides.

I.2.1.4- Recherche des quinones**❖ Quinones libres**

Dans un bécher, 2 g de la poudre humectés par 2 ml d'acide chlorhydrique 1N sont mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3 h. Le mélange est filtré puis agité avec 5 ml d'ammoniaque ½. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des quinones libres.

I.2.1.5- Recherche des composés réducteurs :

20 gouttes de réactif de Fehling (Annexe 4) sont ajoutées à un 1ml d'infusé à 10 % et 2 ml d'eau distillée. Une réaction positive est caractérisée par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique.

I.2.1.6- Recherche des oses et holosides

1 ml du décocté à 10 % et 5 ml d'éthanol donnent un aspect floconneux en présence des mucilages.

I.2.1.7- Recherche des alcaloïdes

Le mélange de 5 ml d'infusé, 2 ml de HCl et 1 ml du réactif de Dragendorff (Annexe 4) donne un précipité rouge ou orange.

I.2.1.8- Recherche des coumarines

La présence de coumarines est révélée après l'ajout de 5 ml de l'infusé avec 0.5 ml de NH_4OH à 25 % en observant de la fluorescence sous une lampe ultra violette (UV) à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence des coumarines.

I.2.1.9-Test de saponines

Nous avons ajouté un peu d'eau distillée à l'infusé, la solution est fortement agitée. Puis, le mélange est laissé au repos pendant 15 min. La persistance de la mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence des saponines.

I.2.1.10-O-hétérosides

5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de HCl sont ajoutés aux résidus de la poudre végétale épuisés précédemment par CHCl_3 . Puis, ce mélange est chauffé pendant 15 min et refroidi en suite sous courant d'eau froide. Après filtration, nous avons ajouté 2,5 ml de CHCl_3 et soutiré la phase organique ainsi formé. Il y aura l'apparition d'une coloration marron après addition de 0,5 ml de NH_4OH dilué indique la présence de O-hétérosides.

I.2.1.11- C-hétérosides

10 ml d'eau distillée et 1ml de la solution de FeCl_3 à 10 % sont ajoutés à la phase aqueuse obtenue précédemment avec les O-hétérosides. Ce mélange est chauffé pendant 30 min au bain marie puis refroidi sous courant d'eau froide. La phase organique est séparée après agitation avec l'addition de 5 ml CHCl_3 et 1 ml de NH_4OH dilué à 50 %. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de C-hétérosides.

I.2.2- Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. Nous avons procédé à la dessiccation du matériel végétal à la température de $103^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en eau est définie comme étant la perte du poids lors de la dessiccation (Audigié et al., 1978). Elle est déterminée par le calcul de la différence du poids avant et après la dessiccation selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

- H (%) : Teneur en eau.
- P_1 : Poids de la plante fraîche (g).
- P_2 : Poids de la plante après dessiccation (g).

I.2.3- Extraction des huiles essentielles

I.2.3.1- Extraction par hydrodistillation

- **Principe**

Le principe de ce mode d'extraction consiste à immerger la matière végétale dans l'eau bouillante, les vapeurs passant de bas vers le haut font que les poches à essence soumise à l'action de l'humidité et de la chaleur, éclatent et libèrent les HE qui sont devenus volatiles. Ces composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau produite par le bain aqueux, en traversant un réfrigérant à l'eau où ils sont récupérés dans un récipient après décantation (Figure 12).



Figure 12: Dispositif de l'hydrodistillation à l'échelle de laboratoire

- **Mode opératoire**

L'extraction des HE est réalisée en utilisant un appareil de type hydrodistillateur. Une quantité de 50 g de la plante sèche est introduite dans un ballon rempli avec 600 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3h, le ballon ainsi chauffé produit de la vapeur chargé de produits volatils, en traversant un réfrigérant, se condense et se recueille

dans une ampoule à décanter ou s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique, cette dernière contient les HE qui se séparent de l'eau par différence de densité (Figure 13).

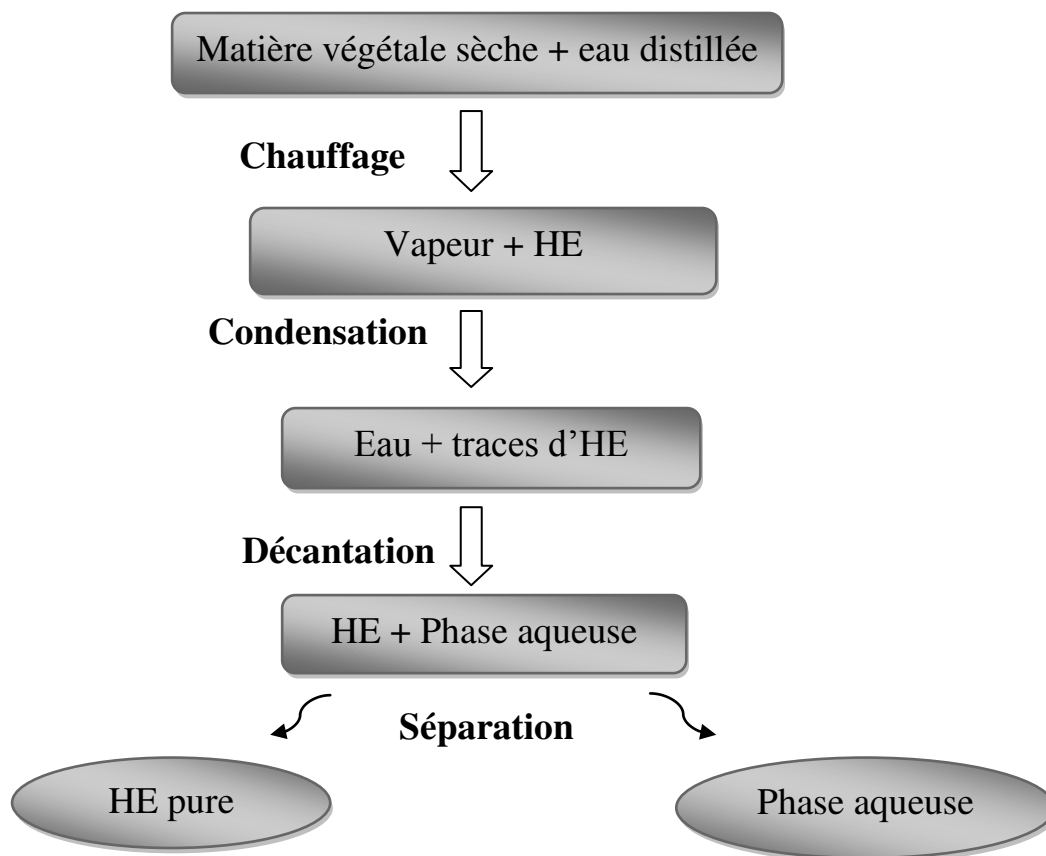


Figure 13: Diagramme représentant les différentes étapes de l'extraction des huiles essentielles de la plante *S. calamintha*

I.2.3.2- Conservation des huiles essentielles

Les HE sont récupérées et mises dans des petits flacons opaques, puis conservées au réfrigérateur à 4°C.

I.2.3.3- Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle (Rd) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite (Me) et la masse de la matière végétale sèche utilisée (Ms) (AFNOR, 1986).

- **Mode de calcul**

Le rendement est toujours exprimé en pourcentage et donné par la formule suivante :

$$Rd = Me/Ms \times 100$$

- Me : Masse de l'HE (g).
- Ms : Masse de la matière végétale sèche (g).
- Rd : Rendement en HE (%)

I.2.4- Identification des huiles essentielles par Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse GC/MS

- **Mode opératoire**

C'est une méthode d'analyse par un Chromatographe en phase gazeuse couplée au Spectromètre de masse, GC/MS (Perkin Elmer de marque CLARUS 500), qui consiste en la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires. Elle donne des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon analysé et très utile pour les analyses de traces.

- **Système et appareillage**

La chromatographie utilisée est un Perkin Elmer de marque CLARUS 500 muni d'un injecteur « split/splitless », associé à un spectromètre de masse, (Quadripôle) de Perkin Elmer. L'injection des échantillons s'est faite de manière automatisée. La colonne chromatographique retenue pour réaliser ces essais est une Elite, 5MS (5% Phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm).

- **Détection : Spectrométrie de Masse (MS)**

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions à l'état gazeux, à partir de l'échantillon. L'analyse des ions, c'est-à-dire leur séparation en fonction de leur rapport masse/charge, est réalisée grâce à l'action d'un champ magnétique.

- **Identification des composés**

Les composés des huiles correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une base de données informatisées (Wiley), quand le pourcentage de comparaison est supérieur de 95% on peut dire que c'est la même molécule.

- **Conditions opératoires pour GC**

- Volume d'injection : 1 μ l
- Passeur d'échantillon : Automatique.
- Température d'injection : 250°C
- Température du Détecteur : 310°C
- Gaz vecteur : Hélium.
- Débit de gaz vecteur : 0,5 ml/min

- **Conditions opératoires MS**

- Mode d'ionisation : Impact électronique
- Délai de solvant : 5,9 mn
- Balayage de Scan entre 50 à 800 m/z

- **Programmation de température :**

- ❖ Température initiale : 100°C (0,5 min)
- ❖ Température finale : 280°C (20 min)
- ❖ Augmentation de 8°C/min

I.2.5- Evaluation des activités biologiques

I.2.5.1- Etude de l'activité antioxydante

- **Piégeage du radical libre DPPH**

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable : le 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (Figure 14). La réduction du radical libre (DPPH) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence d'un donneur d'hydrogène (**Burit et Bucar, 2000**). Le DPPH est initialement violet, il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparait (couleur jaune). Cette décoloration est représentative de la capacité des huiles essentielles à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de différentes substances des huiles essentielles (**Molyneux, 2004**).

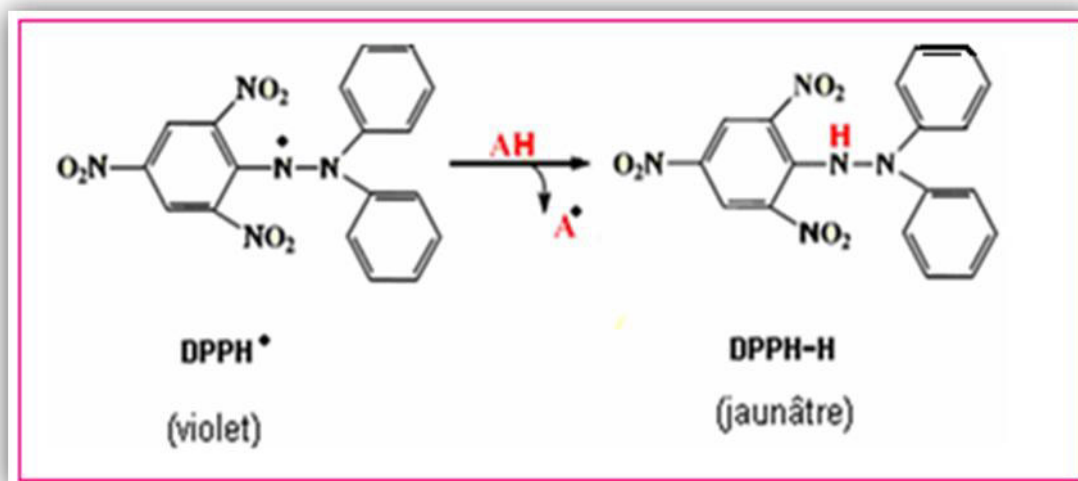


Figure 14: Réduction du radical libre DPPH (Molyneux ,2004)

- **Mode opératoire**

a- Préparation des solutions

La solution de DPPH à 60 mM est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol puis elle est conservée à 4°C à l'obscurité. Des solutions (1 mg/1 ml de méthanol) de l'huile ou standards (acide ascorbique, BHT) sont fraîchement préparées.

A partir de chaque solution mère, une gamme de dilution est préparée (0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml et 0,1 mg/ml).

b- Essai au DPPH

Dans chaque tube de dilution déjà préparée, nous avons prélevé 50 µl de l'HE et l'ajouté à 1950 µl de solution méthanolique de DPPH. Après agitation, le mélange réactionnel est incubé dans l'obscurité pendant 30 min à la température ambiante. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre contre le blanc qui est constitué de 2 ml de méthanol.

Le control positif est présenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique (vitamine C) et le BHT don l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

c- Expressions des résultats

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs Control}} \times 100$$

- Abs contrôle : Absorbance du contrôle (solution de DPPH sans HE).
- Abs échantillon : Absorbance du DPPH en présence des HE.

I.2.5.2- Activités antimicrobiennes

a-Evaluation de l'activité antibactérienne

- Mode opératoire

1-Revivification des souches microbiennes

La revivification de souches microbiennes est réalisée à l'aide d'une anse de platine par l'inoculation des colonies bactérienne dans un milieu liquide (Bouillon Nutritive BN) (Figure 15), les cultures sont incubées ensuite à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.



Figure 15: Photo des souches bactériennes revivifiées dans le BN

2- Repiquage des souches microbiennes

Les bactéries étudiées sont repiquées dans le milieu Muller Hinton (Annexe 3) par la méthode de strie, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Cette étape permet l'obtention d'une culture jeune des colonies isolées qui vont servir à préparer l'inoculum.

3- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir des colonies jeunes de bactéries. A l'aide d'une anse de platine, quelques colonies ont été prélevées puis introduites dans des tubes à essai contenant 10 ml de l'eau physiologique stérile, puis ces tubes sont agités au vortex pendant quelques secondes (Figure 16). La lecture de sa densité optique (DO) a été effectuée à une longueur d'onde à 625 nm par spectrophotomètre, l'absorbance doit être entre 0,1 et 0,2.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop concentré (Labiod, 2016).

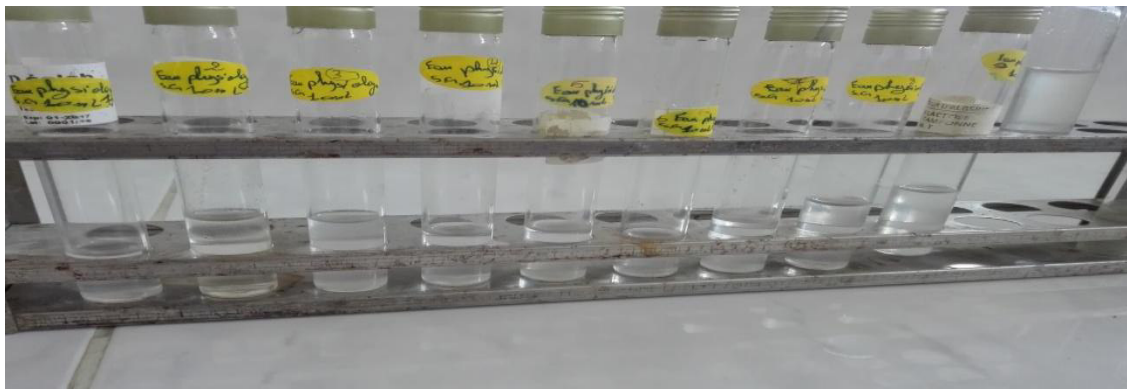


Figure 16: Photo de la préparation de l'inoculum

4- Aromatogramme et antibiogramme

15 ml de gélose MH en surfusion sont coulés dans les boîtes de Pétri, après refroidissement et solidification sur la paillasse, 200µl de chaque suspension bactérienne de concentration préparée à partir de culture jeune sont étalés à la surface du milieu gélose à l'aide d'une pipette pasteur. Puis avec une pince stérile, des disques de papier Wattman d'environ 6 mm sont prélevés puis imprégnés avec 15 µl de l'huile essentielle pure et sont ensuite déposés sur la gélose en trois répétitions (Figure 17) (Murray *et al.*, 1995 ; Gulluce *et al.*, 2006). Les boîtes sont fermées avec du parafilm et conservées à 4°C pendant 2h (Karaman *et al.*, 2001). Elles sont mises à l'étuve à température de 37°C pendant 24 heures. Nous avons utilisé le test de sensibilité aux antibiotiques pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de l'huile brute, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés de l'huile. Nous avons utilisé deux antibiotiques différents (Amoxicilline et Chloramphénicol).

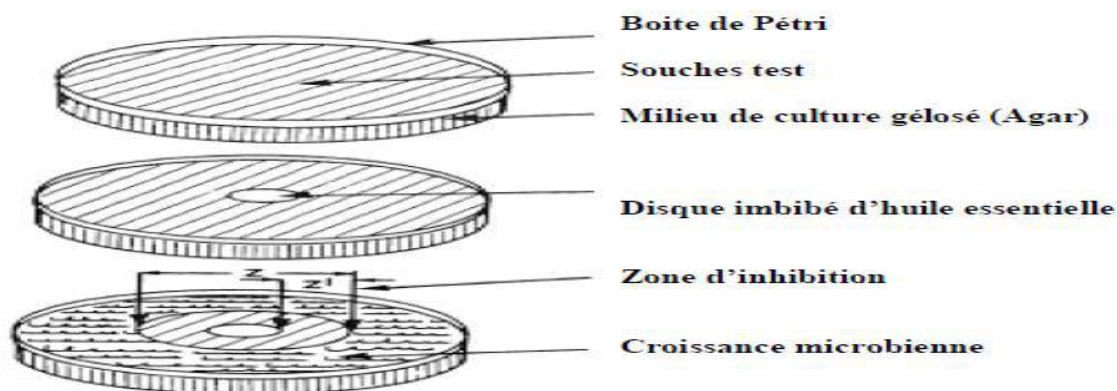


Figure 17: Schéma de la méthode des antibiogrammes sur boîte de pétri (Pibiri, 2005).

6- Lecture

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (Figure 18) et peuvent être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles (Ponce et *al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

b- Evaluation de l'activité antifongique

1- Les levures

La même procédure de l'activité antibactérienne a été suivie pour tester l'activité des levures, sauf le milieu de culture utilisé dans ce test est Sabouraud et la durée d'incubation des souches est 48 h. En plus l'antifongicide utilisé est le Fongenal.

2-Les moisissures

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

• Mode opératoire

Nous avons liquéfié la gélose Sabouraud à 100 °C. Après son refroidissement à 45°C, 30 µl de l'huile essentielle sont introduites dans des tubes à essai contenant 13,5 ml de ce milieu culture. Nous avons mélangé ensuite ces tubes et les coulé dans des boîtes de Pétri.

Après solidification de la gélose, nous avons déposé les disques au milieu des boîtes, prélevé à l'aide d'une anse de platine d'un fragment de moisissure (Figure 19) et le déposé sur les disques. Les boîtes sont fermées avec du para film et conservées à 4°C pendant 2h .Elles ont été mises dans l'étuve à une température de 28°C pendant 5 jours. Le même test a été effectué pour les témoins et le standard (Nystatine).

*Aspergillus niger 1**Aspergillus niger 2**Aspergillus flavus*

Figure 19: Photo originale des souches fongiques (moisissures)

• Expression des résultats

L'effet antifongique de notre HE est déterminé par la mesure de taux d'inhibition de la croissance après incubation et comparé à celui du témoin suivant la formule suivante :

$$I \% = [(DC-DT)/DC] \times 100$$

- **I(%)** : Inhibition de la croissance fongique en pourcentage.
- **DC** : Diamètre de la croissance mycélienne dans un milieu sans HE (témoin) (mm).
- **DT** : Diamètre de la croissance mycélienne en présence d'huile essentielle (mm).

Selon **Singh et al., (2008)** l'huile est dite :

- Très active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible.

- Active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible.
- Moyennement active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite.
- Peu ou pas active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante.

c- Etude statistique

1- Moyennes arithmétiques

$$m = \frac{\sum X_i}{n}$$

- m : moyenne de chaque lot.
- n : effectif du lot.
- Xi : Valeurs individuelles de chaque paramètre.

2- Variance et écart type

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - m)^2$$

- S^2 : variance de la variable, donc l'écart type d'une variable x est défini comme suit :

$$S_x = \sqrt{S^2}$$

Remarque : la zone d'inhibition des souches est représentée en $m \pm S^2$.

3- Test de Student

Les résultats sont calculés à l'aide d'un logiciel Excel. « T » calculé est comparé au « T » théorique lue sur la table de Student, Si T_c est inférieure à la valeur lue dans la table « t » pour un degré de liberté d.d.l= $N_1 + N_2 - 2$ et le risque 5%, la différence n'est pas significative. Dans le cas contraire elle est significative.

Les résultats ont été faits en 3 répétitions. A partir de test de Student par Excel si :

- $P > 0,05$, le résultat est non significatif
- $P < 0,05$, le résultat est peu significatif
- $P < 0,01$, le résultat est significatif
- $P < 0,001$, le résultat est très significatif
- $P < 0,0001$, le résultat est hautement significatif

Chapitre II :
Résultats et discussion

II- Résultats et discussion

II.1- Screening phytochimique

Avant d'étudier les composés volatiles de *S.calamintha*, nous avons procédé aux tests phytochimiques sur la partie aérienne de cette plante (feuilles et tiges) afin d'avoir une idée globale sur sa composition en substances chimiques (Tableau IV).

D'après ce tableau, nous remarquons que la plante est riche en douze groupes de composés chimiques tels que les flavonoïdes libres, les anthocyanes, les tanins totaux et galliques, les glycosides, les saponosides, les composés réducteurs, les oses et holosides, les alcaloïdes, les coumarines, les O-hétérosides et les C-hétérosides tandis qu'elle est dépourvue des leucoanthocyanes, des tannins cachectiques, des quinones libres et des saponines.

Tableau IV: Résultats de screening phytochimique de la plante *S.calamintha*

Métabolites	Réactions	Résultats	Photo
Flavonoïdes libres	Rouge	+++	
Anthocyanes	Bleu verdâtre	++	
Leucoanthocyanes	Rouge	-	
Tannins totaux	Bleu noire	+++	

Tannins catéchiques	Rouge	+	
Tannins galliques	Bleu foncée	+++	
Glycosides	Rouge brique	++	
Saponosides	Précipité	+	
Quinones libres	Rouge	-	
Composés réducteurs	Rouge brique	+++	

Oses et holosides	Aspect floconneux	+	
Alcaloïdes	Précipité rouge ou orange	+++	
Coumarines	Fluorescence intense	+++	
O-hétéroside	Marron	+++	
C-hétérosides	Rouge	+++	

(-) : Absence, (+) : Présence en faible quantité, (++) : Présence en quantité moyenne, (+++) : Présence en quantité importante.

Cette composition varie d'une espèce à l'autre et parfois au sein d'une même espèce. **Benkhedimallah et Kismoun (2014)** ont caractérisé cette plante provenant de la même région et ils n'ont trouvé que quatre métabolites secondaires; les flavonoïdes, les tannins totaux, les alcaloïdes, les saponosides et les quinones. Au contraire, **Bougandoura (2011)**, a travaillé sur la même espèce récoltée de la région de Tlemcen, elle a signalé d'une part, la

présence des saponosides, des coumarines, des tannins totaux et des flavonoïdes libres et d'autre part, l'absence des anthocyanes, des leucoanthocyanes et des composés réducteurs. **Labiod (2016)**, a aussi étudié cette même espèce récoltée de deux régions différentes (Annaba et Jijel), elle a trouvé des coumarines, des flavonoïdes libres, des saponosides et des tannins totaux en marquant l'absence des alcaloïdes et des composés réducteurs. Cette différence de composition pourrait être liée à la variation des conditions climatiques et géographiques.

En effet, nous constatons l'abondance de divers métabolites secondaires ce qui confère à cette plante des propriétés biologiques très importantes. Selon **Smythies (1998)**, les tannins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides. Ils ont aussi la propriété de tanner la peau par création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène. Ils permettent aussi de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections (**Iserin, 2001**).

En plus, les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, antivirale, antibactérienne, tinctoriale, les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques (**Pietta, 2000**). De même, la présence des saponosides en quantité importante confère aux plantes des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oedemateuse (**Roux et al., 2007**). Les oses et les holosides possèdent un rôle dans les premières étapes de la glycolyse (catabolisme oxydatif) et des intermédiaires de la photosynthèse (**Touitou, 2005**).

II.2- Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau dans la plante *S. Calamintha* a donné un taux d'humidité égal à $82,12 \% \pm 0,006$ (Annexe 5). Cette valeur est proche à celle obtenue par **Labiod (2016)** correspondant à 79,33 % pour la plante récoltée de la région d'Annaba par contre elle est supérieure à celle obtenue pour la plante provenant de Jijel (74,66 %). Cette variation pourrait être attribuée aux conditions climatiques.

II.3- Huiles essentielles

II.3.1- Propriétés organoleptiques

La partie aérienne de la plante a été soumise à une hydrodistillation pendant 3h. Les extraits ainsi obtenus sont des substances hautement volatiles, d'une odeur aromatique, douce mentholée et de couleur jaune pâle (Figure 20).

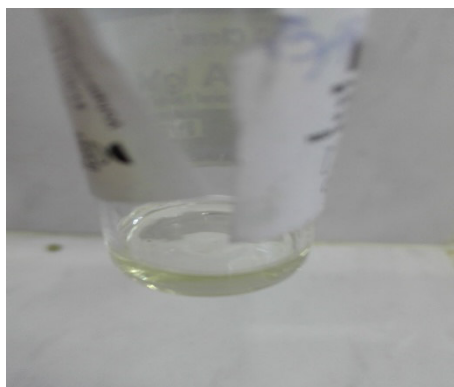
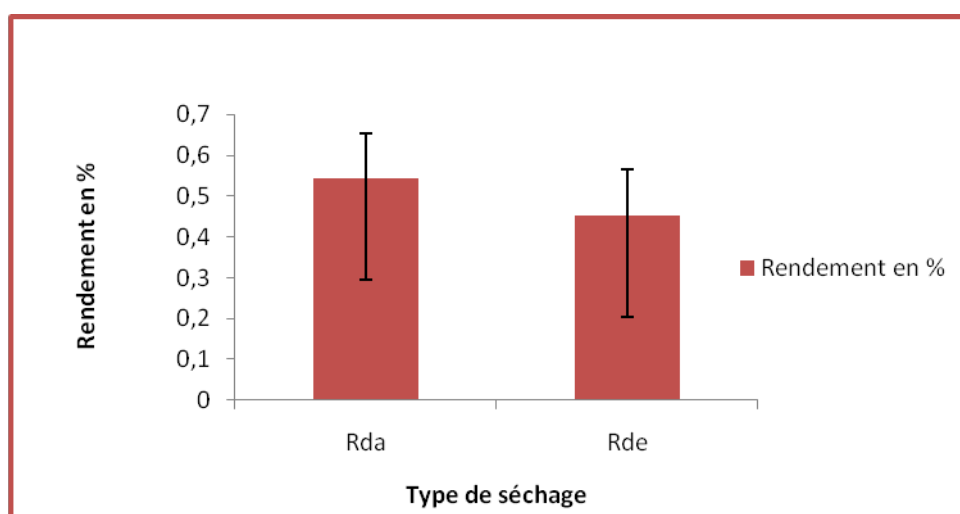


Figure 20: Photo originale de l'huile essentielle de la plante *S.calamintha*

II.3.2- Rendement d'extraction

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé par rapport à la plante sèche (Figure 21), il est estimé à $0,543 \% \pm 0,112$ dans le cas où la plante a été séchée à l'air libre tandis qu'il est de $0,453 \% \pm 0,258$ suite à un séchage à l'étuve (Annexe 6). Cette différence pourrait être due à l'effet nocif de la température de l'étuve sur les substances volatiles.



Rda : Rendement après séchage à l'air libre

Rde : Rendement après Séchage à l'étuve

Figure 21: Rendement d'extraction en huile essentielle

Des résultats similaires ont été trouvés par **Panizzi et al., (1993)**, qui ont travaillé sur cette même espèce provenant de Molina di Quosa (Italie), récoltée durant le mois de juillet, d'un sol de nature rocheuse, sec et calcique situé à une hauteur de 300 m par rapport au niveau de la mer contrairement à ceux obtenus par **Bensouici et al., (2013)** qui ont récolté cette même espèce de la région de Jijel et ils ont marqué un rendement de 2,1 %.

Plusieurs auteurs ont rapporté un rendement élevé. **Satrani et al., (2001)** ont fait des études sur la même espèce provenant du Maroc et ils ont enregistré un rendement correspondant à 1,6 %. De plus, en Algérie, **Kerbouche et al., (2013)** ont récolté *S.calamintha* de la région d'El-Affroun (Blida). Ils ont trouvé un rendement de 1,4 %. Par contre, **Labiod (2016)**, a travaillé sur cette même plante récoltée de deux zones différentes et elle a obtenu un rendement de 2,54% pour la zone d'Annaba contre un rendement de 1,48% pour la zone de Jijel. Cette variabilité du rendement montre que certains facteurs tels que : la nature du sol, le climat, l'altitude, la qualité de la matière végétale utilisée peuvent influencer la sécrétion des huiles essentielles dans une plante.

II.4- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par GC/ MS

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les surfaces des principaux composants, leurs pourcentages ainsi que leurs temps de rétention sont représentés dans la Figure 22 (Annexe 7).

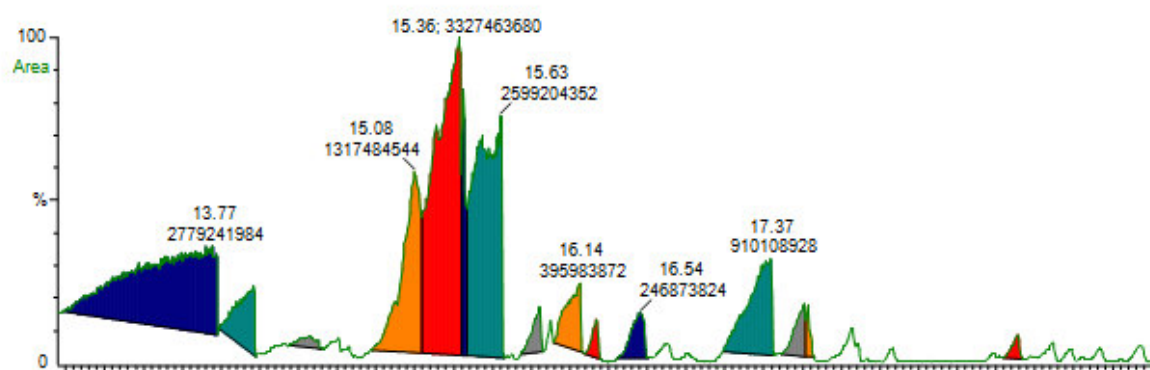


Figure 22: Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. calamintha*

Les spectres de masse des constituants extraite à partir de la plante *S. calamintha* sont comparés avec ceux contenus dans la base de données (Wiley) (Annexe 8). Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le Tableau V.

Tableau V: Résultats d'analyses chromatographiques (GC/MS) des fractions volatiles de *S. calamintha*

Ordre	Nom du composé	Temps de rétention (mn)	Formule chimique	Poids moléculaires	Pourcentage (%)
1	Pulegone	13,77	C ₁₀ H ₁₆ O	152	22,03
2	Piperitenone	15,08	C ₁₀ H ₁₄ O	150	10,44

3	Isopiperitone	15,36	$C_{13}H_{22}O$	194	26,34
4	Menthone	15,63	$C_{10}H_{18}O$	216	20,60
5	Cis- Beta- Farnesene	16,54	$C_{15}H_{24}$	204	1,95
6	Germacrene	17,28	$C_{15}H_{24}$	204	7,21
Monoterpènes oxygénés					79,41
Sesquiterpènes hydrocarbonés					9,16
Autres					11,43
Total					88,57

Il est à noter d'après cette analyse qu'il y a en effet des produits majoritaires et des produits minoritaires. Notre huile essentielle analysée présente six (06) principaux pics dont leurs temps de rétention sont ; 13,77 mn, 15,08 mn, 15,36 mn, 15,63 mn, 16,54 mn et 17,37 mn, correspondant aux composants chimiques respectifs ; Isopiperitone (26,34 %), Pulegone (22,03 %), Menthone (20,60 %), Piperitenone (10,44 %), Germacrene (7,21 %) et Cis- Beta-Farnesene (1,95 %) (Figure 23).

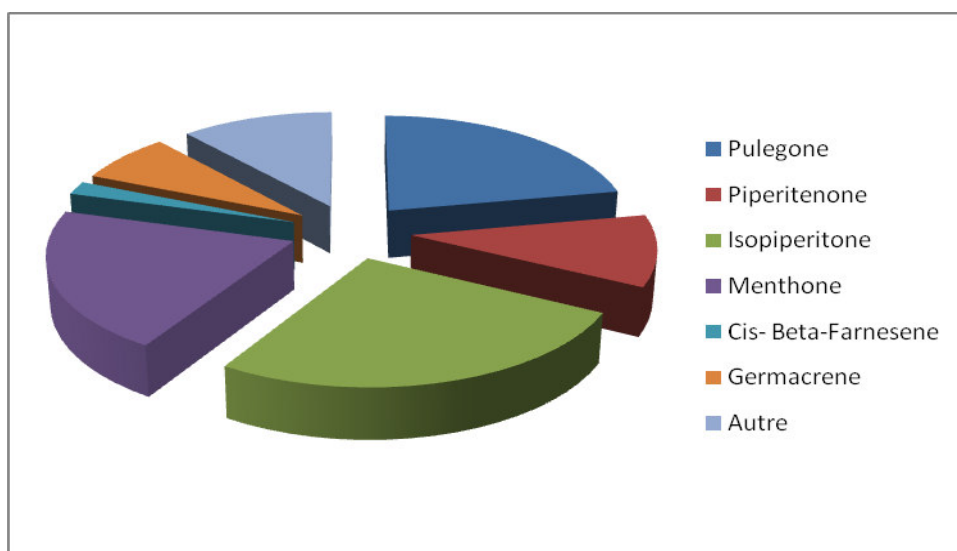


Figure 23: Composition chimique de l'huile essentielle de *S. calamintha*

La composition chimique des huiles essentielles de *S.calamintha* a été rapportée par quelques auteurs et le chemotype varie d'une région à une autre.

En Algérie, **Labiod (2016)** a réalisé cette analyse sur la même espèce provenant de deux régions différentes et elle a pu mettre en évidence la présence de 20 composants représentant un pourcentage de 98,83 % de la composition totale de l'huile essentielle des *S.calamintha* de la station d'Annaba et 34 constituants représentant 99,40 % du volume totale de l'huile essentielle de la zone de Jijel. Les échantillons de la sarriette provenant d'Annaba sont dominés par la présence de Piperitone oxide (54,71%), Cyclohexanone,2-(1-méthylethylidene)- (20,32%), et Menthone (5,97%). D'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles : 1,2-diisopropenylcyclobutane (4,68%), 3-Octanol (2,32%), Thymol (1,92%) et la Pulegone (1,72%). Les produits majoritaires des huiles essentielles de la zone de Jijel sont : Menthone (26,46%), Piperitone oxide (22,26%), Pulegone (14,04%) et Cyclohexanone,2-(1-méthylethylidene)- (9,37%), accompagnés également d'autres constituants avec des pourcentages moins importants : β -Cubebene (5,51%), Caryophyllène (4,33%) et l'Elixène (1,93 %).

Aussi, **Kerbouche et al., (2013)** ont montré que l'HE de cette plante est dominée par la pulegone (39,5 %), le neo-menthol (33 %) et l'isomenthone (19,6 %). De plus, des études menées par **De pooter et al., (1987)** sur la même plante du collectés de jardin de l'université de Gent en Belgique, ont montré que les composés majoritaires sont: Pulegone (11,5 à 33,2 %), Piperitenone oxide (5,9 à 37,8 %) et la Menthone (4,9 to 8,9 %). Celle de Molina di Quosa de l'Italie avait le pulegone (46 %), piperitenone oxide (2,53%), piperetone oxide (2,29%), et la piperitenone (2 %) comme des constituants dominants (**Panizzi et al., 1993**).

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

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce d'origine serbe (**Kitic et al., 2005**) contient majoritairement le pulegone (75,5 %), de l'oxyde de piperitone (6,0 %), de la menthone (5,3 %) et du menthol (4,3%). Et celle du Maroc réalisée par **Satrani et al., (2001)** possède le p-cymène (20.9%), γ -terpinène (18.7%), et le thymol (34.94%) comme produits majoritaires.

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

Gilly (2005) a rapporté que la composition biochimique des essences des lamiacées dépend aussi du lieu de récolte et détermine donc le chémotype et par conséquent la spécificité de l'huile et les propriétés thérapeutiques.

II.5- Evaluation des activités biologiques

II.5.1- Activité antioxydantes

L'activité antioxydante est considérée comme une diminution de l'absorbance de l'échantillon par rapport à la solution standard de DPPH. Après des mesures spectrophotométriques de la variation de l'absorbance du DPPH à 517nm (Annexe 9), Les valeurs obtenues nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition (Annexe 10). Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante sont illustrés dans la Figure 24 et ceux de l'acide ascorbique et de BHT sont représentés respectivement dans les Figure 25 et Figure 26.

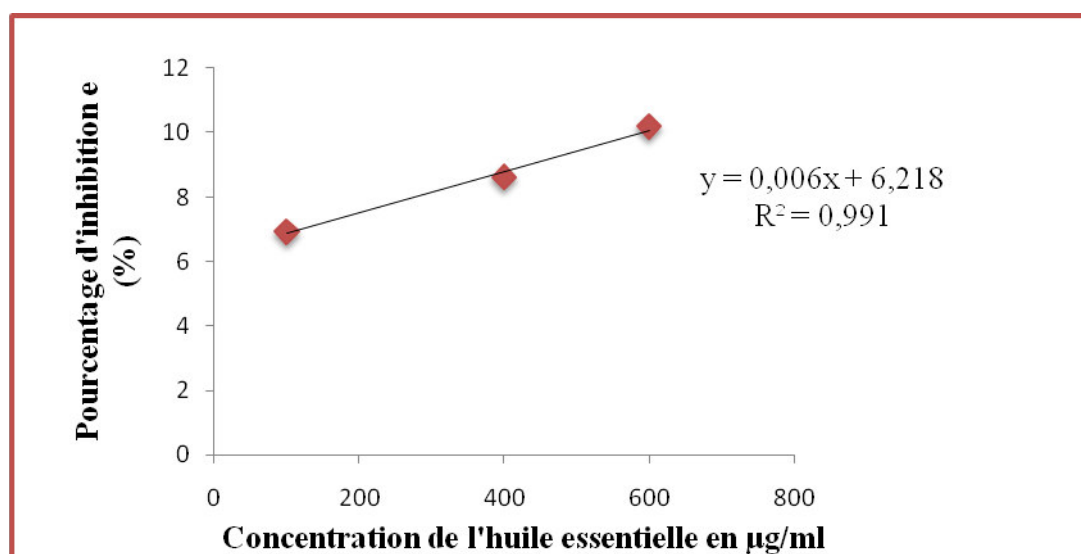


Figure 24: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle (%)

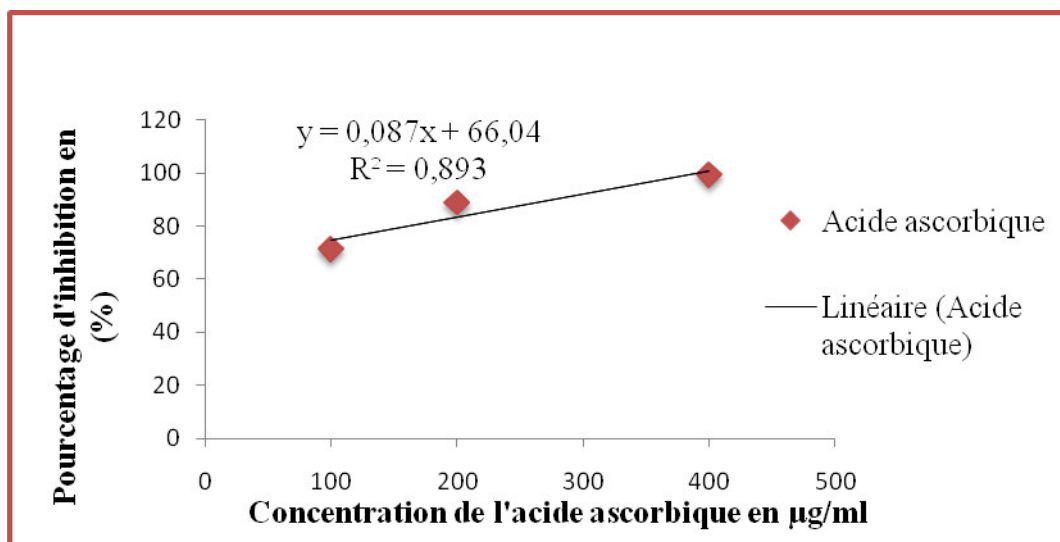


Figure 25: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique (%)

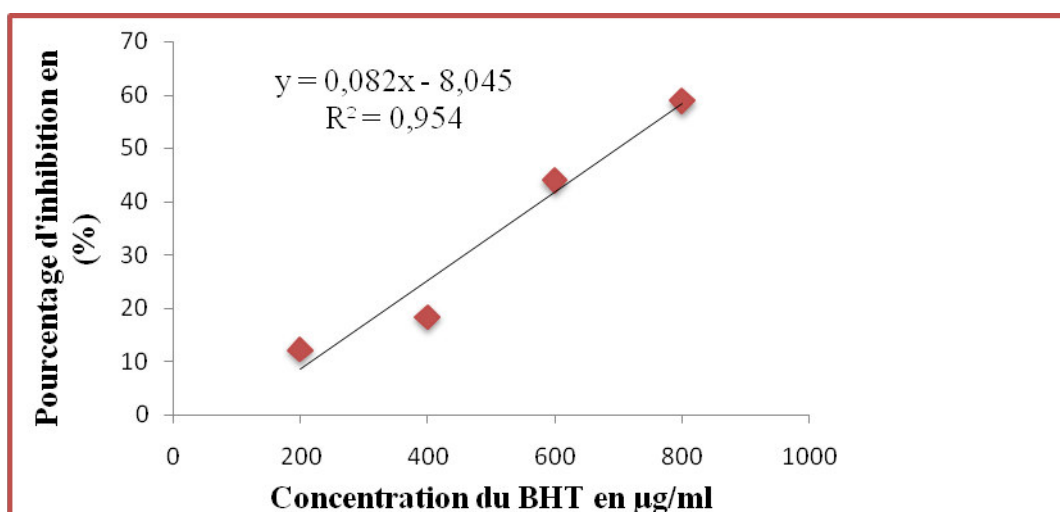


Figure 26: Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations du BHT en (%)

L'examen de ces figures montre que l'augmentation de la concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité anti-radicalaire.

Pour une concentration de 1mg/ml, il apparaît clairement qu'une faible activité de 11,01 % est obtenue pour l'huile essentielle et qu'elle est devenue 17,39 % avec une concentration de 10 mg/ml, contrairement aux composés standards (BHT et Acide ascorbique) qui ont exercé un fort effet antioxydants en prenant respectivement les valeurs de 59 % et 99,15 % pour une concentration de 1mg/ml. D'après ces résultats, nous remarquons

que le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique est supérieur à ceux de l'huile essentielle et de BHT.

Nos résultats confirment les résultats obtenus par **Kerbouche et al., (2013)**, qui ont trouvé une valeur de $7,93 \% \pm 0,51$ pour une concentration de l'huile essentielle de 1mg/ml.

Par opposition, **Cherat et al., (2013)** et **Labiod (2016)**, ont travaillé sur la même espèce provenant respectivement de deux régions différentes (Maroc et Algérie) et ils ont trouvé des pourcentage d'inhibition supérieurs qui varient de 20 au 22,01 % à une concentration de 1mg/ml. De plus **Labiod (2016)**, a signalé une bonne activité antioxydante (55 %) sur la même espèce récoltée de la région d'Annaba.

cette différence du pouvoir antioxydant est en forte corrélation avec la composition chimique de la plante (**Oke et al., (2009)**). En plus, **Kerbouche et al., (2013)** ont rapporté que la faible activité anti-radicalaire pourrait être expliqué par la pauvreté en composé phénolique. Il est considéré que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leur potentiel d'oxydo-réduction élevé, ce qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, et des désactivateurs d'oxygène singlet (**Miguel, 2010**).

D'autres auteurs tels que **Labiod (2016)**, a signalé que la forte activité antioxydante pourrait être liée à la présence des composés majoritaires ; le piperitone oxide (54,71 %) pour la plante récoltée de la région d'Annaba et le menthone (26,4 %) pour celle de la région de Jijel. Par contre, **Cherat et al., (2013)** ont attribué cette forte activité à la prédominance du 1,8-Cineole (42,94 %).

II.5.2- Activité antimicrobienne

II.5.2.1- Activité antibactérienne

Tous les résultats de l'activité antibactérienne sont illustrés dans le Tableau VI (Annexe 11).

a- Sensibilité aux antibiotiques

D'après le Tableau VI, il apparaît clairement que toutes les souches se sont révélées sensibles aux antibiotiques testés avec des diamètres d'inhibition variant entre 9 et 41 mm à l'exception de *Listeria innucua* qui semble être résistante. Par ailleurs, la souche la plus sensible au chloramphénicol est *SARM* avec une zone d'inhibition de $26,5 \pm 2,5$ mm, tandis que, la souche la plus sensible à l'amoxicilline est *Pseudomonas aerogenosa* ($41 \pm 0,5$ mm).

b- Sensibilité à l'huile essentielle

Selon les résultats présentés dans le Tableau VI, l'essence des parties aériennes de *S. calamintha* a montré un effet sur toutes les bactéries testées avec des diamètres d'inhibition compris entre $10,33 \pm 1,247$ et $30 \pm 1,632$ mm à l'exception *Salmonella entrica* présentant

une faible sensibilité avec une valeur d'inhibition de $7,33 \pm 2,624$ mm. En effet, nos résultats sont statistiquement significatifs (Annexe 12).

D'après le Tableau VI, nous constatons aussi que les bactéries à Gram + sont plus sensibles que celles à Gram-. D'une manière générale, l'hypersensibilité des souches pourrait être expliquée par la nature des parois de la bactérie. **Balentine et al., (2006)**, ont cité que les bactéries à Gram + dépourvues d'une membrane externe. La différence de sensibilité de microorganismes renseigne sur un éventuel effet membranaires de ces essences, la paroi des bactéries a Gram – serait moins perméable aux agents antimicrobiens en raison de sa structure complexe. La couche externe formé de lipolysaccharides, de protéines et de lipides agirait comme une barrière à l'entrée de différents agents chimiques (**Cao et al., 1997**).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Labiod (2016)** qui a travaillé sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la même espèce de deux régions différentes (Jijel et Annaba) contre les souches suivantes ; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212 en trouvant des diamètres d'inhibition variable entre 13 et 20 mm. De même, des résultats similaires ont été rapporté par **Bensouici et al., (2016)** sur la même espèce où ils ont trouvé des valeurs comprises entre 12,5 et 18 mm envers *E. coli* (HS), *Pseudomonas aeruginosa* (HS), *Staphylococcus aureus* (HS) et *Klebsiella pneumoniae* (HS).

Aussi, **kerbouche et al., (2013)** ont travaillé sur la même espèce et ils ont mentionné des zones d'inhibition entre 10 et 40 mm.

D'une manière générale, les plantes de genre *Satureja* ont un effet antibactérien, **Tatjana et al., (2010)** ont fait des études sur une autre espèce *Satureja hortensis* et ils ont signalé des diamètres d'inhibition entre 15 et 23 mm .

En effet, notre plante étudiée exerce une bonne activité antibactérienne qui pourrait être liée à la présence du pulegone. Ceci est conforme avec les résultats de **Kerbouche et al., (2013)**. De plus, **Panizzi et al., (1993)** ont constaté que la bonne activité antibactérienne de l'huile essentielle peut être attribuée aux composants majoritaires ; menthone et pulegone ou à la pipéritone et à la piperitenone avec leurs oxydes. **Gueldner et al., (1985)** ont attribué cette bonne activité antibactérienne aux fonctions aldéhyde, cétone et alcool. Par contre **Tatjana et al., (2010)** ont trouvé que le carvacrol est le composé responsable de l'activité antibactérienne dans une autre espèce de *satureja* (*Satureja hortensis*) .

D'autre auteurs tels que **Wang et al., (2012)** ont démontré qu'une huile essentielle entière exerce une activité antimicrobienne supérieure qu'un mélange de composants majeurs

de la même huile essentielle, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique.

Tableau VI: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. calamintha* et antibiogramme

Souches bactériennes	Zone d'inhibition d'huile (mm)	Zone d'inhibition du Chloramphénicol (mm)	Zone d'inhibition de l'Amoxicilline (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,66 ± 4,496 ^{**A}	25 ± 0	12,5 ± 2,5
<i>Listeria innucua</i>	10,33 ± 1,247 ^{***A ***B}	0	0
<i>Bacillus creuse</i>	24 ± 1,414 ^{****B}	20 ± 0	9 ± 1
<i>E.coli</i>	12 ± 1,632 ^{***A *B}	22,5 ± 0,5	18 ± 3
<i>Klebseila pneumonie</i>	11 ± 0,816 ^{****A ***B}	25,5 ± 0,5	18 ± 1
<i>Salmonella typhique</i>	22 ± 1,632 ^{**B}	24,5 ± 1,5	10 ± 2
<i>Enterococcus faecalis</i>	18,33 ± 4,714 ^{**A*B}	0	8 ± 1
<i>Salmonella enterica</i>	7,33 ± 2,624 ^{**A}	17,5 ± 1,5	7,5 ± 1,5
SARM	30 ± 1,632 ^{****B}	26,5 ± 2,5	18 ± 1
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	10,3 ± 4,109 ^{**A***B}	23 ± 0	41,5 ± 0,5

A : Chloramphénicol, B : Amoxicilline

II.5.2.2- Activité antifongique

La réalisation de l'activité antifongique a été effectuée par la technique de contact direct pour les moisissures et diffusion sur disque pour les levures.

a-- Les levures

Les résultats de cette étude sont illustrés dans le Tableau VII. Dans le cadre de cette recherche, nous constatons que la souche *Candida albicans* est la plus sensible à l'antifongique (fongenal) par rapport aux autres souches de levure testées. Elle présente un diamètre d'inhibition égale à 26,5 ± 0,5 mm tandis que *Candidas tropicalis 1* et 2 donnent respectivement des zones d'inhibition suivants 8,33 ± 0,471 et 7,66 ± 0,942 mm.

Concernant le test de sensibilité aux huiles essentielles de *S. calamintha*, nous remarquons que la souche *Candida tropicalis* 2 révèle un diamètre d'inhibition le plus élevé correspondant à $39,33 \pm 4,71$ mm, suivi par *Candidas albicans* (20 mm) et *Candidas tropicalis* 1 ($10,66 \pm 1,699$ mm) (Annexe 13).

D'après le Tableau VII, il apparaît clairement que tous les résultats sont statistiquement significatifs à l'exception de celui de *Candidas tropicalis* 1 qui est non significatif avec une probabilité de 0,066 (Annexe 14). De même, il est observé que notre huile essentielle est plus efficace que le Fongenal vis-à-vis de *Candidas tropicalis* 2, il exerce un effet 5 fois plus élevé que l'antifongique.

Nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Labiod, 2016**) qui a signalé des zones d'inhibition de 18 à 18,5mm contre *Candidas albicans*. Par contre, ils sont meilleurs que ceux rapportés par **Kerbouche et al., (2013)**. D'autres études faites sur *Satureja hortensis* confirment nos résultats (**Tatjana et al., 2010**). Cet effet anti-candida de notre huile essentielle pourrait être en relation avec la présence du pulégone dans sa composition chimique.

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

Dans le même contexte, d'autres auteurs, tels que **Mijat et al., (2017)** ont attribué cette activité à l'effet synergique entre les composés chimique majeurs et mineurs.

Tableau VII: Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. calamintha* et de Fongenal (Anti-candida)

Souches	Zone d'inhibition d'huile	Zone d'inhibition Fongenal
<i>Candida albicans</i>	20 ± 0 ***fongenal	$26,5 \pm 0,5$
<i>Candida tropicalis</i> 1	$10,66 \pm 1,699$	$8,33 \pm 0,471$
<i>Candida tropicalis</i> 2	$39,33 \pm 4,71$ ****fongenal	$7,66 \pm 0,942$

b- Les moisissures

Le Tableau VIII rapporte les résultats du pourcentage d'inhibition déterminé à partir des diamètres des zones d'inhibition.

Les trois souches fongiques réagissent différemment contre la nystatine: *Aspergillus niger* 1 et *Aspergillus flavus* semblent être les plus résistantes avec des pourcentages d'inhibition entre 0 et 25 %. Par contre, *Aspergillus niger* 2 se révèle peu sensible (28,88 %).

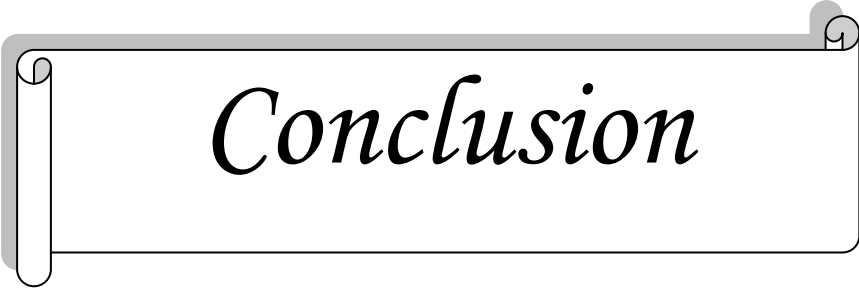
Dans le cas des HE, il s'est montré que *Aspergillus flavus* est très sensible (71,25 %) par rapport aux autres souches *Aspergillus niger* 1 et 2 qui prennent respectivement les pourcentages d'inhibition suivants 54,44 % et 48,88 % (Annexe 15). Des résultats similaires ont été rapportés par **Labiod et al., (2015)**, qui ont travaillé sur l'HE de la même plante (*S. Calamintha*) contre des souches d'*Aspergillus.sp* et ils ont trouvés une bonne activité antifongique qui augmente avec l'augmentation de la concentration de l'HE. Par contre, **Azaz et al., (2002)** ont trouvé une faible activités antifongique en travaillant sur des huiles essentielles des autres espèces du même genre.

En effet, notre huile essentielle exerce une bonne activité antifongique sur les trois moisissures testées. Ceci pourrait être dû à la présence de la pulégone et l'isopiperitone.

Labiod et al., (2015) ont attribué cette activité à la présence de menthone, de pulegone et de piperitone oxide. **Javidnia et al., (1996)** ont aussi confirmé que la pulegone a un effet fongicide, qui peut être expliqué par une action inhibitrice sur la production des enzymes hydrolytiques (Protéases et Phospholipases) sécrétées par les champignons (**Samber et al., 2014**).

Tableau VIII: Activité antifongique de l'huile essentielle de *S. calamintha* et de la nystatine (Anti-moisissure)

Les moisissures	Pourcentage d'inhibition de l'HE (%)	Pourcentage d'inhibition de la nystatine (%)
<i>Aspergillus niger</i> 1	54,44	3,33
<i>Aspergillus niger</i> 2	48,88	28,88
<i>Aspergillus flavus</i>	71,25	17,5



Conclusion

Notre étude comporte deux objectifs principaux, le premier se focalise sur le screening phytochimique de la partie aérienne de la plante *S. calamintha* provenant de la région du Jijel. Le second, consiste en extraction des huiles essentielles et en évaluation de leurs activités biologiques.

Les résultats du screening phytochimique de notre plante ont mis en évidence la richesse de cette plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté l'abondance des flavonoïdes libres, des anthocyanes, des tannins (totaux catéchiques et galliques), des glycosides, des composés réducteurs, des alcaloïdes, des coumarines, des O-hétérosides, des C-hétérosides, des saponosides, des oses et holosides à l'exception des leucoanthocyanes et des quinones libres. Toutes ces substances confèrent à cette plante des propriétés biologiques très importantes.

Le test d'humidité a révélé que la plante possède un taux d'humidité très élevé correspondant à $82,12 \% \pm 0,006$.

Par ailleurs, L'extraction des HE par hydrodistillation sur la plante séchée à l'air libre et à l'étuve a donné respectivement les rendements suivants : $0,543 \% \pm 0,112$ et $0,453 \% \pm 0,258$.

L'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) a pu identifier 88,57 % du volume total de notre huile essentielle, elle a présenté six composants qui sont : l'isopiperitone (26,34 %), la Pulegone (22,03 %), Menthone (20,60 %), Piperitenone (10,44 %), Germacrene (7,21 %) et Cis- Beta-Farnesene (1,95 %).

Après l'extraction, la détermination du rendement et l'analyse des huiles essentielles par GC/MS, nous avons procédé à l'évaluation de leurs activités biologiques. Dans ce sens, notre huile essentielle à une concentration de 1mg/ml exerce une faible activité anti-radicalaire avec un pourcentage d'inhibition de 11,01%. Par contre, l'étude *in vitro* du pouvoir inhibiteur des huiles révèle que les HE de la plante exercent un effet inhibiteur puissant sur la majorité des souches bactériennes testées avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 et 30 mm. De plus l'action des HE sur les champignons a montré que l'HE possède une activité inhibitrice très forte sur la croissance mycélienne de ces champignons.

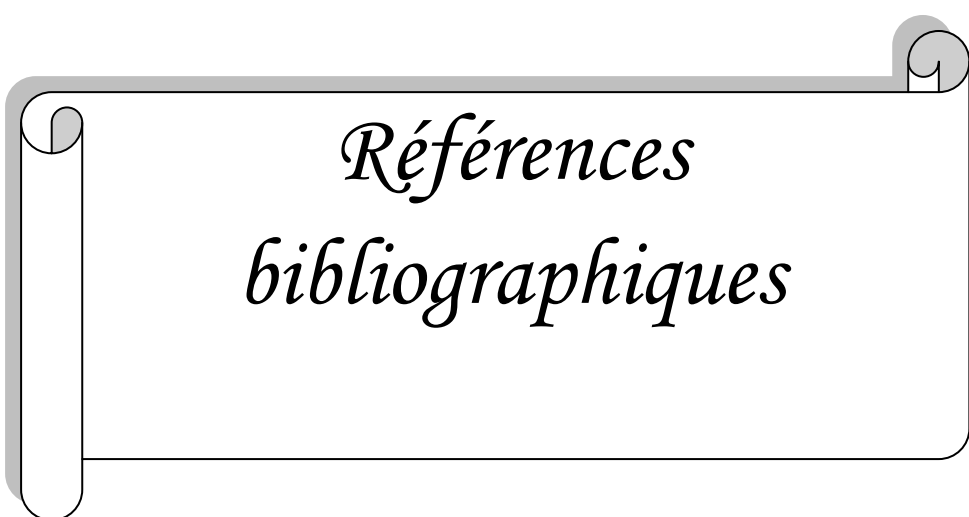
Pour mieux exploiter cette plante :

- Des recherches complémentaires seront nécessaires pour identifier, isoler et purifier l'espèce chimique ou les composés responsables de ces activités biologiques ;

- Il serait intéressant de compléter ce travail par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) ;

Une étude in vivo est souhaitable, pour tester l'activité anti-inflammatoire et anticoagulante ;

Il serait important d'extraire et tester les autres métabolites secondaires.

A decorative graphic of a scroll with a grey shadow, containing the title text.

Références bibliographiques

- **Adams, R. (2001).** Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole. *Mass spectroscopy*. Ed: Allured Pub Corp, 804 p.
- **Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS)., 2008** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles.
- **Angelopoulou, D., Demetzos, C., and Perdetzoglou, D. (2002).** Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(3), 189-203.
- **Anton R. and Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc., Paris, 522p.
- **Aravodis E., 2005.** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 128-133.
- **Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., and Witier, P. (1995).** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris, 700p.
- **Association française de normalisation (Afnor).1986,** Huiles Essentielles, Ed 2, Afnor, Paris, 474p.
- **Atawodi, S. (2005).** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.
- **Audigié, C., Dupont, G., & Zonszain, F. (1992).** *Principes des méthodes d'analyse biochimique* . Vol. 2, Ed Doin, Paris,, 190 p.
- **Azaz, D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., Hüsni, K., and Başerb, C. (2002).** Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57(9-10), 817-821.
- **Baba Aissa F. (2000) :** Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident. Ed Librairie moderne-Rouiba, 46p.
- **Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand, 184p.

- **Balentine, C., Crandall, P., O'Bryan, C., Duong, D., and Pohlman, F. (2006).** The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73(3), 413-421.
- **Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5-21.
- **Baser, K. H. (2010).** *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*/K. Hüsnü Can Baser, Gerhard Buchbauer, 994p.
- **Baser, K. H. C., et Buchbauer, G. (Eds.). (2015).** *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press.Taylor & Francis. 121p.
- **Bassole IH.,Ouattara AS.,Nebioe R .,Ouattara CA.,Kabore ZI et Traore SA2003.**Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina faso . *Pytochemistry*,62(2),209-212 .
- **Beckman, K. B., et Ames, B. N. (1998).** The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-581.
- **Belaiche P. (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **Benaissa, O. (2011).**Etude des métabolites terpéniques et flavoniques d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum et Rhantherium*. Activité biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Canstantine .Algérie, 63p
- **Benarous, K. (2006).** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. Mémoire d'Ingénieur d'état.92p
- **Benkhedimallah R.,Kismoun S.(2014).** Etude phytochimique et biologique de la plante *Satureja calamintha*, mémoire de Master, Université Constantine1(Constantine), Algérie, 88p.
- **Bensouici C, B. A., Chibani S, Kabouche A, Abuhamdah S, Semra Z and Kabouche Z, 2016.** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Satureja calamintha ssp. sylvatica* from Jijel, Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (2),224-22

- **Benzeggouta N. (2005).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, Algérie, 110p.
- **Bergogne-Bérézin, E., and Dellamonica, P. (1995).** *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed Masson, Paris, 496p.
- **Bertini, L. M., Pereira, A. F., Oliveira, C. d., Menezes, E. A., Morais, S. d., Cunha, F. A., and Cavalcanti, E. S. B. (2005).** Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, 17(3-4), 80-83.
- **Bouakaz, I. (2006).** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. *Mémoire de magister*. Batna.
- **Bouchelta A., Boughdad A., Blenzar A. (2005).** Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 9 (4) : 21-30.
- **Bougandoura, N., et Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, 9, 14-19.
- **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, 915p
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris, 1119p.
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 4e éd, revue et augmentée, Paris, Tec et Doc, Éditions médicales internationales, 1288 p.
- **Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., and Glaser, P. (2003).** Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *Pathogens and Disease*, 35(3), 207-213.
- **Buettner, G. R. (1993).** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(2), 535-543.
- **Burits, M., and Bucar, F. (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5), 323-328.

- **Buronzo, A. (2008).** *Grand guide des huiles essentielles*: Hachette Pratique, 256p.
- **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- **Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- **Carson, C., Cookson, B., Farrelly, H., and Riley, T. (1995).** Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(3), 421-424.
- **Cavin A., 1999.** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires, *Tinospora crispa* (Menispermaceae) ; *Merremia emarginata* (convolvulaceae) et *Orphea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne. 243p
- **Chabasse, D., Pihet, M., et Bouchara, J.P. (2005).** Les moisissures opportunistes: émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine. *Revue Francophone des Laboratoires*, 373, 21-34.
- **Chan, C.H.; Loudon, K.W. 1998.** Activity of tea tree oil on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of hospital infection*, 39, 244-245.
- **Chang, S.T., Chen, P.F., and Chang, S.C. (2001).** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123-127.
- **Chemat, F. (2009).** *Essential oils and aromas Green Extraction and Applications*: Har Krishan Bhalla & Sons. Dehradun, 311p.
- **Chen, H.Q., Jin, Z.Y., Wang, X.J., Xu, X.M., Deng, L., and Zhao, J.W. (2008).** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*, 448(2), 175-179.
- **Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R., and Laglaoui, A. (2013).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 221-229.

- **Clark, L., and Mason, J. R. (1987).** Olfactory discrimination of plant volatiles by the European starling. *Animal Behaviour*, 35(1), 227-235.
- **Clement RP. (2005).** Aux racines de la phytothérapie : entre traditions et modernité. *Phytotherapie*. 4,171-175.
- **Colombo, R. P., Martínez, A. E., di Pardo, A. F., Bidondo, L. F., van Baren, C., di Leo Lira, P., and Godeas, A. M. (2013).** Differential effects of two strains of *Rhizophagus intraradices* on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta*. *Revista Argentina de Microbiologia*, 45(2), 114-118.
- **Cooper R.; 1997;** Age-Reversing Free Radical Fighters: Antioxidants; Ed: Woodland, 4-11.
- **Couic-Marinier, F., and Lobstein, A. (2013).** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualites Pharmaceutiques*, 52(525), 18-21.
- **Cox, D., O'kenedy, R., and Thornes, R. (1989).** The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1, 2-benzopyrone). *Human Toxicology*, 8(6), 501-506.
- **Cox, S., Mann, C., Markham, J., Bell, H., Gustafson, J., Warmington, J., and Wyllie, S. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
- **Cyril, T. (2001).** étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus Roseusen*, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. 28p.
- **Daniel, M. (2006).** Medicinal plants. *Chemistry and Properties*. Science Publishers New Delhi, 250p.
- **Dastmalchi, K., Dorman, H. D., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., and Hiltunen, R. (2008).** Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 391-400.
- **Degryse A.C., Delpla I. and Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p.
- **De Pooter, H. L., Goetghebeur, P., and Schamp, N. (1987).** Variability in composition of the essential oil of *Calaminthanepeta*. *Phytochemistry*, 26(12), 3355-3356.
- **Deroin T. ,1988.** Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga* diagnosis and epidemiology of fungal infections. 36 (1), 249-257.

- **Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoye A, Kwin NF, Betti JL.(2011a).** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496-2507.
- **Djibo, A. K., Samaté, A. D., and Nacro, M. (2004).** Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O. canum* Sims du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1033-1037.
- **Dryden, M. S., Dailly, S., and Crouch, M. (2004).** A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *Journal of Hospital Infection*, 56(4), 283-286.
- **Duru, M. E., Öztürk, M., Uğur, A., and Ceylan, Ö. (2004).** The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 43-48.
- **Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., and Pedro, L. G. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*, 36(1), 35-40.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 390-396.
- **Fiorucci, S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire, thèse de Doctorat, École doctorale Sciences fondamentales et appliquées (Nice) ,212p.
- **Garnier, G., Bézanger-Beauquesne, L., and Debranx, G. (1961).** Ressources médicinales de la flore française, Tome II, Paris, Vigot Frères.
- **Gende, L. B., Mendiara, S., Fernández, N. J., Van Baren, C., Di Leo Lira, A., Bandoni, A., and Eguaras, M. (2014).** Essential oils of some *Mentha spp.* and their relation with antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees, by using the bioautography technique. *Bull. Insectol*, 67(1), 13-20.
- **Gilly, G. (2005).** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Editions L'Harmattan.
- **Guldner .RC.,Wilson.DM.,Heidt.,AR.1985.** Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus* .*Journal of agriculture and food chemistry*,33(3),411-413.
- **Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006).** Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens

Parmelia saxatilis, *Platisma tiaglauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicarianylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515-521.

- **Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86, 985-990.
- **Hammer, K. 1., Carson, C. F., and Riley, T. V. (2003).** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853-860.
- **Hart, T., and Shears, P. (1997).** *Atlas de poche microbiologie*: Flammarion. Paris. 213 p.
- **Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003).** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, 91(3), 7-11.
- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology&therapeutics*, 96(2), 67-202.
- **Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., and von Wright, A. (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- **Herouini, A., and Kemassi, A. (2016).** Etude de l'activité biologique des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien). *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes*, 8(2), 15-25.
- **Hopkins, W. G. (2003).** *Physiologie végétale*. Ed De Boeck Supérieur. Paris, 514p
- **Hu, S. G., Li, L., and He, X. W. (2005).** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of Chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *journal of Chromatography A*, 1062(1), 31-37.
- **Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., and Dufosse, L. (1998).** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18(6), 563-582.
- **Husnu Can başer K and Buchbauer G., (2010).** Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application. Ed CRC Press; 2 editions, 1128p
- **Isérin, P., Masson, M., and Kedellini, J. P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*. 267p.

- **Iwueke, A. V., and Nwodo, O. F. C. (2008).** Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri*, 20(2).
- **Javidnia K and Tabatabaiee M., (1996).** Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ziziphora tenuir*, population Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical sciences*, 6(1-2), 56-60.
- **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., and Stevens, P. (2002).** *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur. 383p.
- **Juteau, F., Masotti, V., Bessière, J. M., and Viano, J. (2002).** Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Biochemical systematics and ecology*, 30(11), 1065-1070.
- **Kansole M.M.R. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire d'Etudes Approfondies (D.E.A), Burkina Faso. 53 p.
- **Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., and Ilcim, A. (2001).** Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 183-186.
- **Kerbouche, L., Hazzit, M., and Baaliouamer, A. (2013).** Essential Oil of *Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq. from Algeria: Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3(4), 266-272.
- **Kitic, D., Stojanovic, G., Palic, R., and Randjelovic, V. (2005).** Chemical composition and microbial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *nepeta* var. *subisodonta* (Borb.) Hayek from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 701-703.
- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- **Kohen R, Nyska A. 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* .30(6):620—50.

- **Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées .Thèse de doctorat, Muséum national d'histoire naturelle-Paris.343p.
- **Labiod, R., Aouadi, S., and Bouhaddouda, N. (2015).** Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *International j of pharmacy and pharmaceutical sciences*, **7**, 208-211.
- **Labiod R, (2016).** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de Doctorat. Université de Badji Mokhtar, Annaba. 115p.
- **Lahlah F.Z. (2008).**Extraction des flavonoïdes par le butanol, chloroforme à partir de *silybum marianum*, et étude de leurs activités antibactériennes. Mémoire de magister de l'université de Constantine, 62p.
- **Lahlou, M. (2004).** Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and fragrance journal*, **19**(2), 159-165.
- **Lamarti A., Badoc A., Deffileux G., et Carde J .P. (1994).** Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, **133**:69-78.
- **Laouer, H. (2004).** Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Béjaia, de M'sila et de Djelfa—composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr et de *Magydaris Pastinacea* (Lamk) Paol. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif. Algérie ,73p.
- **Laurent B. (2012).** Initiation à la botanique et découverte des petits secrets du monde vert Interactions végétales Conservation du jardin botanique de la ville Paris science végétale .
- **Lesley B. (1996).** Plantes médicinales et aromatiques, Ed. Lavoisier. Paris. 1268p
- **Liang, Y. Z., Xie, P., and Chan, K. (2004).** Quality control of herbal medicines. *Journal of chromatography B*, **812**(1), 53-70.
- **Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F., and Senatore, F. (2004).** Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare*

Miller var. vulgare (Miller) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7862-7866.

- **Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., and Bíró, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 119-25.
- **Madhavi DL., Deshpande SS et Salunkhe DK. (1996).** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, 65p.
- **Malecky. (2005).** Métabolisme des terpénoides chez les caprins. Thèse de doctorat de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement ,Agroparistech. p9-27.
- **Mann, J.(1987).**Secondary metabolism, Second edition ,Clarendon pres ,Oxford,374p
- **Manallah, A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Thèse de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas (sétif) Algérie. 87p.
- **Marino, M., Bersani, C., et Comi, G. (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International journal of food microbiology*, 67(3), 187-195.
- **Maurice N. (1997).**De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XX le siècle, Ed, Lavoisier, Paris, 272p.
- **Masayuki M and Katsuya G. (2010).** *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Ed Caister Academic Press : Norfolk (England). 238p.
- **Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., and Mornar, A. (2004).** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemica acta*, 77(1-2), 361-366.
- **Meddleton E et Kardasnam JC . (1993).** The flavonoids Advances. *In*: research since 1986. *J B Harborne, Chapman and Hall*, London ,617-652p.
- **Mhetras, N. C., Bastawde, K. B., and Gokhale, D. V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100(3), 1486-1490.
- **Midoun, T. (2011).** Extraction des composés phenoliques et étude leurs activités antioxydante par la voltametrie cyclique. Mémoire de Master, Spécialité : *chimie appliquée*. Université Kasdi Merbah (Ouargla) Algérie, 53p.

- **Mihajilov-Krstev T., Radnović, D., Kitić, D., Stojanović-Radić, Z., and Zlatković B., (2010).** Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Archives of Biological Sciences*, 62(1), p159-166.
- **Miguel, M. G. (2010).** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312.
- **Mijat.B., and Rino .R. 2017.** *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules* ,22(290),1-49
- **Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., and Lüthje, S. (2004).** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 173-193.
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin .Journal of Science Education and Technology*.26(2), 211-219.
- **Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC and Yolk RH. (1995).** Manual of Clinical Microbiology. sixth Ed. ASM, Washington, DC, USA. 300p.
- **Ntezurubanza L. (2000).** Les Huiles essentielles du Rwanda, Ed :Laseve, Québec Canada. 88p.
- **Oliveira, M. J., Campos, I. F., Oliveira, C. B., Santos, M. R., Souza, P. S., Santos, S. C., .and Ferri, P. H. (2005).** Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical systematics and ecology*, 33(3), p275-285.
- **Oussalah, M., Caillet, S., and Lacroix, M. (2006).** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 69(5), 1046-1055.
- **Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., and Altundag, S. (2009).** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874-879.
- **Padrini, F., and Lucheron, M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité bien être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétique avec plus de 100 photographies. Ed De Vecchi., 15p.
- **Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúl, R., Sanz, J., and Conejero, F. (2001).** Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina*

rosmarinifolia L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical systematics and ecology*, 29(7), 663-672.

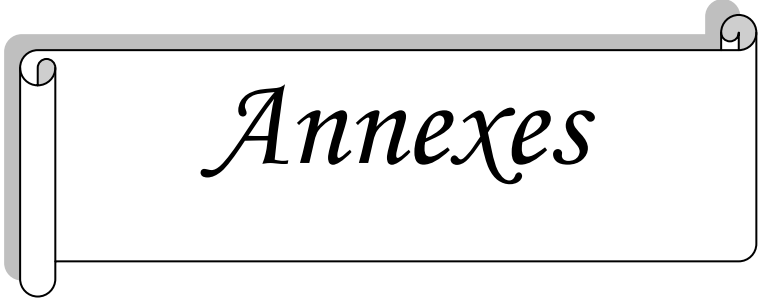
- **Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., and Morelli, I. (1993).** Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 39(3), 167-170.
- **Paris M et Hurabielle M(1981).** Abrégé de matière médicale-pharmacognosie, tomo 1, y tomo 2. Ed Masson ,Paris,173p .
- **Pasqualotto A. C. (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science & Business Media, New York. 1027 p.
- **Pastre, J., and Priymenko, N. (2007).** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.
- **Perry, N. S., Bollen, C., Perry, E. K., and Ballard, C. (2003).** Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 75(3), 651-659.
- **Pibiri, M. C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d" huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.
- **Pietta. P.G., (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural product and plant*. 63,1035-1042.
- **Piquet MA., et Hébuterne X., 2007.** Nutrition en pathologie digestive ; Ed : Doin ; p 16-20.
- **Ponce A.G., fritz R., DEL Valle C., roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Libensmittel wissenschaftund technology*, p 500-508
- **Quezel P et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 1170p
- **Rahal S. (2004).** Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. 162p.
- **Rakotonanahary, M. (2012).** Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier.
- **RasooliI., and Abyaneh, M. R. (2004).** Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food control*, 15(6), 479-483.

- **Ref'at A., Takturi A., H. R., and Al-Sayyed, H. (2010).** Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 265-274.
- **Ristorcelli, D., Tomi, F., and Casanova, J. (1996).** Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and subsp. *glandulosa* from Corsica (France). *Journal of Essential Oil Research*, 8(4), 363-366.
- **Roux D., and Catier O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème Edition, wolters Kluwer. 141p.
- **Samber N., Varma A and Manzoor N. (2014).** Evaluation of *Mentha piperita* Essential Oil and its Major Constituents for Antifungal Activity in *Candida spp.* *International journal of innovative research in science, Engineering and technology*. 3(2): 9404-9411.
- **Sasaki, H., Nishimura, H., Morota, T., Chin, M., Mitsuhashi, H., Komatsu, Y., and Yu-lang, X. (1989).** Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*. *Planta medica*, 55(05), 458-462.
- **Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., and Talbi, M. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de pharmacie Bordeaux*, 146, 85-96.
- **Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., and Ahmadi, S. (2007).** The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food chemistry*, 100(3), 1054-1058.
- **Senatore, F., Arnold, N. A., and Piozzi, F. (2004).** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *Journal of chromatography A*, 1052(1), 237-240.
- **Shahidi, F. (1997).** Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. *The American Oil Chemists Society*. 174-197.
- **Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A., Kumar, R., Dubey, N. K., and Gupta, R. (2008).** Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(14), 2421-2425.

- **Slavkovska V., Jancic R., Bojovic, S., Milosavljevic, S.,and Djokovic, D. (2001).** Variability of essential oils of *Satureja montana L.* and *Satureja kitaibelii wierz.* ex Heuff. from the central part of the *Balkan peninsula*. *Phytochemistry*, 57(1), 71-76.
- **Smallfield, B. (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research* ,45,1-4.
- **Smythies, J. R, (1998).** Every person's guide to antioxidants. Rutgers University Press. 140p.
- **Skoula, M., Abidi, C., and Kokkalou, E. (1996).** Essential oil variation of *Lavandula stoechas L. ssp. stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 255-260.
- **Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., and Bigger, S. W. (2003).** Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3197-3207.
- **Svoboda, K. P., and Hampson, J. B. (2000).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, 1-17.
- **Tatjana. M., Dragan .R., Dušanka. k., Zorica SR and Bojan Z .2010.** Antimicrobial activity of *satureja hortensis* l. Essential oil against pathogenic microbial strains. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*,10(298),1-167
- **Teixeira L., Carvalho M., siqueira G., Facklam R. (2007).** Enterococcus. In P.R. Murray. Ed, Manual of clinical microbiology,p 430-442.
- **Touitou Y., (2005).** Biochimie : structure des glucides et lipides Université Pierre et Marie Curie, Paris , 48p .
- **Tringali C., 2001;** Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation Characterisation and Biological Properties. Ed1 taylor and francis,London,693p.
- **Ultee A., Bennik M. H. J and Moeze1aar R. (2002).** Phenolic hydroxyl group of carvacrol *gen Bacillus cereus*. *Applied and Is essential for action against the foodborne Environmental Microbiology*, 68, 161-1568.
- **Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M., (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.

- **Vârban, D., Duda, M., Varban, R., and Muntean, S. (2009).** Research concerning the organic technology for *Satureja Hortensis L.* Culture. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66, (2), 225-229.
- **Vermerris W. and Nicholson R., (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, The Netherlands.
- **Vigean C. (1985).** Plantes médicinales ; thérapeutique-toxicité, Ed –Masson, Paris ,290p
- **Viuda-Martos M., Mohamady M.A., Fernández-López J., ElRazik K.A., Omer E.A., Pérez-Alvarez J.A., et Sendra E., (2011).** In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22(11), 1715-1722.
- **Wang W., Wu N., Zu Y.G. and Fu Y.J., (2008).** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil compared to its main components. *Food chemistry*, 108(3), 1019-1022.
- **Wasser, S. P. (2002).** Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274.
- **Weinberger, M., Leibovici, L., Perez, S., Samra, Z., Ostfeld, I., Levi, I., and Pitlik, S. D. (2005).** Characteristics of *candidaemia* with *Candida albicans* compared with non-*albicans Candida* species and predictors of mortality. *Journal of Hospital Infection*, 61(2), 146-154.
- **W Erdman J., Balentine J D., Arab L., Beecher G., Dwyer J T., Folts J., Harnly., Hollman J P ., L- Keen C., Mazza G., Messina M., Emerenciano V P., Barbosa K O., Scotti M T and Ferrero M J P . (2007).** Self organising maps in chemotaxonomic studies of asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of Brazilian chemical society*. 18 (5), p891-899.
- **Yahyaoui N.(2005)**-Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata (L.)* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F.)* (Coleoptera, Bostrychadae) et *Tribolium confusum (Duv.)* (Coleoptera, Tenebrionidae). Thèse de Magister en sciences agronomiques, option Ecologie. El-Harrach.

- **Yayi E., Gbenou J.D., Ahoussi L.A., Moudachirou M. and Chalchat, J.C., (2004).** *Ocimum. gratissimum (L.)*, siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10), 1013-1018.
- **Yoshida H., Kajimoto G. and Emura S., (1993).** Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(10), 989-995.



Annexes

Annexe 1 : Liste du matériel non biologique

Réactifs	Verreries	Equipements et appareils
Acide chloridrique concentré, (1N), (0.1N)	Eprouvettes	Bain marie
Propanol	Tubes à essai stériles	Plaque chauffante
FeCl ₃ (1 %), (5 %), (10 %)	Entonnoirs	Balance
NaOH (1N)	Spatules, baguettes	Spectrophotomètre
Mg	Pipettes graduées	Réfrigérateur
Ammoniaque concentré, ½, (25 %), (50 %)	Erlenmeyer	Chronomètre
Ethanol	Fiole jaugée	Embouts pour les Micropipettes
Chloroforme	Ballons	Etuve
Méthanol	Verre de montre	Agitateur
Acétate de sodium	Flacons en verre	Vortex
Acétate de plomb	Pince	Moulin électrique
Réactifs de Fehling	Pipette pasteur	Gaze
Réactif de Dragendorff	Ampoule a décanté	Crochets
BHT		Portoir
DPPH		Boites de pétries
Acide ascorbique		Disques de papier Wattman
Eau physiologique stérile		Epindoffs
NaCl		Lampe UV
Agar		PH-mètre

		Chauffe ballon Pince Hydrodistillateur Papier filtre Seringue Micropipettes
--	--	--

Annexe 2 : Généralités sur les souches microbiennes testées

❖ Bactéries

1-*Staphylococcus aureus* (le staphylocoque doré)

Cocci à Gram positif, immobiles et disposées en amas, responsables d'infections graves communautaires et nosocomiales, d'infections des plaies, de la peau et du sang, des abcès, ostéites, otites, infections urinaires, endocardites, gastro-entérites et infection pulmonaires. acquiert facilement des résistances aux antibiotiques et en particulier à la pénicilline, à la méthicilline 1 (MRSA), et aux fluoroquinolones mais sensible aux B-lactamines (Perry et al., 2004).

2- *Listeria innocua*

Listeria innocua est l'une des six espèces appartenant au genre *Listeria*. Il se trouve largement dans l'environnement (comme le sol) et les sources alimentaires. Il peut survivre à un pH et à une température extrêmes, et à une forte concentration de sel. En termes d'apparence, c'est une bactérie Gram - positive en forme de tige. C'est une bactérie non-spore. Il peut vivre individuellement ou s'organiser en chaînes avec d'autres bactéries *Listeria innocua*. C'est un mésophile fonctionnant à une température optimale de 30 à 37 degrés Celsius. *Listeria innocua* ressemble beaucoup à ses autres membres de la famille, la *Listeria monocytogenes* pathogène (Buchrieser et al., 2003).

3- *Bacillus cereus*

Est une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. La morphologie du germe correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 µm de large pour 3 à 4 µm de long, sporulé, mobile grâce à une ciliature_péritriche, d'une longueur supérieure à 3 µm et d'un diamètre moyen de 1,4 µm et de type respiratoire aéro-anaérobie, présentant une positivité à la

coloration de Gram, et synthétisant deux types de toxines : une toxine thermostable et une toxine thermolabile. Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, la température optimale étant d'environ 37 °C.

4- *Escherichia coli*

Bacilles à gram négatifs asporules, la famille des entérobactéries, fermentent le lactose et le glucose, responsables des infections urinaires, septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites.

5- *Klebseila pneumoniae*

Non mobiles, capsulés avec colonies à aspect de muqueuses sensibles à la Gentamicine, Kanomycine, Céphalosporine et Polymyxine B mais pas sensibles à la pénicilline. Commensale du tube digestif, provoquent des infections urinaires ou respiratoires parfois compliquées de septicémies et des infections nosocomiales (**Garbannelle et al., 1987**).

6- *Salmonella typhique*

Ce sont des entérobactéries bacilles à Gram négatifs , mobiles dans toutes les directions grâce à des flagelles. Elles sont aéroanaérobies facultatifs, Elles possèdent un génome sous la forme d'un chromosome de près de 5 millions de paires de bases, qui code pour environ 4.500 protéines, Elles provoquent deux types de maladies : des gastro-entérites par intoxication alimentaire (salmonellose), et des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.

7- *Enterococcus faecalis*

Gram positif anaérobie facultatifs, flore normale du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines, et de la cavité orale, entraînent des infections des voies urinaires, des plaies et des tissus mous. une endocardite en présence de valvules cardiaques déjà lésées, résistant aux β -lactames, aux aminoglycosides et à la vancomycine (**Teixeira et al., 2007**).

8- *Salmonella enterica*

est une forme de tige , flagellé , anaérobie facultative , Gram négatif bactérie et un membre du genre *Salmonella* . Un certain nombre de sérovars sont des agents pathogènes humains sérieux. *Salmonella enterica* à 7 sous-espèces, et chaque sous-espèce à associé des sérotypes qui diffèrent selon la spécificité antigénique. Il existe plus de 2500 sérovars pour *S. Enterica* . *Salmonella bongori* était auparavant considérée comme une sous-espèce de *S. enterica* , mais elle est maintenant l'autre espèce du genre *Salmonella* . La plupart des sérotypes de *Salmonella* pathogènes humains appartiennent à la sous-espèce entérique.

9- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou SARM est une infection bactérienne qui résiste aux antibiotiques de type méthicilline.

10- *Pseudomonas aeruginosa*

Bacille à Gram négatif, mobile aérobique, non capsulé. Agent pathogène opportuniste actif, résistance à l'ampicilline, céphalothine, triméthoprine et acide nalidixique. provoque des infections nosocomiales, sous forme d'infections urinaires, d'infections du sang, des plaies et de l'appareil respiratoire (**Perry et al., 2004**).

❖ Champignons

1- Levures

1.1- *Candida albicans*

Levures avec colonies grandes et rondes, vivant à l'état normal dans la bouche, le vagin et le tube digestif, responsable d'infections fongiques superficielles (le muguet, des vulvo-vaginites) et systémiques chez des individus immunodéprimés (**Art et Shears, 1997**).

1.2- *Candida tropicalis*

Candida tropicalis (céréales, eau, sol), représente environ 4 % des *Candida spp.* isolées chez l'homme (tube digestif, voies urinaires et respiratoires) (**Weinberger et al., 2005**)

2- Moisissures

❖ *Aspergillus*

Aspergillus est un genre fongique asexué, qui consiste à plus de 180 espèces officiellement reconnues réparties en 18 groupes (essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur) morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches. Il se caractérise par des longs hyphes qui se terminent par la formation d'une structure globuleuse, contenant des spores ressemblant la forme d'un goupillon (**Pasqualotto, 2010**).

2-1 -*Aspergillus flavus*

Ce sont des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanche puis jaunes-verts leur température optimale pour la croissance est 37°C, la vitesse de croissance est de 4 à 5 jours (**chabasse et al., 2002**)

2-1- *Aspergillus niger*

L'*Aspergillus niger*, l'espèce la plus commune, soit reconnu comme opportuniste pathogène, sans spécialisation d'hôte, les autres membres de la section *Nigri* sont généralement considérés comme des champignons bénins. Capacité de produire l'ochratoxine

A (3 à 10% des souches connues d'*A. niger* produisent ces mycotoxines sous certaines conditions fermentatives) (Masayuki et Katsuya, 2010).

Annexe 3 : Préparation des milieux de culture

Gélose Mueller-Hinton

Extrait de viande	2g
Peptone de caséine.....	15 g
Amidon de maïs.....	1.5g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1L

pH = 7.4

Autoclavage pendant 15min à 120C°

Milieu Sabouraud

Peptone de caséine.....	5g
Peptone de viande.....	5g
Glucose.....	20g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1L

pH =5

Autoclavage pendant 15 min à 120C°

Bouillon Nutritif

Peptone.....	10g
NaCl.....	5g
Extrait de Bœuf.....	10g
Eau distillée	1L

pH = 7.3 ± 0.2

Autoclavage pendant 15 min à 120C°

Milieu Sabouraud-liquide

Peptone de caséine.....	5g
Peptone de viande.....	5g
Glucose.....	20g

pH =5

Autoclavage pendant 15 min à 120C°.

Annexe 4 : Préparation des réactifs

- **Réactif Drangendroff** : Il s'agit d'un mélange (V/V) de deux solutions A et B.

➤ **Solution A :**

Nitrate de bismuth.....0.85g

Eau distillée.....40ml

Acide acétique.....10ml

➤ **Solution B :**

Iode de potassium.....8g

Eau distillée.....2ml

- ❖ Nous mélangeons les deux solutions, ensuite nous ajoutons 20ml de l'acide acétique et nous complétons à 100 ml avec de l'eau distillée

- **Préparation de réactif Fehling** : Il s'agit d'un mélange (V/V) de deux solutions A et B.

➤ **Solution A :**

CuSO₄.....35

g

Eau distillée.....500ml

H₂SO₄.....5ml

- ❖ Laisser refroidir et compléter à 1L avec de l'eau distillée

➤ **Solution B :**

Sel de Seignette150g

Eau distillée.....500ml

- ❖ Refroidir et ajouter 300 ml de lessive non carbonatée puis ajuster jusqu'au 1L avec de l'eau distillée

NB : Mélanger les deux solutions à volume égale au moment de l'emploi.

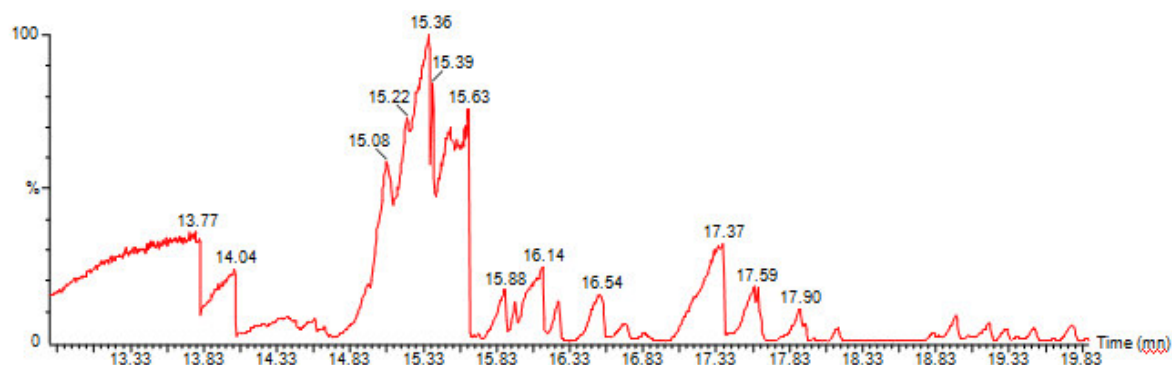
Annexe 5 : Détermination de la teneur en eau

Plante	Essai 01	82.57 %	Moyenne	Ecart-type
	Essai 02	81.18 %		
	Essai 03	82.60 %		
			82.12%	0,006

Annexe 6 : Résultats du rendement d'extraction après deux types de séchage

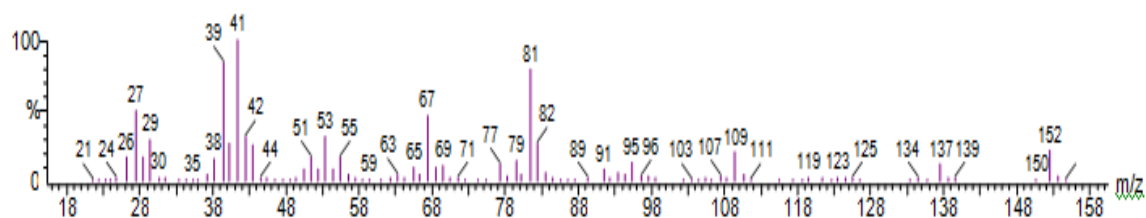
Rendement après séchage à l'étuve		Rendement après séchage à l'air libre	
1	0.18	1	0.615
2	0.876	2	0.413
3	0.346	3	0.458
4	0.413	4	0.689
Moyenne	0.453	Moyenne	0.543
Ecart-type	0.258	Ecart-type	0.112

Annexe 7 : Chromatogramme de l'analyse de l'huile essentielle par GC/MS (*S.calamintha*)

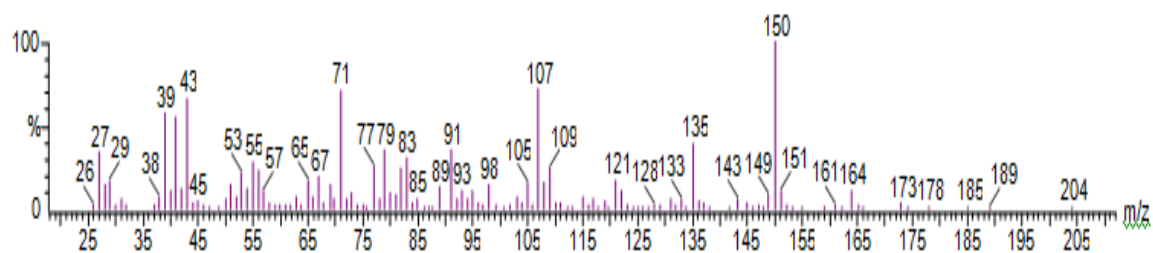


Annexe 8 : Spectres de masse de l'huile essentielle de *S.calamintha*

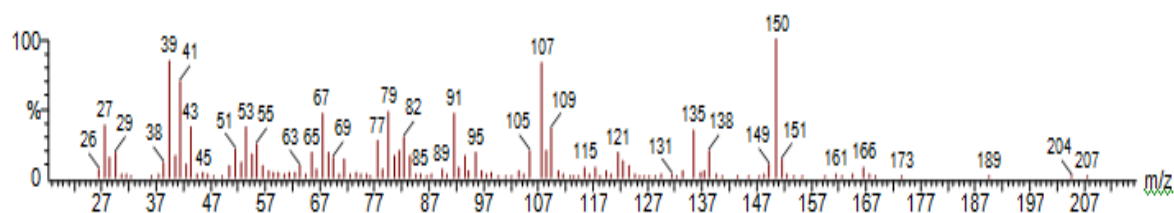
❖ Temps de rétention : 13.77mn



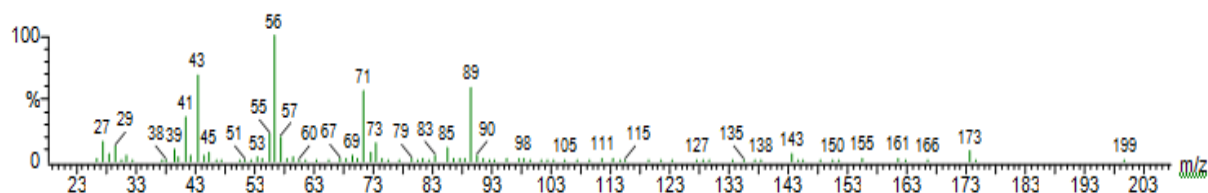
❖ Temps de rétention : 15.08mn



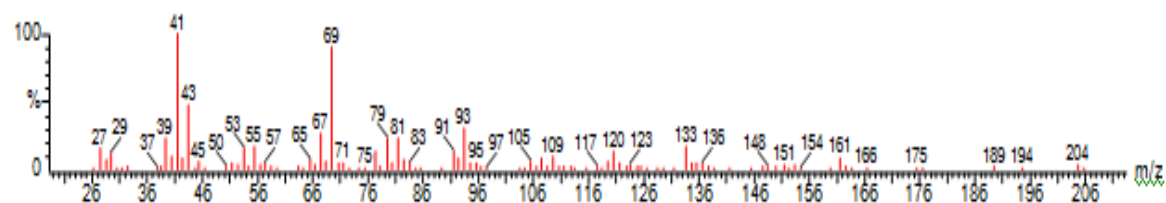
❖ Temps de rétention : 15.36mn



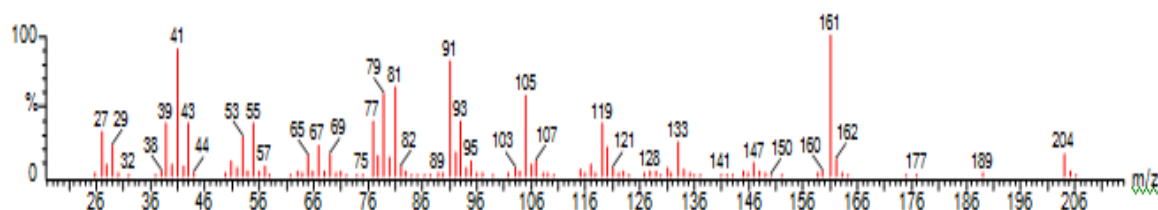
❖ Temps de rétention : 15.63mn



❖ Temps de rétention : 16.54mn



❖ Temps de rétention : 17.28mn



Annexe 9 : Densité optique de la réduction du DPPH par l'huile et les standards (AA et BHT)

	C1	C2	C3	C4	C5	C.control
Huile	0.654	0.635	0.646	0.665	0.658	0.707
AA	-0.020	-0.027	0.006	0.080	0.203	0.707
BHT	0.214	0.292	0.426	0.458	0.534	0.522

Annexe 10 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle, AA et BHT

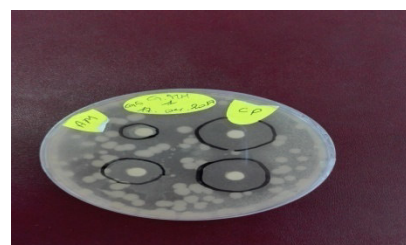
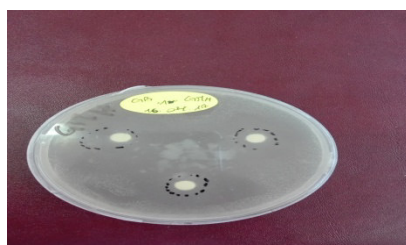
	C1	C2	C3	C4	C5
% d'inhibition de BHT	59%	44.06%	18.39%	12.26%	-2.29%
% d'inhibition d'AA	102.82%	103.81%	99.15%	88.68%	71.28%
% d'inhibition d'HE	7.49%	10.18%	8.62%	5.94%	6.93%

Annexe 11 : Résultats de l'activité antibactérienne

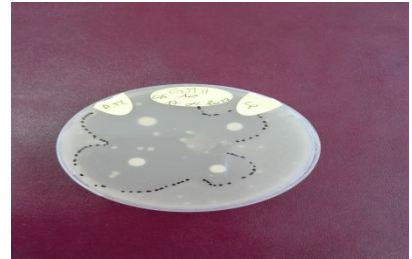
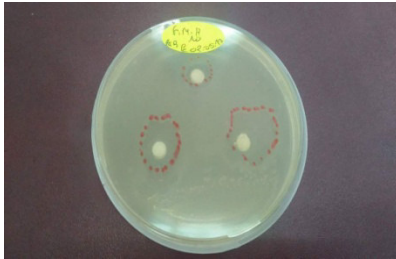
Test de l'huile essentielle

Test de l'antibiotique

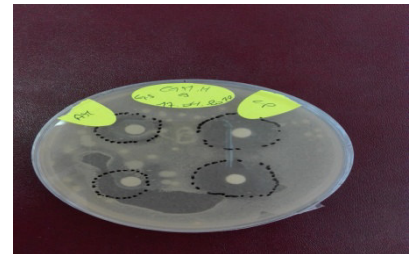
Staphylococcus aureus



Pseudomonas aerogenosa



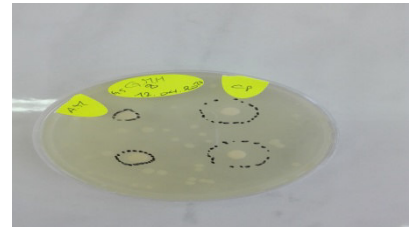
SARM



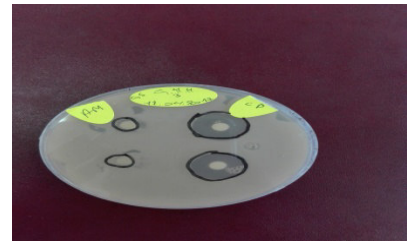
Klebsiella pneumoniae



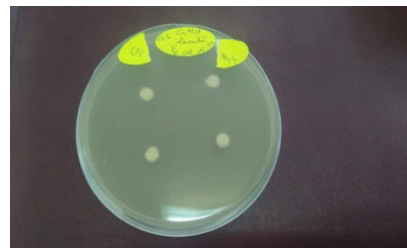
Salmonella enterica



Bacillus cereus



Listeria innucua



Annexe 12 : Test de Student pour les souches bactériennes

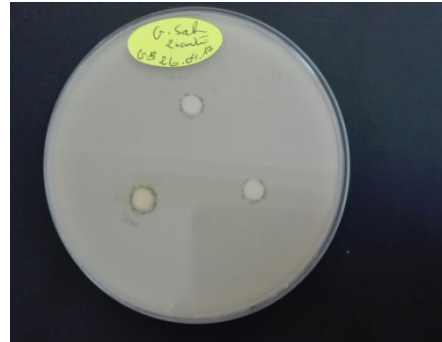
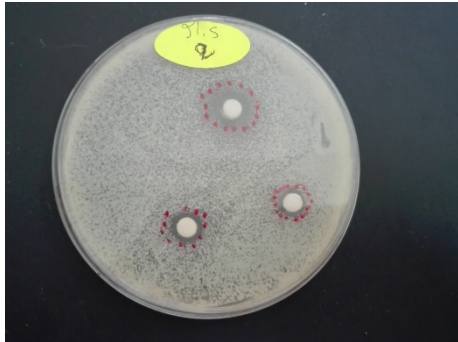
Souche bactériennes	Chloramphénicol	Amoxicilline
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.015	0.681
<i>Listeria innucua</i>	0.0004	0.0004
<i>Bacillus cereus</i>	0.249	1,5234E-05
<i>E.coli</i>	0.0004	0.0545
<i>Klebseila pneumoniae</i>	1,11227E-06	0.0006
<i>Salmonella typhique</i>	0.093	0.001
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.004	0.018
<i>Salmonella enterica</i>	0.0015	0.9194
<i>SARM</i>	0.117	7,98333E-05
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	0.0085	0.0005

Annexe 13 : Résultats de l'activité antifongique (Anti-candida)

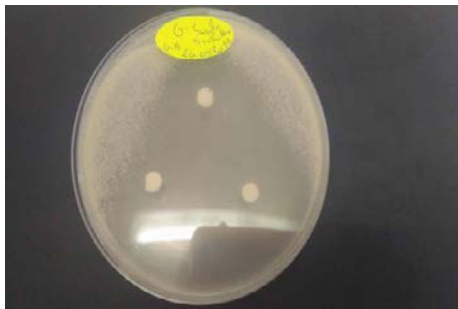
Test de l'huile essentielle

Test de l'antifongique

Candida tropicalis 1



Candidas tropicalis 2



Annexe 14 : Test de Student pour les souches fongiques (levure)

Souche fongique	Fongenal
<i>Candidas albicans</i>	0.0019
<i>Candidas tropicalis 1</i>	0.0666
<i>Candidas tropicalis 2</i>	0.0006

Annexe 15 : Résultats de l'activité antifongique (Anti-moisissure)

Test de l'huile essentielle

Témoin

Test de l'antifongique

Aspergillus flavus



Aspergillus niger 1



Aspergillus niger 2





Glossaire

Glossaire

- **Akène**

Est un fruit, sec, dont la graine unique pas soudée à son enveloppe appelée péricarpe, il ne s'ouvre pas pour se vider de son contenu : c'est un fruit indéhiscent.

- **Alléopathique**

Est l'ensemble des interactions biochimiques direct ou indirect, positive ou négative d'un organisme sur un autre inhibant le développement de nombreuses espèces.

- **Antagonisme**

Se dit de toute substance, organe ou phénomène dont l'action est opposée à toute autre substance, organe ou phénomène.

- **Apoptose**

Est une forme physiologique de la mort cellulaire hautement régulé et qui est indispensable à la survie des organismes multicellulaire.

- **Endémique**

En biologie une espèce ou un organisme endémique est spécifique à une région géographique particulière et bien limitée. Un organisme est dit endémique lorsqu'il ne vit que dans une région donnée.

- **Gamopétales**

Sous-classe de plantes dicotylédones dont les fleurs ont une corolle formée de pétales soudés entre eux.

- **Spore**

Elément issu de la reproduction sexuée des champignons et destiné à assurer la survie du champignon et sa propagation.

- **Synergie**

Est un type de phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant en commun (ensemble) créent un effet global.