

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences agronomiques

Spécialité: Sciences Alimentaires

Par

Meriem TABTI

Thème:

EFFET DE QUELQUES SUBSTANCES NATURELLES SUR DES BACTERIES IMPLIQUEES DANS LA PATHOLOGIE GASTRO- INTESTINALE

Soutenue le/...../....., devant le jury composé de:

Malika MEZAINÉ bent Ahmed	Professeur	Université H.B.B. Chlef	Présidente
Rachida ALLEM	Professeur	Université H.B.B. Chlef	Rapporteur
Rabah CHADLI	Professeur	Université de Mostaganem	Examinateur
Ahmed Mohammed Ali BEKADA	Professeur	Université de Tissimssilet	Examinateur
Meriem MOKHTAR	Professeur	Université de Mostaganem	Examinatrice
Benali SETTI	Professeur	Université H.B.B. Chlef	Examinateur
Abdelkader DILMI BOURAS	Professeur	Université H.B.B. Chlef	Invité d'honneur

Année universitaire : 2022/2023

Résumé

Les objectifs de ce travail consistaient à étudier l'activité antibactérienne de six huiles essentielles à l'égard de quelques bactéries pathogènes responsables des infections gastro-intestinales. Les huiles essentielles étudiées ont été extraites à partir des feuilles de *Mentha pulegium*, *Ocimum basilicum* et de *Mentha spicata* et aussi à partir des graines d'*Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* et de *Carum carvi*. Les huiles essentielles ont été extraites par la méthode d'hydrodistillation. Les rendements en huiles essentielles varient de $0,6 \pm 0,06$ à $4,2 \pm 0,02\%$. Les huiles essentielles extraites possèdent des propriétés physico-chimiques et organoleptiques conformes aux normes. Les résultats de l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CG/SM indiquent une abondance des composés monoterpéniques tels que le carvone qui est de 63,92% pour l'huile essentielle de *Carum carvi* et de 67,08% pour l'huile essentielle de *Mentha spicata*; l'eugénol est de 65,22% pour l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*. L'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion à partir d'un disque des huiles essentielles vis-à-vis de huit bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens* et *Helicobacter pylori*) a montré un effet important sur toutes les bactéries pathogènes étudiées. Les meilleurs diamètres des zones d'inhibition ont été observés respectivement avec les huiles essentielles de *Mentha spicata* ($34,16 \pm 0,30$ mm) et de *Mentha pulegium* ($34,50 \pm 0,40$ mm) vis-à-vis d'*H.pylori*. Des diamètres de zone d'inhibition de $33,00 \pm 1,87$ et de $30,50 \pm 0,40$ mm ont été constatés avec l'huile essentielle de *Carum carvi* vis-à-vis de *B. cereus* et de *Citrobacter freundii* respectivement. Les résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution ont montré que *H.pylori*, *C.perfringens*, *E.coli* et *S. typhi* ont été inhibées par les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et *Foeniculum vulgare* à une CMI de 1,56 mg/ml. Une CMI de 0,19 mg/ml des huiles essentielles de *Carum carvi*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum* était suffisante pour inhiber la croissance de *H.pylori*, *S. typhi* et *B. cereus*. Les rapports CMB/CMI ont indiqué que les huiles essentielles étudiées ont exercé un effet bactéricide vis-à-vis de la plupart des souches bactériennes testées. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de ces huiles essentielles permettrait de protéger l'homme contre les bactéries responsables de pathologies gastro-intestinales.

Mots clés : Huiles essentielles, Hydrodistillation, CG/SM, Bactéries pathogènes, Activité antibactérienne, Pouvoir bactéricide.

Abstract

The objectives of this work were to study the antibacterial activity of six essential oils against some gastrointestinal pathogens bacteria. The essential oils studied were extracted from the leaves of *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* and *Ocimum basilicum* and also from the seeds of *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* and *Carum carvi*. Essential oils were extracted by hydrodistillation method. The yields of the extraction of essential oils ranged from $0,6 \pm 0,06$ to $4,2 \pm 0,02\%$. Essential oils have physico-chemical and organoleptic properties that are comply with standards. The results of the analysis of the chemical composition of essential oils by CG/MS indicate the abundance of monoterpene compounds namely carvone in essential oil of *Carum carvi* (63,92%) and *Mentha spicata* (67,08%) and eugenol in essential oil of *Eugenia caryophyllata* (65,22%). The study of the antibacterial activity by the disk diffusion method of the extracted essential oils against eight pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens* and *Helicobacter pylori*) has shown an important inhibitory effect against all the pathogenic bacteria studied. The best zones of inhibition were observed with the essential oils extracted from *Mentha spicata* ($34,16 \pm 0,30$ mm) and *Mentha pulegium* ($34,50 \pm 0,40$ mm) against *H. pylori* and *Carum carvi* seeds against *B. cereus* ($33,00 \pm 1,87$ mm) and *Citrobacter freundii* ($30,50 \pm 0,40$ mm). The results of the minimum inhibitory concentration (MIC) carried out by the micro-dilution method have shown that *H.pylori*, *C.perfringens*, *E.coli* and *S. typhi* were inhibited by the essential oils of *Eugenia caryophyllata* and *Foeniculum vulgare* at a MIC of 1,56 mg/ml. An MIC of 0,19 mg/ml of the essential oils of *Carum carvi*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* was sufficient to inhibit the growth of *H. pylori*, *S. typhi* and *B. cereus*. The CMB/CMI reports indicated that the essential oils studied exhibited a bactericidal effect against almost tested strains. These results suggest that the use of these essential oils could be used to protect humans against gastrointestinal pathogens bacteria.

Keywords: Essential oils, Hydrodistillation, CG/SM, Pathogenic bacteria, Antibacterial activity, Bactericidal power.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لستة زيوت أساسية ضد بعض البكتيريا المسببة للأمراض المعدية والمعوية. تم استخلاص الزيوت الأساسية المدروسة من الأوراق (*Mentha pulegium*، *Mentha spicata*) و (*Ocimum basilicum*) ومن البذور (*Eugenia caryophyllata*، *Foeniculum vulgare* و *Carum carvi*). تم استخلاص الزيوت العطرية بطريقة التقطير. يتراوح مردود الزيوت العطرية التي تم الحصول عليها من 0.06 ± 0.6 إلى 4.2 ± 0.02 %. تتميز الزيوت الأساسية بخصائص فيزيائية - كيميائية وحسية تتوافق مع المعايير. تشير نتائج تحليل التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة CG / MS بوجود مركبات المونوتربين مثل *carvone* بالنسبة للزيت المستخرج من *Eugenia caryophyllata* (65.22%)، أظهرت دراسة القوة المضادة للبكتيريا بطريقة الانتشار على الأقراص للزيوت العطرية المستخلصة ضد ثمانية أنواع من البكتيريا الممرضة (*Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus*، *Proteus mirabilis*، *Bacillus cereus*، *Citrobacter freundii*، *Clostridium perfringens* et *Helicobacter pylori*) تأثيرا ايجابيا على كل أنواع البكتيريا المختبرة. أفضل نتائج التثبيط لوحظت مع الزيوت الأساسية المستخرجة من *Mentha spicata* (0.30 ± 34.16 مم) و *Mentha pulegium* (0.40 ± 34.50 مم) ضد *H. pylori* والزيوت المستخلصة من *Carum carvi* ضد *B. cereus* (1.87 ± 33.00 مم) و *Citrobacter freundii* (0.40 ± 30.50 مم). أظهرت النتائج أن 1.56 ملغ/مل هو أدنى تركيز لتثبيط كل من *H. pylori* و *C. perfringens* و *E. coli* بواسطة الزيوت الأساسية المستخلصة من *Eugenia caryophyllata* و *Foeniculum vulgare*. كما أظهرت النتائج أن 0.19 ملغ/مل هو أدنى تركيز لتثبيط كل من *H. pylori*، *B. cereus* و *S. typhi* بواسطة الزيوت الأساسية المستخلصة من *Carum carvi*، *Mentha pulegium* و *Ocimum basilicum*. أشارت نتائج CMB / CMI إلى أن الزيوت الأساسية المدروسة لها تأثير مبيد ضد معظم السلالات البكتيرية المختبرة. تشير هذه النتائج إلى أن استخدام هذه الزيوت مهم لحماية الانسان بشكل أفضل من البكتيريا المسؤولة عن الأمراض المعدية والمعوية.

الكلمات المفتاحية: زيوت أساسية ، طريقة التقطير، GC/MS ، بكتيريا ممرضة، نشاط مضاد للبكتيريا، تأثير مبيد للبكتيريا .

Table des matières

Résumé

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Revue bibliographique

Chapitre I. Pathologies bactériennes des voies digestives inférieures

1. Introduction.....	4
2. Intoxication alimentaire par les staphylocoques.....	4
3. Gastroentérite à <i>Clostridium perfringens</i>	5
4. Intoxication causée par <i>Bacillus cereus</i>	5
5. Salmonellose: gastroentérite à <i>Salmonella</i>	6
6. Gastroentérite à <i>Escherichia coli</i>	6
7. Infections à <i>Citrobacter</i>	7
8. Infection à <i>Proteus sp.</i>	7
9. Infections à <i>Helicobacter pylori</i>	8
9.1. Principaux caractères.....	8
9.2. Pouvoir pathogène d' <i>Helicobacter pylori</i>	9
9.3. Endommagement de la muqueuse gastrique.....	9

Chapitre II. Monographie des plantes médicinales étudiées

1. Historique.....	11
2. Définition des plantes médicinales.....	11
3. Paramètres influençant la composition chimique des plantes médicinales.....	12
4. Domaines d'utilisation des plantes médicinales.....	12
5. Monographie des espèces étudiées.....	13
5.1. <i>Ocimum basilicum</i> (Basilic)	13
5.1.1. Généralités.....	13
5.1.2. Utilisation thérapeutique.....	13
5.2. <i>Mentha spicata</i> (Menthe verte)	13
5.2.1. Généralités.....	14
5.2.2. Utilisation thérapeutique.....	14
5.3. <i>Mentha pulegium</i> (Menthe pouliot)	14
5.3.1. Généralités.....	14
5.3.2. Utilisation thérapeutique.....	14
5.4. <i>Eugenia caryophyllata</i> (Clou de girofle)	15
5.4.1. Généralités.....	15
5.4.2. Utilisation thérapeutique.....	15
5.5. <i>Foeniculum vulgare</i> (Fenouil doux)	16
5.5.1. Généralités.....	16
5.5.2. Utilisation thérapeutique.....	16
5.6. <i>Carum carvi</i> (Carvi)	16
5.6.1. Généralités.....	16
5.6.2. Utilisation thérapeutique.....	17

Chapitre III. Activités biologiques des huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles.....	18
2. Propriétés physiques des huiles essentielles.....	18

3. Localisation et origine des huiles essentielles dans la plante.....	19
4. Composition des huiles essentielles.....	20
4.1. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des plantes aromatiques.....	21
5. Activités biologiques.....	21
5.1. Activité antibactérienne.....	22
5.2. Effet des huiles essentielles sur quelques bactéries pathogènes.....	23
5.3. Activité antifongique.....	24
5.4. Activité antivirale.....	25
6. Propriétés médicinales.....	25
7. Application des huiles essentielles dans les produits alimentaires.....	25

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel.....	27
1.1. Matériel végétal.....	27
1.2. Bactéries pathogènes.....	30
2. Méthodes.....	30
2.1. Extraction des huiles essentielles.....	30
2.1.1. Détermination du taux d'humidité.....	31
2.1.2. Rendement en huile essentielle.....	34
2.2. Caractérisation des huiles essentielles.....	34
2.2.1. Analyse des propriétés organoleptiques.....	34
2.2.2. Analyse des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	35
2.2.3. Analyse de la composition des huiles essentielles par CG/SM.....	38
2.3. Isolement et identification des bactéries pathogènes.....	38
2.4. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.....	41
2.4.1. Repiquage et revivification des souches bactériennes.....	42
2.4.2. Préparation des précultures des bactéries pathogènes.....	43
2.4.3. Interaction entre les souches pathogènes et les huiles essentielles.....	43
2.4.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	45
2.4.5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	46
2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme.....	47
2.6. Analyse statistique des résultats.....	48

Résultats et discussion

1. Détermination du taux d'humidité.....	49
2. Extraction des huiles essentielles.....	50
2.1. Rendement en huiles essentielles.....	50
2.2. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles.....	53
2.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	54
3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	57
3.1. Composition chimique des huiles essentielles de <i>Carum carvi</i> , <i>Eugenia caryophyllata</i> et <i>Foeniculum vulgare</i> par CG/SM.....	58
3.1.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Foeniculum vulgare</i>	58
3.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eugenia caryophyllata</i>	61
3.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Carum carvi</i>	63
3.2. Composition chimique des huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i> , <i>Mentha pulegium</i> et <i>Ocimum basilicum</i> par CG/SM.....	66
3.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	66
3.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	68
3.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ocimum basilicum</i>	70
4. Isolement et identification des bactéries pathogènes.....	73

4.1. Isolement et identification de <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> et <i>B. cereus</i>	73
4.1.1. Examens bactériologiques.....	73
4.1.2. Détermination des caractères biochimiques	73
4.2. Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Clostridium perfringens</i>	75
4.2.1. Examens bactériologiques.....	75
4.2.2. Détermination des caractères biochimiques.....	76
4.3. Purification et identification d' <i>Helicobacter pylori</i>	77
4.3.1. Examens bactériologiques.....	79
4.3.2. Test rapide à l'urée.....	77
4.3.3. Détermination des caractères biochimiques d' <i>H. pylori</i>	79
5. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.....	79
5.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>E. caryophyllata</i> , <i>C. carvi</i> et <i>F. vulgare</i>	79
5.1.1. Effet de l'huile essentielle d' <i>Eugenia caryophyllata</i> sur les bactéries pathogènes.....	80
5.1.2. Effet de l'huile essentielle de <i>Carum carvi</i> sur les bactéries pathogènes.....	82
5.1.3. Effet de l'huile essentielle de <i>Foeniculum vulgare</i> sur les bactéries pathogènes.....	85
5.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i> , <i>Mentha pulegium</i> et d' <i>Ocimum basilicum</i>	87
5.2.1. Effet de l'huile essentielle des feuilles de <i>Mentha spicata</i> sur les bactéries pathogènes.....	88
5.2.2. Effet d'huile essentielle des feuilles de <i>Mentha pulegium</i> sur les bactéries pathogènes.....	89
5.2.3. Effet d'huile essentielle des feuilles d' <i>Ocimum basilicum</i> sur les bactéries pathogènes.....	92
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice «CMI» et bactéricide «CMB»..	94
6.1. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE d' <i>Eugenia caryophyllata</i>	97
6.2. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE de <i>Foeniculum vulgare</i>	98
6.3. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE de <i>Carum carvi</i>	99
6.4. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE de <i>Mentha spicata</i>	100
6.5. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE de <i>Mentha pulegium</i>	101
6.6. Détermination de la CMI et la CMB de l'HE d' <i>Ocimum basilicum</i>	102
7. Effet des antibiotiques sur les souches pathogènes.....	103
Conclusion	107

Références bibliographiques

Annexes

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Au terme de la rédaction de ce mémoire, c'est un devoir agréable d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance que je dois à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse Mme Rachida ALLEM, Professeur à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef de m'avoir fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su me guider avec patience, compréhension et rigueur. Ses conseils et Ses encouragements m'ont permis de bien mener cette étude. Je lui en serai toujours reconnaissante.

J'exprime toute ma gratitude à M^{me} Malika MEZIANE bent Ahmed Professeur à Université Hassiba Benbouali de Chlef pour avoir acceptée de présider ce jury et pour son aide et ses conseils précieux. Je vous suis reconnaissante pour votre implication et votre gentillesse.

Je remercie vivement Mr Rabah CHADLI Professeur à l'Université de Mostaganem, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail en acceptant d'examiner ma thèse. J'adresse mes vifs remerciements pour vos efforts, contributions et commentaires précieux pour l'amélioration de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Ahmed Mohammed Ali BEKADA Professeur à l'université de Tissimssilet, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.

Je suis très honoré de la présence de Mr Benali SETTI Professeur à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements à Mme Meriem MOKHTAR Professeur à l'Université de Mostaganem, pour avoir accepté d'être examinatrice et de faire partie de mon jury de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et mes respects.

J'exprime mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à Mr Abdelkader DILMI BOURAS Professeur à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de ma vie professionnelle.

Vous avez su faire partager votre expérience. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour votre aide dans tous les moments où j'en avais besoin.

Mes remerciements vont particulièrement à Mr Abdelaziz MEROUANE maitre de conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée. Merci beaucoup.

Un remerciement très particulier à mon amie et sœur M^{elle} Safia Ali Haimoud, maitre de conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour sa disponibilité et son aide exceptionnelle qu'elle m'a apporté lors de la rédaction de ce mémoire, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement ma chère amie, M^{elle} Malika Meziane, Maitre de conférences A à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour sa gentillesse et son aide efficace durant la période de l'expérimentation.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à mes chères amies et sœurs Mme Meriem Sadoud et Mme Fouzia Nemar, Maitres de conférences à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour l'aide qu'elles m'ont apportées et leurs encouragements durant cette période.

Mes plus profonds remerciements vont à Mr Mohamed KOIDRI Maitre de conférences à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef pour son aide efficace, conseils et sa gentillesse.

Je remercie beaucoup Mme Meriem Medjekane, pour ses encouragements, ses conseils, son soutien morale et pour tout ce qu'elle m'a apporté tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel des laboratoires dans lesquels ce travail a été effectué.

Je ne saurais terminer cette série de remerciement sans penser à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé, ma famille, mes ami(e)s, collègues et toutes les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation de ce travail, recevez mes remerciements sincères.

Meriem

DEDICACES

A la mémoire de ma sœur et fille : Mme Meriem TOUALBIA, que la douleur de son absence est toujours présente. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde et repose son âme en paix !

A mes très chères filles

Amira et Azhar

A mon cher époux

Abdelkader

A toute ma famille en particulier :

Ma sœur et mes frères, mes nièces et neveux, Merci pour vos encouragements.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail

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

MERJEM

Liste des abréviations

AFNOR	Association Française de Normalisation
AMC	Amox + acide clavulanique
AMC	Amoxicilline
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHIB	Brain Heart Infusion Borth
BMH	Bouillon Mueller Hinton
CEF	Céfadroxil
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CG/SM	Chromatographie à phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse
CHL	Chloramphenicol
CFU	Colony Forming Unit
CIP	Ciprofloxacine
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CLR	Clarithromycine
CLSI:	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMB	Eosine Méthyle Bilié
ERY	Erythromycine
ETP	Ertapénème
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
GMI	Gentamicine
HE	Huile essentielle
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IPM	Imipénème
KMN	Kanamycine
MET	Métronidazole
OMS	Organisation mondiale de la santé
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RIF	Rifampicine
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TET	Tétracycline
TIC	Ticarcilline
TOB	Tobramycine
VAN	Vancomycine

Liste des tableaux

Tableau 01:	Situation géographique des stations de récolte.....	29
Tableau 02:	Milieus d'isolement des souches pathogènes.....	39
Tableau 03:	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.....	54
Tableau 04:	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	57
Tableau 05:	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Foeniculum vulgare</i> par CG/SM.....	60
Tableau 06:	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eugenia caryophyllata</i> par CG/SM.....	62
Tableau 07:	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Carum carvi</i> par CG/SM.....	65
Tableau 08:	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> analysée par CG/SM.....	67
Tableau 09:	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> analysée par CG/SM.....	69
Tableau 10:	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Ocimum basilicum</i> par CG/SM.....	72
Tableau 11:	Identification des bactéries pathogènes par galerie API20E...	75
Tableau 12:	Identification des caractères biochimiques d' <i>H. pylori</i>	78
Tableau 13:	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles extraites à partir des graines vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation à 37°C.....	79
Tableau 14:	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles extraites des feuilles vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation à 37°C.....	88
Tableau 15:	Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) des huiles essentielles en mg/ml et le rapport CMB/CMI.....	97
Tableau 16:	Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques vis-à-vis des souches pathogènes après 24 h d'incubation à 37°C.....	105

Liste des figures

Figure 01: Espèces végétales étudiées.....	28
Figure 02: Carte géographique de la région de Chlef montrant les trois stations de récolte des espèces végétales.....	29
Figure 03: Dispositif d'extraction par hydrodistillation.	32
Figure 04: Technique de relargage.....	33
Figure 05 : Dispositif de séparation du solvant.....	33
Figure 06: Principe de la méthode d'aromatogramme.....	44
Figure 07: Pourcentage d'humidité des espèces végétales étudiées.....	49
Figure 08: Rendement en huile essentielle.....	51
Figure 09: Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h.....	77
Figure 10: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis de <i>C. freundii</i>	80
Figure 11: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	80
Figure 12: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis de <i>B. cereus</i>	81
Figure 13: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis de <i>C. perfringens</i> ...	81
Figure 14: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis de <i>S. typhi</i>	82
Figure 15: Effet de l'H.E d' <i>Eugenia caryophyllata</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	82
Figure 16: Effet de l'H.E de <i>Carum carvi</i> vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i>	83
Figure 17: Effet de l'H.E de <i>Carum carvi</i> vis-à-vis de <i>Citrobacter freundii</i>	83
Figure 18: Effet de l'H.E de <i>Carum carvi</i> vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	84
Figure 19: Effet de l'H.E de <i>Carum carvi</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	84
Figure 20: Effet de l'H.E de <i>Foeniculum vulgare</i> vis-à-vis de <i>C. freundii</i>	85
Figure 21: Effet de l'H.E de <i>Foeniculum vulgare</i> vis-à-vis de <i>P.mirabilis</i>	85
Figure 22: Effet de l'H.E. de <i>Mentha spicata</i> vis-à-vis d' <i>H.pylori</i>	89
Figure 23: Effet de l'H.E. de <i>Mentha spicata</i> vis-à-vis d' <i>H.pylori</i>	89
Figure 24: Effet de l'H.E. de <i>Mentha spicata</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	90
Figure 25: Effet de l'H.E. de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis d' <i>H.pylori</i>	91
Figure 26: Effet de l'H.E. de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis de <i>S.typhi</i>	91
Figure 27: Effet de l'H.E de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	92
Figure 28: Effet de l'H.E de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis de <i>S.typhi</i>	92
Figure 29: Effet de l'H.E d' <i>Ocimum basilicum</i> vis-à-vis d' <i>H.pylori</i>	93
Figure 30: Effet de l'H.E d' <i>Ocimum basilicum</i> vis-à-vis de <i>S. typhi</i>	93
Figure 31: Effet de l'H.E d' <i>Ocimum basilicum</i> vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	93
Figure 32: Effet de l'H.E d' <i>Ocimum basilicum</i> vis-à-vis de <i>C. Freundii</i>	93

Introduction

Introduction générale

La phytothérapie est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la phytothérapie n'a jamais cessé d'évoluer. De nos jours ces deux types de médication se retrouvent intimement liés puisque le modèle moléculaire de la plupart des médicaments mis sur le marché, ont pour origine la plante (Packer, 2021).

De nombreux composés naturels isolés à partir de plantes ont démontré un large spectre d'activités biologiques. Parmi ces différents types de substances naturelles, les huiles essentielles des plantes médicinales ayant reçu une attention particulière comme agents naturels à grand potentiel pour la conservation des aliments. En outre, les huiles essentielles se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique (Wei et *al.*, 2022), hépatoprotecteur (Elufioye et Habtemariam, 2020), antiviraux (Ashrafi et *al.*, 2022), antimicrobien, anticancéreux (Elumalai et *al.*, 2022) et antioxydants (Viuda-Martos et *al.*, 2011).

La composition chimique en huile essentielle est fortement influencée par des facteurs biotiques et abiotiques. Elle dépend des conditions climatiques, saisonnières et géographiques ainsi que de la période de récolte de la plante voire de la technique d'extraction (Colombo et *al.*, 2013). En outre, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est en relation directe avec la composition et la concentration en composés volatils, le type de microorganismes cibles, les conditions et les méthodes de traitement (Altun et Yapici, 2022).

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité. La situation est plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles et en raison de leurs effets secondaires, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des

stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle (Bendahou et al., 2007).

De nombreuses bactéries pathogènes peuvent provoquer de graves maladies infectieuses en sécrétant des toxines qui perturbent l'activité du tube digestif. Ces maladies se manifestent par des diarrhées aiguës et des vomissements qui peuvent être d'origine bactérienne (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* et *Helicobacter pylori*...etc), parasitaire ou virale (Lauwers et al., 2010).

Les Salmonelles et certaines souches d'*Escherichia coli* sont responsables d'infections sévères chez l'homme. Elles sont souvent à l'origine de la mortalité infantile dans les pays en voie de développement et restent un risque permanent dans les pays industrialisés (Elnour et al., 2022).

L'infection à *Helicobacter pylori* est la plus répandue dans le monde, touchant environ un tiers de la population des pays développés et plus des deux tiers dans les pays en voie de développement; cette infection s'exprime par une inflammation aiguë de la muqueuse gastrique définie par des lésions endoscopiques entraînant chez l'homme des gastrites, des ulcères et même des cancers de l'estomac (Diaconu et al., 2022).

Par ailleurs, les plantes médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques et de la pharmacie. Une plante médicinale est toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Oreopoulou et al., 2019).

De nombreux substituts ont été donc proposés par les chercheurs, parmi ces alternatives, les extraits de plantes dont les huiles essentielles sont dotées d'une activité biologique et olfactive et ont un fort potentiel pour remplacer les antibiotiques (Malik et al., 2019).

C'est dans cette optique, que nous nous sommes intéressés à étudier, *in vitro*, l'effet des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de certaines plantes (*Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum*) et des graines de plantes (*Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* et *Carum carvi*) vis-à-vis de certaines bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens* et *Helicobacter pylori*) impliquées dans la physiopathologie digestive.

L'étude bibliographique a été répartie en trois chapitres :

Le premier chapitre traite les différentes pathologies bactériennes des voies digestives inférieures, le deuxième présente une connaissance détaillée des différentes caractéristiques des plantes étudiées, leur classification, description, composition chimique et leurs propriétés pharmacologiques, alors que le troisième chapitre développe des généralités et quelques activités biologiques des huiles essentielles.

Dans la partie expérimentale, nous avons fixé plusieurs objectifs, à savoir:

- Extraction des huiles essentielles à partir des feuilles de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Ocimum basilicum* et des graines d'*Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* et *Carum carvi*;
- Détermination des propriétés physicochimiques des huiles essentielles extraites;
- Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG/SM);
- Isolement de quelques bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive;
- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites vis-à-vis de quelques souches bactériennes impliquées dans la physiopathologie gastro-intestinale.

Revue Bibliographique

Chapitre I. Pathologies bactériennes des voies digestives inférieures

1. Généralités

Les voies digestives constituent un environnement stérile, à la naissance la colonisation bactérienne débute au cours du processus de l'accouchement et se développe avec l'âge selon le profil de l'alimentation qui fait modifier chaque fois la flore digestive. Cette modification peut, à son tour entraîner une augmentation de la charge bactérienne pathogène et toxique provoquant de nombreuses pathologies gastro-intestinales (Steer, 2000; Tortora et Grabowski, 2001).

Les infections gastro-intestinales sont des infections d'origine bactérienne, parasitaire ou virale qui provoquent des inflammations touchant l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Ces infections ont lieu si on ingère des aliments ou des boissons qui sont contaminées par des microorganismes pathogènes. Ces derniers peuvent traverser la muqueuse intestinale et libérer des toxines qui provoquent les symptômes de la maladie (Regnault, 2002).

L'intoxication résulte de l'ingestion des aliments sur lesquels des microorganismes se sont développés. La dysenterie est une maladie infectieuse caractérisée par des diarrhées sévères souvent mêlées de sang ou de mucus. Les maladies accompagnées d'une inflammation des muqueuses de l'estomac et de l'intestin s'appellent la gastroentérite (Tortora et *al.*, 2003).

2. Intoxication alimentaire par les staphylocoques

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif appartenant à la famille des micrococaceae. Ce sont des aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, non sporulés et catalase positive. *Staphylococcus aureus* est la principale espèce entérotoxigène (Bourgeois et *al.*, 1996). *S. aureus* se multiplie plus facilement en aérobiose qu'en anaérobiose, il est mésophile, généralement inhibé en présence d'une flore compétitive importante (Joly et Alain, 2003).

L'intoxication alimentaire par les staphylocoques qui, survient lors de l'ingestion d'entérotoxines produites par *S. aureus* est la principale cause des gastroentérites. *S. aureus* sécrète plusieurs toxines qui endommagent les tissus, ce qui augmente la virulence de la bactérie (Bourgeois et *al.*, 1996).

3. Gastroentérite à *Clostridium perfringens*

Les *Clostridium* sont classiquement définis comme des bactéries de la famille des *Bacillaceae* (bacilles et cocci sporulés) à Gram positif, de forme bacillaire, mobiles par ciliature Péritriches ou immobiles et catalase négative. Elles sont anaérobies strictes, mais peuvent résister à des concentrations plus ou moins fortes en oxygène (Guiraud, 1998).

Clostridium perfringens produit un grand nombre de "toxines" qui ont des activités très variées. Sur la base de la production de 04 toxines létales majeures, les *Clostridium perfringens* ont été séparés en 05 types A, B, C, D, E. Les 05 types de *Clostridium perfringens* ne peuvent pas être différenciés morphologiquement ou biochimiquement (Reynolds et *al.*, 1986; Regnault, 2002).

4. Intoxication causée par *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un germe ubiquiste et tellurique appartenant à la famille des *Bacillaceae*. Ce sont des bacilles à Gram positif, mobile, de 1 à 1,2 µm de large sur 3 à 7 µm de long, catalase positive, formant des spores ovoïdes résistantes à 100°C et donc à la pasteurisation, situés en position centrale ou paracentrale. C'est une bactérie anaérobie facultative (Logan et Devos, 1998; Guiraud, 1998).

Bacillus cereus est un fort producteur d'enzymes, possédant une phospholipase très active. Il peut métaboliser l'arabinose et le mannitol, et réduire le nitrate en nitrite (Tortora et Grabowski, 2001; Ackermann et *al.*, 1995).

Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores (une seule spore par cellule végétative) souvent très résistantes dans le milieu extérieur (Forsyth et *al.*, 1998).

En effet, certaines espèces de *Bacillus* produisent des spores dont la surface est hydrophobe ce qui leur permet d'adhérer fortement à divers matériaux et de résister aux procédés de nettoyage. C'est le cas notamment des spores de *Bacillus cereus* qui s'attachent très bien aux surfaces en acier inoxydable et qui posent de graves problèmes dans les industries alimentaires (Husmark et Rönner, 1990; Lund, 1990).

5. Salmonellose: gastroentérite à *Salmonella*

Les bactéries du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des Entérobacteriaceae. Ce sont des bacilles de 0,7 à 1,5 µm de large et 2,0 à 5 µm long, à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mobiles grâce à une ciliature péritriche, chimioorganotrophes et ne formant pas d'endospore. Elles sont caractérisées par une catalase positive et oxydase négative (Gledel, 1988).

La dose infectieuse de Salmonellose peut être inférieure à 1000 bactéries. La période d'incubation de la maladie est de 12 à 36 heures. Les Salmonelles envahissent d'abord les cellules de la muqueuse intestinale. Le mécanisme de pénétration de la bactérie est assez spectaculaire. Une fois dans la cellule, les bactéries se multiplient, traversent la muqueuse et pénètrent les systèmes lymphatique et cardiovasculaire par l'intermédiaire des quelles atteignent d'autres organes où elles peuvent provoquer des abcès. La maladie se manifeste habituellement par une fièvre modérée, des nausées, des vomissements, de la diarrhée parfois sanglante et des douleurs abdominales. Ces signes régressent en quelques jours, une semaine environ (Bourgeois et *al.*, 1996; Bergeron et Dufour, 2004).

6. Gastroentérite à *Escherichia coli*

Escherichia coli appartient au groupe des coliformes, d'origine fécale et responsable d'intoxications à cause d'un développement abondant. Ce sont des bâtonnets courts à Gram négatif, catalase positive, oxydase négative et anaérobie facultative (Guiraud, 1998).

Les bactéries coliformes sont habituellement inoffensives, mais certaines souches peuvent être pathogènes et possèdent des fimbriae spécifiques qui leur permettent d'adhérer à certaines cellules épithéliales de l'intestin. Ces bactéries produisent aussi des toxines responsables de troubles gastro-intestinaux. Il existe plusieurs biotypes d'*Escherichia coli* pathogènes qui diffèrent par leur virulence et la sévérité des dommages qu'ils provoquent (Guechi, 2002; Tortora et al., 2003; Joly et Alain, 2003).

7. Infections à *Citrobacter*

Les souches du genre *Citrobacter* appartenant à la famille des Entérobacteriaceae sont des bacilles droits à Gram négatif, isolés ou groupés en paire, d'environ 1,0 µm de diamètre sur 2,0 à 6,0 µm de longueur (Guiraud, 1998).

Les souches de *Citrobacter freundii* isolées des selles synthétisent une entérotoxine thermostable apparentée à celle d'*Escherichia coli*. Elles sont responsables de diarrhées chez l'homme et de toxi-infections alimentaires qui se traduisent par une gastroentérite sévère suivie parfois d'un syndrome hémolytique urémique (Guiraud, 1998; Euzéby, 2000).

8. Infection à *Proteus sp*

Les *Proteus sp* sont des bacilles à Gram négatif, très généralement mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 1,0 µm à 80 µm de longueur (Guiraud, 1998). Les *Proteus sp* sont des entérobactéries responsables de nombreuses infections chez l'homme, en particulier chez les malades hospitalisés. Ils constituent en fait un groupe de bactéries génétiquement très hétérogènes (Berche et al., 1988).

La mobilité des *Proteus sp* s'effectue soit par le mécanisme classique de la nage soit par essaimage. La nage est observée après culture dans un milieu liquide. Les bactéries se présentent alors sous la forme de courts bacilles (de 1,0 à 3,0 µm) pourvus de 6 à 10 flagelles. L'essaimage (ou "swarming") est une alternative à la nage observée lorsque les bactéries sont cultivées en milieu solide (Burne et Chen, 2000 ; Brenner et al., 2000).

9. Infections à *Helicobacter pylori*

La gastrite est une inflammation de la muqueuse gastrique où sont distinguées les formes aiguës et chroniques. Dans la forme aiguë, l'inflammation peut être due à la prise d'aspirine ou autres anti-inflammatoires, un excès d'alcool ou un stress important. Dans la forme chronique, la cause est principalement une infection à *Helicobacter pylori* (Marshall et al., 1984; Goodwin et al., 1989). La gastrite chronique peut donc évoluer vers l'ulcère gastrique.

Helicobacter pylori est une bactérie pathogène, ne colonise que la muqueuse gastrique et n'infecte pas le duodénum s'il n'y a pas de métaplasie gastrique. Elle est du genre *Helicobacter* et sa définition se résume en trois mots: hélico (du grec hélikoïde, qui veut dire spiralée) ; bacter (bâtonnet) ; pylori (désigne le pylore). Ce qui donne un bâtonnet spiralé du pylore (Bigard, 2004).

9.1. Principaux caractères

Helicobacter pylori est un bacille à Gram négatif, de forme spiralée ou incurvée de 2,5 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. Les bacilles sont généralement de morphologie homogène sur biopsies. Après culture, la morphologie devient hétérogène (Dwarakanath et al., 1994).

La mobilité d' *Helicobacter pylori* est assurée par 4 à 6 flagelles engagés de position polaire (ciliature lophotriche). *Helicobacter pylori* est cultivée sur des milieux riches additionnés de sang ou de sérum de cheval (5 à 10%). La culture est réalisée dans des jarres sous atmosphère microaérophile avec 85 % de N₂, 10 % de CO₂ et 5 % d'O₂. Après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C, les colonies apparaissent translucides, légèrement brunes et convexes (Fennerty, 1994; Enroth et al., 1999).

Helicobacter pylori possède un capital enzymatique important car elle a une catalase, oxydase, amidase, peptidase, phosphatase et surtout une uréase extracellulaire en quantité extrêmement importante. Elle possède aussi une DNase, gammaglutamyl-transpeptidase, leucine aminopeptidase, une lipase et aussi une estérase (Faucher, 1999; Megraud et al., 2000).

9.2. Pouvoir pathogène d'*Helicobacter pylori*

L'implantation gastrique d' *Helicobacter pylori* est facilitée par plusieurs facteurs :

◆ **Mobilité:** La mobilité permet à *Helicobacter pylori* de se mouvoir dans le mucus mieux que d'autres bactéries. La mobilité particulière d' *Helicobacter pylori* est non seulement due à sa forme spiralée, mais aussi à six flagelles unipolaires engagés (Skouloubris et *al.*, 2000).

◆ **Colonisation:** *Helicobacter pylori* résiste à l'acidité gastrique grâce à la production de l'uréase. Cette enzyme a besoin d'ion Ni^{2+} au niveau des sites actifs pour hydrolyser l'urée qui est normalement présente dans l'estomac en produisant du dioxyde de carbone et de l'ammoniac. Chaque bactérie se retrouve dans un microenvironnement tamponné qui la protège de l'acidité gastrique (Monteiro, 1995).

◆ **Adhérence:** L'observation histologique de biopsie a révélé qu' *Helicobacter pylori* est trouvée majoritairement dans la couche de mucus mais à proximité de la surface des cellules épithéliales gastriques. L'adhésion est due à deux types d'adhésines : Adhésine Bab A et Adhésines homologues Alp A et Alp B (Ottemann et Lowenthal, 2002).

9.3. Endommagement de la muqueuse gastrique

La bactérie traverse la muqueuse gastrique, la couche du mucus et vient se fixer sur les cellules épithéliales en provoquant des lésions qui sont dues à la synthèse d'uréase et de la cytotoxine Vac A. L'ammoniac libéré par *Helicobacter pylori* peut agir directement comme cytotoxine sur les cellules gastriques et peut gêner la respiration mitochondriale et cellulaire en réduisant la viabilité de la cellule, entraînant les lésions de la muqueuse (Gewirtz et *al.*, 2004; Andersen-Nissen et *al.*, 2005).

La lésion de base de l'infection à *Helicobacter pylori* est une gastrite, c'est-à-dire, une inflammation de la muqueuse gastrique. Elle peut évoluer vers d'autres pathologies telles que l'ulcère, gastrite et cancer gastrique (Megraud, 1994; Lee et *al.*, 2003).

Chapitre II: Monographie des plantes médicinales étudiées

1. Historique

Les végétaux peuplent la planète bien avant l'homme et ont d'abord servi à le nourrir via la cueillette puis la culture (Fouché et *al.*, 2000; Lorrain, 2013). Leur emploi a rapidement évolué en constatant leurs propriétés thérapeutiques pour traiter les blessures et les maladies. L'utilisation des arômes était également connue des civilisations de l'antiquité pour des usages religieux, cosmétiques mais aussi thérapeutiques (Lardry et Haberkorn, 2007; Festy, 2012).

Ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus-Christ, de l'époque pharaonique, qui furent les premiers à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, avec notamment un mélange d'huiles essentielles comme l'huile de cèdre, de basilic (Franchomme et *al.*, 1990 et Abrassart, 1997), et en utilisant des plantes aux propriétés antiseptiques connues comme le nard de l'Himalaya, la cannelle et le ciste (Dweck, 2002; Couic et Lobstein, 2013).

2. Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Nogaret, 2008).

Une plante médicinale renferme un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Nostro et *al.*, 2000; El amri et *al.*, 2014). Diverses parties de la plante (écorces, racine, tige, feuilles, fruits, graines, rameaux feuillés et tubercules) sont utilisées pour les préparations médicamenteuses (N'guessan et *al.*, 2009; Abayomi, 2010).

En général les principes actifs des plantes sont des gouttes minuscules qui se forment dans les chloroplastes des feuilles, c'est-à-dire les organites dans lesquels s'effectue la photosynthèse (Bego, 2003). Elles se combinent par la suite avec du glucose et sont transportées dans toutes les parties de la plante (Bruneton, 1995; Moro buronzo, 2008).

Selon Guignard (2000), les principales familles botaniques aromatiques sont méditerranéennes (Lamiacées, Rutacées, Myrtacées) ou de région chaudes (Térébinthacées).

3. Paramètres influençant la composition chimique des plantes médicinales

La composition chimique d'une plante est influencée par sa biosynthèse et donc son profil génétique. Une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents. Il s'agit en fait des races chimiques. Il existe de nombreux exemple d'un tel phénomène, notamment chez le basilic, le thym, la sauge (Miele et *al.*, 2001 ; Ozcan et Chanchat, 2002; Jirovetz et *al.*, 2003).

La composition varie aussi suivant les organes de la plante concernée. Les biosynthèses y sont différentes. Par exemple, l'huile essentielle d'écorce de cannelle sera riche en cinnamaldéhyde, alors que celle de feuille le sera en eugénol (Anton, 2003; Juliani et *al.*, 2006).

Les conditions environnementales influencent aussi la composition, la température, la pluviométrie, la quantité de lumière, , les conditions édaphiques représentent autant des causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante médicinale donnée (Thompson et *al.*, 2002; Randrianalijaona et *al.*, 2005; Curado et *al.*, 2006). Les conditions culturelles telles que la date de semis, l'emploi d'engrais, date de récolte, les traitements phytosanitaires, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition (Rajeswara, 2002; Anton et Lobstein, 2005).

4. Domaines d'utilisation des plantes médicinales

Les herbes ont été utilisées dans plusieurs domaines y compris la médecine, la nutrition, l'assaisonnement, la teinture, les cosmétiques, ainsi que dans d'autres domaines d'industrie (Djeridane et *al.*, 2006). Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées à nos jours sous forme de décoctions et d'infusions, mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse (Bourrel, 1993; Amjad, 2005).

Les produits naturels des plantes ont été utilisés en tant que médicament pour l'homme en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux; exemple : drogue immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (Svoboda et Hampson, 1999 ; Dastidar et

al., 2004). Dans le domaine cosmétique, les plantes sont utilisées pour la fabrication des produits de beauté, parfums, produits d'hygiène (Porter, 2001; Smallfield, 2001).

5. Monographie des espèces étudiées

5.1. *Ocimum basilicum* (Basilic)

5.1.1. Généralités

Les feuilles de basilic sont utilisées en pharmacie pour diurétique et des propriétés stimulantes (Jean et Mehmet, 2008). La teneur en huile essentielle varie entre 0,04 et 0,70% et diffère selon les variétés et le chémotype, l'origine et la période de récolte (Kaddem, 1990; Martinetti, 2013).

5.1.2. Utilisation thérapeutique

Depuis longtemps, les feuilles d'*Ocimum basilicum* sont utilisées en médecine traditionnelle grâce à leurs actions: tonique, antispasmodique, stomachique et surtout antiseptique. Les parties employées: sommités fleuries ou feuilles en infusion (une petite poignée par litre d'eau) (Kaddem, 1990; Isa et al., 2006).

5.2. *Mentha spicata* (Menthe verte)

5.2.1. Généralités

Les menthes sont un genre (*Mentha*) de plantes herbacées vivaces de la famille des lamiacées, comprenant de nombreuses espèces, dont beaucoup sont cultivées comme plantes aromatiques et condimentaires, ornementales ou médicinales (Brahmi et al., 2015).

Mentha spicata est une plante vivace, robuste, de 50cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave très pénétrante; tiges glabres ou glabrescentes, rameuses; feuilles subsessiles, lancéolées aiguës, dentées en scie, vertes sur les 2 faces (Botineau, 2010).

5.2.2. Utilisation thérapeutique

Toutes les menthes sont utiles, elles sont toniques, amies du cœur et des nerfs grâce à leur propriétés spasmodiques et elles sont aussi des alliés fidèles du système digestif : elles aident l'estomac dans son travail et elles combattent les gonflements, les nausées et les ulcères (Maurice, 1975). L'huile essentielle de la menthe verte est recommandée pour ceux qui souffrent des troubles digestifs d'insuffisance biliaire, d'infection des voies respiratoires, de bronchites, de cystites, de Blessures et cicatrices (Soysal, 2005; Brahmi et *al.*, 2012).

5.3. *Mentha pulegium* (Menthe pouliot)

5.3.1. Généralités

La menthe pouliot est une plante herbacée de la famille des lamiacées, quelque fois cultivée comme plante condimentaire pour ces feuilles très aromatiques (Anton et Lobstein, 2005). Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex*, la puce, la plante ayant la propriété d'éloigner les puces (Iserin et *al.*, 1997).

C'est une plante herbacée vivace à odeur forte tiges quadrangulaires, rameuses, haute de 15 cm jusqu'à 40 cm, velue grisâtre ou glabrescente, feuilles petites courtement pétiolées, Les feuilles, opposées, petites sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. La menthe pouliot est pourvue de jolies boules de fleurs roses, bleus violacés claires ou mauves, des feuilles tout au long de ses tiges (Geoff et *al.*, 2005).

5.3.2. Utilisation thérapeutique

En usage externe, la menthe pouliot est utilisée fraîche, réduite en pulpe et appliquée sur les contusions, les enflures. Les engorgements laiteux, les points douloureux des rhumatismes, des compresses contre la névralgie faciale. Les bains de vapeur à la menthe sont aussi utilisés contre les maux des dents (Beloued, 2001).

La menthe pouliot est utilisée traditionnellement en phytothérapie pour aider à la digestion, et soulager la dyspepsie flatulente (carminative) (Beloued, 2005). La menthe pouliot est excellente contre la toux et l'enrouement (Depoers et *al.*, 2002).

Le pouliot est employé spécifiquement en médecine naturelle pour enrayer les colites spasmodiques (Bakerink et *al.*, 1996).

La menthe à feuilles rondes est employée dans le traitement de plusieurs maladies internes et externes. Elle semble être un excellent digestif et un bon stimulant des sécrétions gastriques, elle réduit les flatulences et les coliques, elle sert comme vermifuge, emménagogue, antispasmodique, tonique, analgésique, anesthésique, apéritifs, béchique, carminatif, cholagogue, désinfectant, antirhumatismale, baisse la fièvre, expectorant, calmant pour les migraines d'origine digestive et hépatique (Iserin et *al.*, 1997).

5.4. *Eugenia caryophyllata* (Clou de girofle)

5.4.1. Généralités

Le giroflier est un arbre, à feuilles, aromatiques persistantes, ovales et coriaces, d'une couleur verte foncée, il présente des fleurs peu nombreuses disposées en bouquets (Abd albaset, 2004).

Les clous de girofle (*Eugenia caryophyllata*) appartiennent à la classe de Magnoliopsida, ordre des Myrtales et la famille des Myrtaceae (Ghedira et *al.*, 2010). Ils sont cultivés en Tanzanie, à Madagascar ainsi que dans l'ouest de l'Inde et au Brésil. L'huile essentielle de clou de girofle se caractérise par deux composés majeures, l'eugénol (85%) et l'acétyl eugénol (10-15%) et d'autres constituants en faible concentration: caryophyllène, d-cadinène, α -humulène, 2-heptanone, et α -copaène (Koth, 2007).

5.4.2. Utilisation thérapeutique

D'où les propriétés énergétiques et tonifiantes de clou de girofle, il est conseillé dans la fatigue, l'hypotension, ainsi que pour stimuler les défenses immunitaires. Il est efficace en cas d'acné, d'ulcère cutané, de plaies et d'orgelet. Selon Iserin (2001), grâce à ses propriétés antiseptiques et antibactériennes, le clou de girofle est efficace dans le traitement de certaines affections virales (paludismes, choléra, grippe, angine, oreillons et tuberculose).

5.5. *Foeniculum vulgare* (Fenouil doux)

5.5.1. Généralités

C'est une herbacée annuelle ou pérenne à tige dressée (80 à 200 cm), ramifiée et à forte odeur d'anis les feuilles sont d'une couleur verte foncée, à fleurs jaunes. Les graines sont petites ovales et striées, elles ont une saveur très aromatique, sont riches en huiles essentielles. Le Fenouil (*Foeniculum vulgare*) appartient à la classe de Magnoliopsida, ordre des Myrtales et la famille des Apiacées, est une plante médicinale, industrielle et une des principales sources d'anéthol (Iserin, 2001 et Richard, 2005).

Selon Richard (2005), la graine contient 12-16% de matière grasse, 20% de protéine, 5% de glucoside et 8% d'huile essentielle. L'huile essentielle de la graine de fenouil se caractérise par deux composés majeurs l'anéthol (75- 86%) et le limonène (4-9%).

5.5.2. Utilisation thérapeutique

Les graines de fenouil ont une vertu digestive incomparable. Elles améliorent le fonctionnement de l'estomac et de l'intestin, luttent contre la paresse intestinale, ont un effet diurétique, et sont employées pour traiter les calculs biliaires (Iserin, 2001).

5.6. *Carum carvi* (Carvi)

5.6.1. Généralités

Le Carvi est une plante bisannuelle ou pluriannuelle de 50 à 60 cm avec des tiges striées, ramifiées et glabres. Les feuilles de la base apparaissent la première année, elles sont alternées, pétiolées et découpées très finement en étroites lanières (Henadez ochoa, 2005; Richard, 2005). Le carvi (*Carum carvi*) appartient à la classe des Magnoliopsida, ordre des Myrtales et à la famille des Apiaceae. Il est cultivé en Europe, en Russie, en Afrique du nord, en Asie et aux Etats unis, il pousse dans les endroits ensoleillés (Iserin, 2001; Koth, 2007).

Selon Iserin (2001), la graine contient des flavonoïdes, polysaccharides, protéines, huile fixe et huile essentielle. L'huile essentielle de carvi se caractérise par deux composés majeurs, le carvone (29,5 à 82,4%) et le limonène avec (40 à 53,8%) (Jitka et *al.*, 2001).

5.6.2. Utilisation thérapeutique

La graine de carvi possède une certaine efficacité qui lui permet de combattre les flatulences et de provoquer les émissions d'urine, elle améliore le souffle, stimule l'appétit, régularise le rythme cardiaque perturbé par les troubles digestifs et soulage les règles douloureuse de plus, elle est diurétique expectorante et fortifiante. Elle est utilisée pour soigner les bronchites et les toux, notamment chez les enfants. L'huile essentielle diluée pourrait être un remède efficace contre la gale (Iserin, 2001).

Chapitre III: Activités biologiques des huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Le terme «huile essentielle» a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin Suisse Parascelsus von hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Sharkay et Sunsun, 2001; Burt, 2004).

Les huiles volatiles ou essences aromatiques végétales nommées huiles essentielles, car elles renferment la «Quinta essentia», la fragrance de la plante (Lamarti et *al.*, 1994), très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (Lardry, 2007).

L'association française de normalisation (AFNOR NF T-75-006) a défini l'huile essentielle comme étant: «le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation «sèche», elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (AFNOR, 2000). Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles (Sharkay et Sunsun, 2001; Nogaret-Ehrhart, 2008).

2. Propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, volatiles, huileuses, de nature hydrophobe (Bérigaud, 2002). Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme «essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (Teusher et *al.*, 2005; Brenes et Roura, 2010).

Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras et uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles, liquides à la température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, saffran et girofle), volatiles, insolubles dans l'eau, Très rarement colorées, et elle convient de les conserver à l'abri de l'air et de la lumière (Duval, 2012).

Les huiles essentielles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (Roux et *al.*, 2007). Elles sont très odorantes et très inflammables (Barnola et Cedeno, 1999; Jirovetz et *al.*, 2003), de nature hydrophobe. Elles sont totalement solubles dans les alcools et les huiles mais pas dans l'eau (Juliani et *al.*, 2006).

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Ce sont « des liquides d'odeur et de saveur généralement fortes » (Sallé, 1991). Leur indice de réfraction est élevé et le plus souvent elles sont douées de pouvoir rotatoire. Différents indices chimiques leur sont attribués (indice d'acide, d'ester, ...) (Baser et Buchbauer, 2010).

3. Localisation et origine des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être localisées dans tous les organes végétaux: les feuilles (*Torilis arvensis*) (Saad et *al.*, 1995), les racines (*Heracleum persicum*) (Mojab et Nickavar, 2003), le bois (*Santalum album*) (Howes et *al.*, 2004), les rhizomes (*Zingiber officinale*) (Geiger, 2005), les écorces (*Cinnamomum verum*) (Jham et *al.*, 2005), les fruits (*Daucus carota*) (Glisic et *al.*, 2007), les graines (*Daucus carota*) (Özcan et Chalchat, 2007) ou les fleurs (*Ferulago angulata*) (Akhlaghi, 2008).

Les huiles essentielles sont synthétisées dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent dans des cellules glandulaires recouvertes d'une cuticule (Khenaka, 2011; Degryse et *al.*, 2008). Cependant, elles sont trouvées aussi bien dans les organes végétatifs que dans les organes reproducteurs (Guignard et *al.*, 1985; Ghanmi et *al.*, 2003). Elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des trichomes glandulaires sécréteurs (Lamiaceae), dans des cavités sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae) (Bruneton, 1999; Garneau, 2004; Bakkali et *al.*, 2008).

Dans les plantes, les essences peuvent être stockées dans différents organes : feuilles (citronnelle, eucalyptus), fleurs (origan), écorces (cannelier), racines (vétiver), rhizomes (gingembre), sève (myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graine (carvi, muscade) (Svoboda, 2000). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs

peuvent coexister simultanément chez une espèce voire dans un même organe (Harkati et Figueredo, 2012).

4. Composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange complexe de composants hétérogènes appartenant à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distincts : le groupe des terpènes et des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (Rhayour, 2002; Clarke, 2008; Bardeau, 2009; Baser et Buchbauer, 2010) d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (Connolly et Hill, 2005; Bruneton, 2009). Elles peuvent également contenir des constituants non volatils issus de processus de dégradation et des composés oxygénés (les aldéhydes, les cétones, les alcools, les phénols, les esters, les éthers, et les éthers de phénol) (Hanson, 2000; Degenhardt et *al.*, 2009).

D'autres composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson, 1999). C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des huiles essentielles dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons et les virus (Langenhoven, 2006; Violaine, 2006).

Les constituants des huiles essentielles proviennent souvent de plusieurs principales voies de biosynthèse (Anton, 2003; Franz et Novak, 2009). En général, ces composants déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles et ils comprennent deux groupes d'origine biosynthétique distincte (Croteau et *al.*, 2000; Betts, 2001; Pichersky et *al.*, 2006).

4.1. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des plantes aromatiques

Les principaux facteurs de variabilité de la composition chimique d'une huile essentielle sont d'origine intrinsèque et extrinsèque : l'environnement, la température, la période de récolte, le génotype, l'origine géographique, la durée de séchage et le mode d'extraction (Oussalah et *al.*, 2006; Fella et *al.* 2006).

En fait, une même espèce végétale peut fournir des huiles essentielles de compositions chimiques différentes (Sokmen et *al.*, 2004). L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette même et seule espèce (Thompson et *al.*, 2003). Ce polymorphisme chimique existe aussi bien pour d'autres espèces : *Origanum glandulosum* (Bekhechi et *al.*, 2008), *Salvia officinalis* (Dunford et Vazquez, 2005) en sont des exemples.

5. Activités biologiques

Selon les travaux de Dosoky et *al.* (2018), les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques.

Les huiles essentielles, les plus étudiées dans la littérature possèdent des propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques, ainsi que des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (Delaquis et *al.*, 2002; Sudjana et *al.*, 2009), stimulantes, toniques et même irritantes (Zambonelli et *al.*, 2004; Malecky, 2007). Ces propriétés sont étroitement liées à la nature de leurs constituants et des groupements ou fonctions chimiques qu'elles possèdent (Inouye et *al.*, 2006).

Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont associées à la prédominance des fonctions chimiques. Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile (Chaumont et Leger, 1989; Cox et *al.*, 2000).

Les huiles essentielles sont caractérisées par leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origines bactérienne et fongique (Lahlou, 2004; Billerbeck, 2007). Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques (Sivropoulou et *al.*, 1996) qui les rapprochent des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques dans les préparations pharmaceutiques (Juven et *al.*, 1994; Tippayatum et *al.*, 2007).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Chao et *al.*, 2000; Zambonelli et *al.*, 2004).

5.1. Activité antibactérienne

Les activités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXe siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes (Wannissorn et *al.*, 2005 ; Rasooli et *al.*, 2008).

Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries (Kalemba et Kunicka, 2003; Burt, 2004 ; Rožman et Jeršek, 2009).

Les huiles essentielles sont connues pour posséder une activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Rasooli et *al.*, 2008; Rožman et Jeršek, 2009).

Selon Freeman et Carel (2006), il existe deux types d'activités des huiles essentielles sur les microorganismes : une activité létale (bactéricide et fongicide) et une inhibition de la croissance (bactériostatique).

Dorman et Deans (2000) ont démontré que l'activité bactéricide des huiles essentielles vis-à-vis des cellules bactériennes pourrait être expliquée par une dénaturation des protéines provoquée par le rôle solvant et déshydratant des huiles.

5.2. Effet des huiles essentielles sur quelques bactéries pathogènes

a) Effet sur *Helicobacter pylori*

Les huiles essentielles sont en première place dans la lutte contre *Helicobacter pylori* (Haristoy et al., 2003). Dans les études *in vivo*, la densité d' *H. pylori* dans l'estomac des souris traitées avec l'huile essentielle de lemon-grass était significativement réduite par rapport aux souris non traitées (Ohno, 2003).

Selon les travaux d'Onawunmi (1984), les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle de lemon-grass sont principalement dues à ses deux principaux composants, l'alpha-citral (le géranial) et le bêta- citral (le néral).

Une inhibition nette de la prolifération d' *H. Pylori* par les huiles essentielles à Phénols comme *Origanum compactum*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* et *Eugenia caryophyllata* a été démontré *in vitro* par Haristoy et al. (2003).

b) Effet sur *E. coli* et *S.aureus*

Une étude réalisée par Dorman et Deans (2000), a montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans des cellules microbiennes d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sous l'effet de l'huile essentielle d'arbre à thé, Ce qui prouve l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol et le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort.

5.3. Activité antifongique

Les groupes moléculaires responsables des plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces. Les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales ont fait preuve de leur efficacité antifongique parfois même supérieure à celle des agents antifongiques commerciaux (Nazzaro et Carel, 2017).

D'après Giordani et Kaloustian (2006), les principales espèces botaniques productrices d'huile essentielle dotées d'un pouvoir inhibiteur de la croissance des levures sont les suivantes :

- *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé).
- Diverses espèces de *Cinnamomum* (cannelier).
- *Sassafras albidum* (sassafras), *Laurus nobilis* (laurier-sauce), *Artemisia absinthium* (armoïse amère ou absinthe).
- Nombreuses espèces de *Thymus* (thym).
- Diverses espèces d'*Origanum* (origan).
- Diverses espèces de *Pinus* (pin)
- Diverses espèces de *Mentha* (menthe).
- *Agastache ugosa* (Agastache coréenne).
- *Juniperus communis* (genévrier).
- Diverses espèces de *Lavandula* (lavande).
- *Citrus bergamia* (bergamotier).
- *Salvia fruticosa* (saugé).

Les deux derniers auteurs ont montré également que les huiles possédant un pouvoir antifongique, telles que celles de thym et de cannelle, pourraient constituer une solution alternative intéressante dans les thérapies antimycosiques. Le carvacrol et le thymol, deux composés rencontrés dans la majorité des espèces botaniques présentent une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes.

5.4. Activité antivirale

De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux comme les monoterpénols et les monoterpénals ont montré "*in vivo*" une activité antivirale (Battistini et *al.*, 2019).

Selon Inouye (2006), il existe des huiles essentielles de plantes exotiques très puissantes qui ont un fort pouvoir antiviral et qui sont connues pour leur efficacité. Les huiles essentielles sont sélectivement absorbées et perturbent les fonctions des membranes biologiques de la cellule, sur la mitochondrie et autres organites vitales pour tous les organismes hormis les virus (les huiles essentielles ne sont actives que sur

les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine).

Panikar et *al.* (2021) ont évalué *in silico* l'effet des composés bioactifs trouvés dans les huiles essentielles des espèces d'Eucalyptus et de Corymbia (citronellol, alpha-terpinéol, eucalyptol, d-limonène, 3-carène, o-cymène et alpha-pinène) sur Corona virus par l'amarrage moléculaire. Le résultat de cette étude a rapporté que l'huile essentielle des espèces d'Eucalyptus et de Corymbia, principalement l'eucalyptol, peut être utilisée comme inhibiteur potentiel contre le Covid-19.

6. Propriétés médicinales

De nombreuses huiles essentielles peuvent être actives contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires. Elles ont la propriété de renforcer et de relancer les défenses immunitaires de l'individu (Zambonelli et *al.*, 1996; Wei et Shibamoto, 2007).

7. Application des huiles essentielles dans les produits alimentaires

En raison des préoccupations quant à l'innocuité des composés synthétiques, d'importants travaux sont effectués pendant ces dernières décennies pour trouver des composés d'origine organique provenant des sources naturelles comme solution de rechange à ces substances chimiques (Festy, 2010).

Actuellement, les huiles essentielles et leurs composants, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir des agents de conservation alimentaires (Caillet et Lacroix, 2007).

Les huiles essentielles peuvent être utilisées comme conservateurs alimentaires, il convient de connaître la concentration la plus faible en huile essentielle capable d'inhiber toute croissance microbienne, car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même, chaque huile essentielle possède une activité spécifique variable selon les microorganismes testés (Cutter, 2000).

Les huiles essentielles peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle, ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles et la charcuterie, l'huile essentielle de menthe pour les produits frais, les huiles essentielles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons (Lin et *al.*, 2004).

Partie

Expérimentale

I. Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé aux laboratoires de chimie des aliments, biochimie, biotechnologie et au niveau du Laboratoire de Recherche de Bioressources Naturelles Locales de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles des espèces végétales étudiées a été effectuée au Centre de Recherche et de Développement (CRD) de Dar El Baida (Alger).

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Six espèces végétales ont fait l'objet de notre étude (Fig. 01). Les plantes utilisées ont été récoltées de trois stations (Tableau 01) de la wilaya de Chlef (Algérie) (Fig. 02):

- Les feuilles de *Mentha spicata* récoltées en mars 2014 de la région de Labiod Medjaja (Chlef, Algérie);
- Les feuilles d'*Ocimum basilicum* récoltées en avril 2014 de la région d'Oued Sly (Chlef, Algérie);
- Les feuilles de *Mentha pulegium* récoltées en avril 2014 de la région de Boukadir;
- Les graines de *Foeniculum vulgare* (fenouil), les graines de *Carum carvi* (carvi) et les boutons floraux d'*Eugenia caryophyllata* (clou de girofle) sont achetés sur le marché (Chlef, Algérie), originaires d'Indonésie et collectés en 2013. Ces graines sont disponibles dans le marché tout au long de l'année, pour leur importance dans la tradition culinaire algérienne ainsi que leur utilisation dans la médecine traditionnelle.



Figure 01: Espèces végétales étudiées.

- A.** Graines d'*Eugenia caryophyllata* (Clou de girofle), **B.** Graines de *Foeniculum vulgare* (Fenouil), **C.** Graines de *Carum carvi* (Carvi), **D.** Feuilles de *Mentha spicata* (Menthe verte), **E.** Feuilles de *Mentha pulegium* (Menthe pouliot), **F.** Feuilles d'*Ocimum basilicum* (Basilic).

Tableau 01: Situation géographique des stations de récolte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude
Labioud Medjaja	176 m	36,25 36° 15' 0" Nord, 1° 12' 0" Est	1,4
Oued Sly	94m	1,2 36° 6' 0" Nord, 1° 12' 0" Est	26,1
Boukadir	78 m	1,12444 36° 3' 49" Nord, 1° 7' 28" Est	36,0636

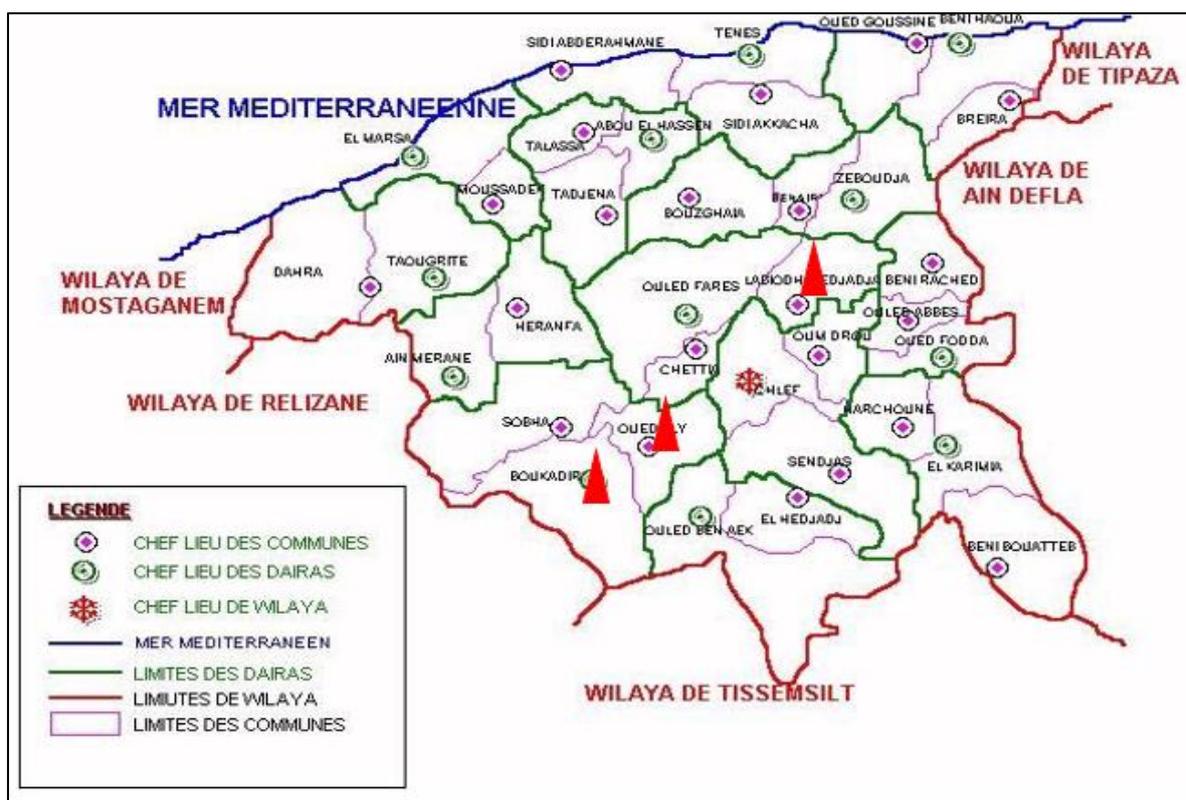


Figure 02: Carte géographique de la région de Chlef montrant les trois stations de récolte des espèces végétales.

1.2. Bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes citées ci-dessous ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef (Algérie), à partir des selles de patients présentant des troubles digestifs et souffrant de diarrhées infectieuses:

- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Citrobacter freundii*
- ✓ *Proteus mirabilis*
- ✓ *Bacillus cereus*
- ✓ *Clostridium perfringens*
- ✓ *Escherichia coli*
- ✓ *Salmonella typhi*

Helicobacter pylori est un échantillon endoscopique reçu systématiquement par le service d'*Enterobacteriaceae* de l'Institut Pasteur d'Alger. L'isolement a été fait à partir d'une biopsie gastrique prélevée d'un patient souffrant d'un ulcère, ayant subi une endoscopie digestive.

2. Méthodes

2.1. Extraction des huiles essentielles

- **Préparation du matériel végétal**

Les feuilles et les graines des plantes étudiées ont été nettoyées et débarrassées des débris, ensuite étalées sur du papier en fines couches, retournées fréquemment, et laissées séchées au laboratoire (pièce aérée) à température ambiante et à l'abri des rayons solaire pendant deux à trois semaines. Après séchage, le matériel végétal est grossièrement broyé, puis conservé dans des récipients hermétiquement fermés.

Le séchage est réalisé dans l'objectif d'abaisser la teneur en eau des feuilles des plantes et d'empêcher ainsi les réactions d'altération qui peuvent se produire. Ceci limite la prolifération des microorganismes.

2.1.1. Détermination du taux d'humidité

La méthode utilisée est connue sous le nom de dessiccation par évaporation ou méthode gravimétrique ou pondérale. Le procédé de dessiccation est réalisé à une température de $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Simpson, 1999). Le taux d'humidité est exprimé en (%) selon la formule suivante:

$$H\% = (P_{\alpha} - P_{\beta}) / P_{\alpha} \times 100$$

Où:

H%: Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

P_{α} : Poids de l'échantillon "plante fraîche"(g).

P_{β} : Poids de l'échantillon "plante sèche" (g).

- **Extraction**

Les plantes aromatiques contiennent dans leurs cellules des composés organiques odorants, ces composés, peu solubles dans l'eau, sont difficiles à extraire par macération ou décoction dans l'eau. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée sur les échantillons par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger. Le principe consiste à porter à ébullition la matière végétale et l'eau, sous l'action de la chaleur, les cellules éclatent et libèrent des composés organiques volatiles (Berigaud, 2002).

Les espèces végétales utilisées sont découpées en petits morceaux pour faciliter leur introduction dans un ballon en verre de 1000 ml, rempli d'eau distillé jusqu'aux 2/3 de sa capacité et quelques grains de pierre ponce sont ajoutés pour éviter toute formation de la mousse (Fig. 03). L'eau est ensuite chauffée dans le chauffe ballon jusqu'à ébullition, ce qui entraîne la formation d'une vapeur qui va entraîner les constituants volatils, le chauffage a été réalisé pendant 3 heures selon la Pharmacopée européenne (Conseil de l'Europe and Pharmacopée Européenne 1, 1996).

Ces vapeurs s'élèvent et passent dans le réfrigérant qui est constamment refroidi à une température comprise entre 15°C et 18°. Après la condensation de ce mélange gazeux, le distillat subit une décantation, en séparant la phase organique supérieure, huileuse et très odorante, dite «huile essentielle», contenant la majorité des composés odorants de la phase aqueuse inférieure, odorante, dite «eau aromatique », qui n'en contient que très peu (Berigaud, 2002).



1. Chauffe ballon, 2. Ballon de 500 ml, 3. Tige coudée, 4. Réfrigérant, 5. Hydrodistillat, 6. Entrée et sortie d'eau.

Figure 03: Dispositif d'extraction par hydrodistillation.

- **Relargage**

Il s'agit d'une extraction liquide-liquide (Fig. 4), c'est une séparation des huiles essentielles de l'eau aromatique qui s'effectue en ajoutant 9 g de chlorure de sodium dans l'erenmeyer puis la totalité du distillat (100 ml) est versée dans une ampoule à décanter. 20 ml de solvant (Hexane) est ajoutée dans l'ampoule à décanter, après agitation et dégazage, on laisse reposer jusqu'à la séparation des deux phases (Tournaire, 1980).

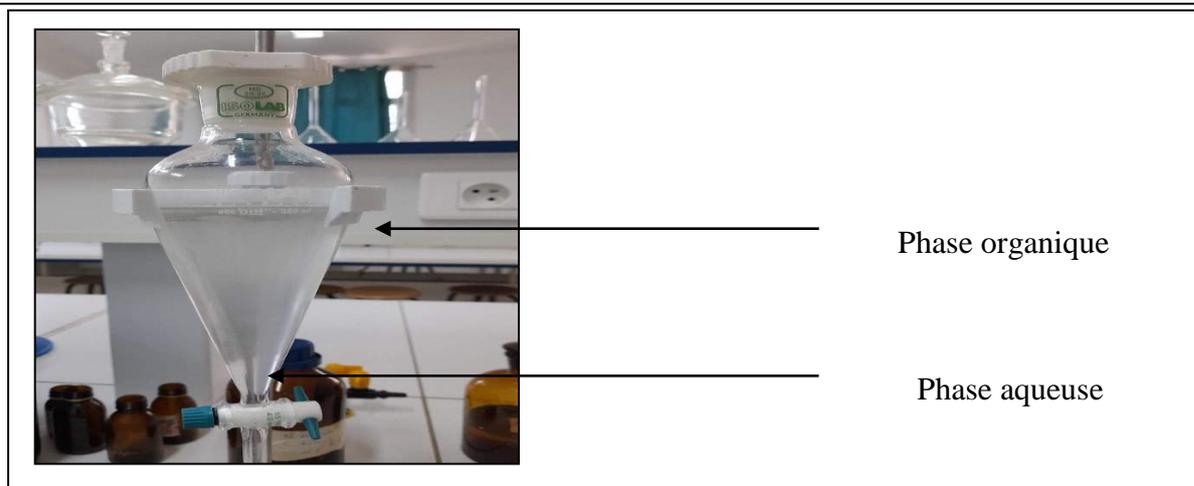


Figure 04: Technique de relargage.

- **Séparation du solvant**

Cette opération à l'aide d'un évaporateur rotatif sert à séparer le solvant volatil de l'huile (Fig. 05). La solution contenant le solvant à évaporer est placée dans le ballon (2) fixé sur l'évaporateur rotatif à l'aide d'un raccord. La récupération du solvant se fait dans le ballon (3) fixé par un deuxième raccord, le ballon (2) est plongé dans le bain marie (4) réglé préalablement à la température d'évaporation du solvant. Lorsque le dispositif est mis en marche, la circulation d'eau froide dans le réfrigérant (1) et la rotation du ballon (2) est observée. La disparition complète du solvant du ballon (2) a été constatée à la fin de cette opération.



Figure 05 : Dispositif de séparation du solvant.

1: Condenseur, 2. Ballon renfermant le solvant à évaporer et l'huile à récupérer, 3. Ballon de récupération du solvant, 4. Bain marie.

L'huile essentielle est récupérée, séchée sur Na_2SO_4 anhydre afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons opaques au réfrigérateur à une température de 4°C et à l'abri de la lumière (Inouye et *al.*, 2006).

2.1.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante traitée (Carré, 1953).

Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante:

$$R_{\text{HE}} (\%) = M_{\text{HE}} / M_{\text{MV}} \cdot 100$$

Où:

R_{HE} : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

M_{HE} : Masse en gramme d'huile essentielle.

M_{MV} : Masse en gramme de la matière végétale séchée.

2.2. Caractérisation des huiles essentielles

Afin d'évaluer la qualité et la composition des huiles essentielles extraites lors de cette étude, on a établi des analyses pour déterminer leurs propriétés organoleptiques et physico-chimiques ainsi que leurs composants chimiques.

2.2.1. Analyse des propriétés organoleptiques

Chaque huile essentielle est caractérisée par ses propres caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect et la couleur qui sont décrits par la norme AFNOR (1992).

- *Odeur*

Les molécules odorantes des huiles essentielles représentent l'odeur caractéristique du végétal.

- *Couleur*

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent.

- *Aspect physique*

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent.

2.2.2. Analyse des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles des espèces étudiées obtenues par hydrodistillation ont été caractérisées par la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, l'indice d'acide et l'indice d'ester. Ces propriétés physico-chimiques des huiles essentielles ont été déterminées selon les normes AFNOR (AFNOR, 1989).

- *Densité*

La densité relative d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C. Le principe est d'effectuer des pesées successives de volumes égaux d'huiles essentielles et d'eau distillée à la température de 20°C.

Le pycnomètre est rempli avec l'eau distillée récemment bouillie et refroidie aux environs de 20°C. Avant de faire la pesée, le niveau d'eau est ajusté au trait repère après avoir bouché le pycnomètre. Après cette opération, l'huile essentielle est remplacée par l'eau distillée et pesée.

La densité relative, D_{20} est donnée par la formule suivante:

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où :

m_0 : Masse en grammes du pycnomètre vide.

m_1 : Masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : Masse en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

- **Indice de réfraction**

L'appareil utilisé est un réfractomètre classique (Réfractomètre d'Abbe) permettant la lecture directe de l'indice de réfraction situé entre 1,300 et 1,700 avec une précision de $\pm 0,0002$. En premier, l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20°C, l'indice de réfraction qui est de 1,333 pour l'eau distillée.

Un courant d'eau est passé dans le réfractomètre afin de maintenir l'appareil à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées. Cette température ne doit pas différer de la température de référence de plus de $\pm 0,02^\circ\text{C}$. Pour la détermination de l'indice de réfraction, l'huile essentielle est déposée au-dessus du prisme.

Quand la température est différente de 20°C, une correction de celle-ci est effectuée par le biais de la formule :

$$n^{20} = n^t + 0.00045(t - 20^\circ\text{C})$$

Où:

n^{20} : Indice de réfraction à 20°C;

n^t : Indice à la température ambiante ou de mesure;

t : Température ambiante en °C.

- **Pouvoir rotatoire**

Un composé est optiquement actif lorsqu'il provoque une rotation angulaire, appelée pouvoir rotatoire, du plan de polarisation d'une lumière monochromatique préalablement polarisée par un cristal biréfringent appelé polariseur. Le pouvoir rotatoire est défini comme étant l'angle exprimé en milliradians et /ou degrés d'angle. Le pouvoir rotatoire est mesuré par un polarimètre de type POLAX-(2L) équipé d'une lampe à sodium. La solution introduite dans un tube de 10 cm de longueur (l), est traversée par un rayon lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm). La lecture se fait à l'aide d'un viseur comportant un vernier et un cercle mobile où les graduations sont mentionnées.

La formule utilisée est :

$$\alpha_D^t = A / l \times 100$$

Où :

A: Angle de rotation, exprimée en milliradians et /ou degrés d'angle.

l: Longueur du tube utilisé, exprimée en millimètres.

- **Indice d'acide**

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Ils sont neutralisés par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

L'indice d'acide est exprimé par la relation :

$$IA = 5,61V/M$$

Où :

V : Volume en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

M : Masse en grammes de la prise d'essai.

- **Indice d'ester**

L'indice d'ester (IE) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle.

L'hydrolyse des esters est réalisée par chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique. L'indice d'ester est donné par la formule :

$$IE = (28.05/M) (V_0 - V_1) - IA$$

Où:

V₀: Volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique pour l'essai à blanc.

V1: Volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique pour la détermination.

M: Masse en gramme de la prise d'essai ($2\text{g} \pm 0,05\text{g}$).

IA: Valeur de l'indice d'acide.

2.2.3. Analyse de la composition des huiles essentielles par CG/SM

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles extraites ont été réalisées par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard série 6890 (Agilent Technologies) couplés à un spectromètre de masse quadruple (modèle HP 5973) équipé d'une colonne capillaire HP5 MS (5% phénylméthylsiloxane, $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$, épaisseur du film $0,25\text{ }\mu\text{m}$). Les conditions analytiques étaient : température de l'injecteur $250\text{ }^\circ\text{C}$, température du four : isotherme $60\text{ }^\circ\text{C}$, 8 minutes, à $250\text{ }^\circ\text{C}$ à $2\text{ }^\circ\text{C} / \text{minute}$ puis, isotherme, 30 minutes ; gaz porteur hélium à $0,5\text{ ml} / \text{minute}$; divisé 1/20 ; tension d'ionisation, 70 eV ; gamme de balayage, 35-500 uma.

Cette technique permet de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'huile essentielle, leurs concentrations respectives, et leurs ordres de sorties, qui renseignent sur la volatilité, c'est-à-dire de leurs masses moléculaires, et de leurs polarités.

L'identification des constituants a été basée sur la comparaison des temps de rétention avec ceux des échantillons authentiques, en comparant leurs indices de rétention linéaires par rapport à la série des n-hydrocarbures, et sur l'appariement par ordinateur des masses librairies (NIST 98 et ADAMS), les spectres construits à partir de substances pures et de composants d'huiles connues et de données de la littérature (Adams, 2001). Des index Kovats des composés ont été calculés en utilisant le temps de rétention d'une série de n-alcanes.

2.3. Isolement et identification des bactéries pathogènes

L'isolement des bactéries pathogènes est effectué à partir des selles de patients présentant les symptômes d'une infection digestive.

- **Prélèvements**

Les prélèvements s'effectuent par la mise des selles fraîches dans les flacons stériles hermétiquement fermés et munis d'une spatule, soit par un écouvillonnage rectal (dans le cas des nourrissons et enfants). Les prélèvements doivent être examinés dans les quatre premières heures pour éviter toute dessiccation (la conservation est possible à 4 °C pendant 48 heures) (El hamzaoui et *al.*, 2000).

- **Isolement**

a) Enrichissement : La méthode consiste à mettre un fragment de selles en suspension dans 5 ml du bouillon SFM, après homogénéisation, l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24 heures (Bourgeois et *al.*, 1996).

b) Ensemencement : A partir du milieu d'enrichissement et à l'aide d'une anse à platine, une goutte du milieu est ensemencée en stries sur les milieux sélectifs gélosés (Tableau 02). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, chaque isolat présente des colonies caractéristiques (aspect, taille, couleur, contour).

Tableau 02: Milieux d'isolement des souches pathogènes (Guiraud, 1998).

Souches pathogènes	Milieux sélectifs
<i>Salmonella typhi</i>	Gélose S.S. (<i>Salmonella Shigella</i>)
<i>Citrobacter freundii</i>	Gélose nutritive
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose nutritive
<i>E. coli</i>	EMB (Eosine méthyle bilié)
<i>S. aureus</i>	Chapman
<i>C. perfringens</i>	VF (Viande-foie)
<i>Proteus mirabilis</i>	Gélose Hektoen

- **Identification**

- a) *Examen microscopique*

Un examen microscopique après coloration de Gram est nécessaire pour la détermination des caractéristiques morphologiques des isolats bactériens (type de paroi, la forme et le mode de regroupement des cellules bactériennes).

- b) *Détermination des caractères biochimiques*

A partir des colonies caractéristiques présentes sur les géloses sélectives, la détermination des caractères biochimiques spécifiques est réalisée pour vérifier l'appartenance des souches recherchées.

- *Préparation de la suspension bactérienne*

La suspension bactérienne est préparée dans 5 ml d'eau physiologique à partir d'une colonie suspecte bien isolée à l'aide d'une anse à platine stérile (El Hamzaoui et al., 2000). L'incubation se fait à 37 °C pendant 15 minutes.

L'identification des souches (*E.coli*, *S. typhi*, *C. freundii*, *Bacillus cereus* et *Proteus mirabilis*) est faite par ensemencement des galeries biochimiques API 20 E. Les caractères biochimiques recherchés pour identifier *C. perfringens* sont: l'immobilité, la recherche de la nitrate réductase et la fermentation du lactose.

S. aureus est identifiée par la recherche de la coagulase libre et de l'acétoïne ou la réaction de Voges-Proskauer.

- *Ensemencement d'une galerie API 20 E*

Après incubation à 36°C ±2°C pendant 18-24 heures, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

- ◆ *Ensemencement d'une galerie biochimique classique*

- *Réidentification d'*Helicobacter pylori**

La souche *Helicobacter pylori* est un échantillon endoscopique reçu systématiquement par le service d'Enterobacteriaceae de l'Institut Pasteur d'Alger.

L'isolement et l'identification d'*Helicobacter pylori* sont effectués après broyage d'une biopsie gastrique prélevée d'un patient souffrant d'un ulcère, ayant subi une endoscopie digestive. L'isolat est conservé à -80 ° C dans un bouillon d'infusion de cœur et de cerveau additionné de 20% de glycérol.

◆ **Repiquage et revivification d'*Helicobacter pylori***

La souche utilisée est sous forme congelée en culture pure. Elle est activée et maintenue par un repiquage de 1 ml d'inocula dans 09 ml de bouillon glucose tamponné (BGT) additionné de 10% de sang de cheval. La culture est incubée sous atmosphère microaéroophile (5% d'O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂) dans une jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 72 heures (Bourgeois et *al.*, 1996).

◆ **Purification**

Pour la purification de la souche, la technique utilisée est celle décrite par Lee et Mégraud (1999). A partir de la culture du repiquage, une goutte est prélevée à l'aide d'une anse à platine, puisensemencée en stries dans des boites contenant de la gélose Columbia additionné de 10% de sang de cheval et du supplément sélectif *Helicobacter* (SR147E, Oxoid, Angleterre). L'incubation a été faite sous atmosphère microaéroophile (5% d'O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂) dans une jarre d'anaérobiose à 37 ° C pendant 2-14 jours. La culture était considérée positive en cas d'apparition de colonies typiques. Un examen microscopique d'un frottis est nécessaire après coloration de Gram (fines bacilles spiralées Gram négatif).

◆ **Test rapide à l'urée**

La méthode consiste à mettre une colonie suspecte prélevée à l'aide d'une anse à platine dans un tube à essai stérile contenant 10 ml de l'urée indole. La lecture est faite après un repos à température ambiante pendant 60 minutes. L'activité uréasique de la bactérie présente dans la biopsie est indiquée par le changement de la couleur de l'urée-indole de l'orange vers le rose ou le rouge (Cassel-Beraud et *al.*, 1996).

◆ Détermination des caractères biochimiques

L'identification d'*Helicobacter pylori* est réalisée par ensemencement d'une galerie biochimique classique contenant les tests présentés dans tableau 02 (Marshall, 1982). L'ensemencement est réalisé à partir d'un tube contenant 5 ml d'eau physiologique additionnées d'une colonie suspecte prélevée à l'aide d'une anse à platine, et après une incubation pendant 15 à 30 minutes à 37°C.

• Conservation des souches

Les souches pures sont maintenues vivantes par des repiquages successifs puis conservées à 4 °C dans des tubes hermétiquement fermés jusqu'à utilisation.

2.4. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

La méthode utilisée pour étudier l'interaction entre les huiles essentielles et les souches bactériennes pathogènes est celle de l'aromatogramme. C'est la méthode la plus utilisée où des disques en papier buvard, imprégnés d'huile essentielle sont déposés sur la surface du milieu gélosé. Les huiles diffusent de manière uniforme et donnent des zones d'inhibition qui entourent les disques correspondant à une absence de croissance (Guérin-Faublée et Carret, 1999 ; Karthikeyan et *al.*, 2009 ; Saadabi et *al.*, 2011).

• Repiquage et revivification des souches bactériennes

Les souches utilisées sont soit sous forme congelée ou réfrigérée en culture pure. Elles sont activées et maintenues par un repiquage de 1 ml d'inocula dans 09 ml de bouillon nutritif. Les tubes à essai sont bien fermés et agités pour rendre le mélange parfaitement homogène et incubés à 37°C pendant 72 heures (Guiraud, 2003).

Pour la souche d'*H. pylori*, 1ml de la culture est introduit dans un tube contenant 09 ml de bouillon glucose tamponné (BGT) additionné de 10% de sang de cheval. Le tube est incubé dans une jarre d'anaérobiose sous atmosphère micro-aérophile à 37°C pendant 72 heures (Bourgeois et *al.*, 1996).

2.4.1. Préparation des précultures des bactéries pathogènes

Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition, les souches bactériennes testées ont été ensemencées par la méthode des stries sur les gélose sélectives. Après 18 heures d'incubation à 37 ° C, des suspensions bactériennes à une densité optique équivalente à 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / ml) ont été préparées pour chaque microorganisme (Koohsari et al., 2013).

La suspension bactérienne de *H. pylori* a été préparée à une densité de 3 à 4 Mc Farland (environ 10^9 UFC / ml) (Ndip et al., 2008).

2.4.2. Interaction entre les souches pathogènes et les huiles essentielles

La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic (2002). Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique ou substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition (Fig. 06). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique ou à la substance. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère et Avril, 2002).

Des boîtes de pétri contenant la gélose Muller Hinton sont inondées par 1 ml de la suspension bactérienne (Pour *H. pylori* le milieu est additionné de 10% de sang de cheval). Après un séchage des boîtes pendant 30 mn à 37°C, des disques en papier buvard stériles (6 mm de diamètre) imprégnés de 20 µl d'huile essentielle supplémentée de Dimethyl Sulfoxide (DMSO) à 10%, sont déposés à la surface de la gélose.

Au cours de l'opération, des disques saturés de DMSO ont été utilisés comme témoin négatif. Les boîtes de pétri ainsi préparées sont préincubées dans des conditions réfrigérées pendant 2 à 4 heures à +4°C afin de permettre la diffusion de l'agent inhibiteur qui sera suivie par l'incubation à 37°C pendant 24 h. Pour la

souche *H. pylori*, les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 48h dans des conditions microaérophiles tel que décrit précédemment. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives. Le diamètre des zones d'inhibition (exprimé en mm) apparaissant autour des disques est mesuré par le calcul de la moyenne des deux diamètres perpendiculaires avec soustraction de 6mm représentant le diamètre du disque. L'inhibition est notée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Inouye et *al.*, 2006; Bayoub et *al.*, 2010).

Selon Guessennd et *al.* (2014), les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne sont rangés en 4 classes à savoir :

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

Les bactéries qui sont sensibles aux huiles essentielles sont choisies pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

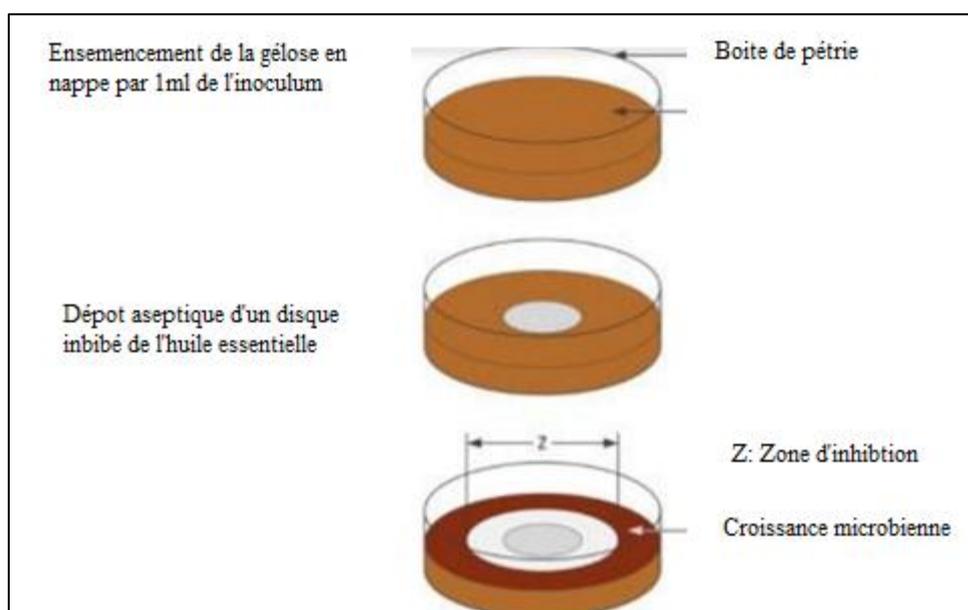


Figure 06: Principe de la méthode d'aromatogramme (Soulet, 2017).

2.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la concentration minimale de l'huile essentielle qui inhibe la croissance de la population bactérienne après un temps d'incubation à 37 °C (CLSI, 2007).

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

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

La technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

La méthode de microdilution sur microplaque en utilisant du Mueller Hinton liquide pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles (Oke et *al.*, 2009).

Les huiles essentielles sont solubilisées dans le DMSO. Une solution-mère de chaque huile essentielle est préparée avec une concentration finale de 50 mg/ml. Une série de dilutions de raison géométrique 2 est réalisée extemporanément dans

le bouillon Mueller Hinton à partir de la solution mère de façon à avoir une gamme de concentration de 0,048 à 50 mg/ml.

La CMI est effectuée selon la méthode de microdilution dans des plaques de 96 puits. Chaque puits est inoculé avec 95 µl de BMH, 100 µl de la solution mère des huiles essentielles initialement préparée dans le DMSO, d'une concentration égale à 50 mg/ml sont ajoutés dans les premiers puits.

100 µl de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs et 5 µl de la suspension bactérienne sont ajoutés avec une densité optique de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / ml) pour chaque microorganisme et une densité de 3 à 4 Mc Farland (environ 10^9 UFC / ml) pour *H. pylori*.

Le contrôle positif est préparé avec 195 µl de BMH (Pour *H. pylori*, le milieu est additionné de 10% de sang de cheval) et 5 µl d'inoculum. Quant au négatif, il est préparé de 100 µl de l'huile essentielle en solution et 100 µl BMH sans inoculum. Les microplaques sont ensuite recouvertes de parafilm et incubées à 37°C pendant 24 heures. Pour *H. pylori*, l'incubation se fait à 37°C pendant 2 à 5 jours (Megraud et al., 1999).

2.4.4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

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

Pour déterminer la CMB, des aliquotes de 10 µl sont prélevées à partir de cultures au niveau des puits ne présentant pas de turbidité visible, puis déposés «en strie» sur la gélose Muller Hinton et incubées pendant 48 heures à 37°C, la CMB est la plus faible concentration qui inhibe toute culture visible sur gélose après la période d'incubation.

Les cupules des rangées des témoins positif et négatif ont également étéensemencées sur la même gélose pour s'assurer de l'absence de croissance des bactéries dans les cupules de la rangée témoin négative et de la présence de

croissance dans les cupules de la rangée positive. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. A la lecture, la CMB de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois (CLSI, 2007; Licina et *al.*, 2013).

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

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

2.5. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, les antibiotiques utilisés dans cette étude ont été choisis selon leur spectre d'activité qui s'étend vers les espèces étudiées (Rahal et *al.*, 2008).

L'étude de la sensibilité des bactéries a été réalisée par la méthode de disque ou antibiogramme standard qui sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papiers buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé.

Le médicament diffuse à partir de disques dans la gélose. Après incubation, la mesure du diamètre de la zone d'inhibition sert à déduire la puissance d'inhibition de l'agent antimicrobien contre les germes (Hajlaoui et *al.*, 2016).

La technique du travail consiste à utiliser des suspensions bactériennes standardisées (obtenues à partir des cultures pures de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement) avec une densité optique (lue à 625 nm) équivalente à 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC / ml pour les bactéries pathogènes) et une densité équivalente à 3 à 4 Mac Farland (environ 10^9 UFC /ml pour *H. pylori*).

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bensen, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface des boîtes gélosées de Mueller-Hinton précédemment ensemencées (Pour *H. pylori* le milieu est additionné de 10% de sang de cheval), puis elles sont maintenues à la température du laboratoire pendant 30 mn afin de permettre la pré-diffusion. L'incubation se fait à une température de 37 °C pendant 18 à 24 h (Bonnet et *al.*, 2012). La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les antibiotiques utilisés sont:

La vancomycine (30 µg), kanamycine (30 µg), gentamicine (15 µg), chloramphenicol (30 µg), céfadroxil (30 µg), rifampicine (30 µg), ertapénème (10 µg), imipénème (10 µg), ticarcilline (75 µg), amoxicilline + acide clavulanique (20 + 10 µg), pénicilline (10 µg), tobramycine (10 µg), métronidazole (16 µg), la clarithromycine (15 µg), l'amoxicilline (25 µg), la tétracycline (30 µg), l'érythromycine (15 µg) et la ciprofloxacine (10µg).

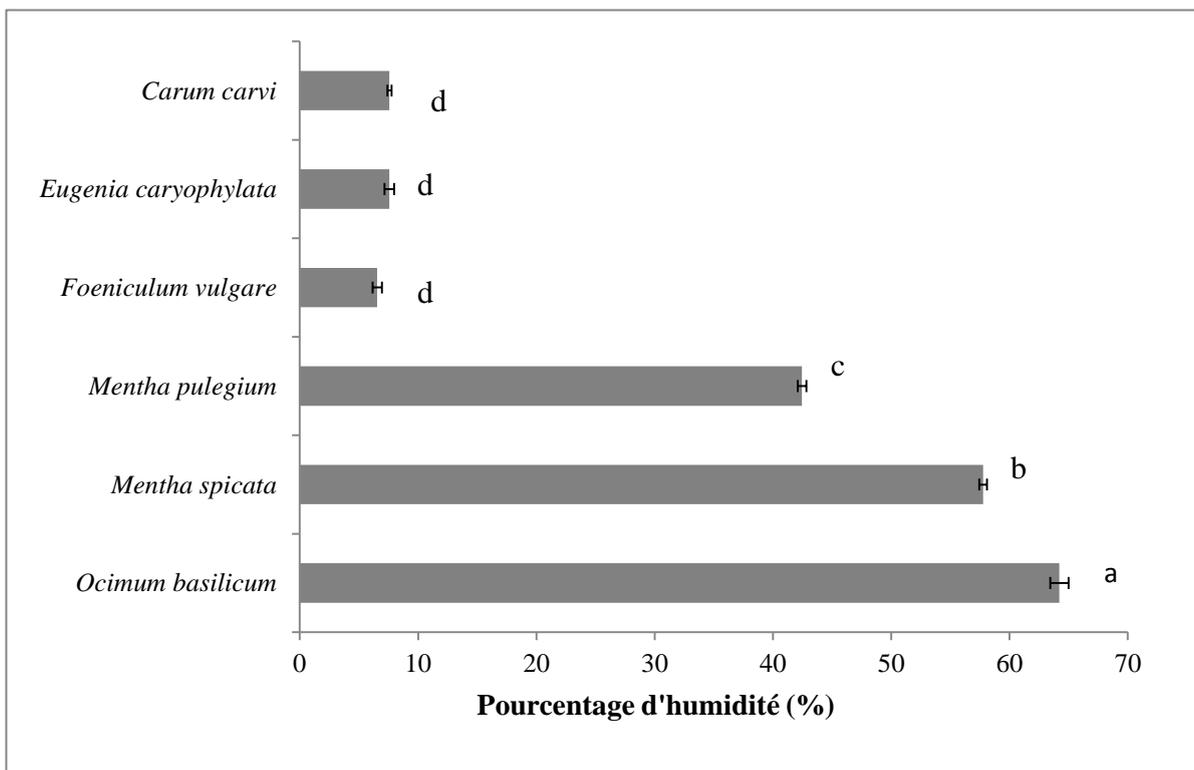
2.6. Analyse statistique des résultats

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne ± l'écart-type. L'analyse statistique a été exécutée en utilisant le logiciel SPSS Statistics 16. 0 (Inc., Chicago, IL). L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide de programme "ANOVA". Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

II. Résultats et discussion

1. Détermination du taux d'humidité

Les résultats ont révélé que le taux d'humidité des feuilles d'*Ocimum basilicum* est significativement élevé ($P < 0.05$) ($64,27 \pm 0,77$ %) suivi par celui de *Mentha spicata* ($57,76 \pm 0,31$ %) et celui de *Mentha pulegium* ($42,46 \pm 0,37$ %). En revanche, le taux d'humidité des boutons floraux d'*Eugenia caryophyllata* est de $7,57 \pm 0,40$ %, celui des graines de *Foeniculum vulgare* est de $6,54 \pm 0,39$ % et celui de *Carum carvi* est de $7,57 \pm 0,18$ % ; ces taux d'humidité sont significativement ($P < 0.05$) les plus faibles (Fig. 07).



Les barres avec des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

Figure 07: Pourcentage d'humidité des espèces végétales étudiées.

Les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (Bethenod, 1980).

Des résultats différents ont été trouvés par plusieurs chercheurs. En effet, les travaux réalisés par Taleb-Toudert (2015) sur les feuilles d'*Ocimum basilicum* et *Mentha spicata* ont montré respectivement des taux d'humidité de 62 et 27%.

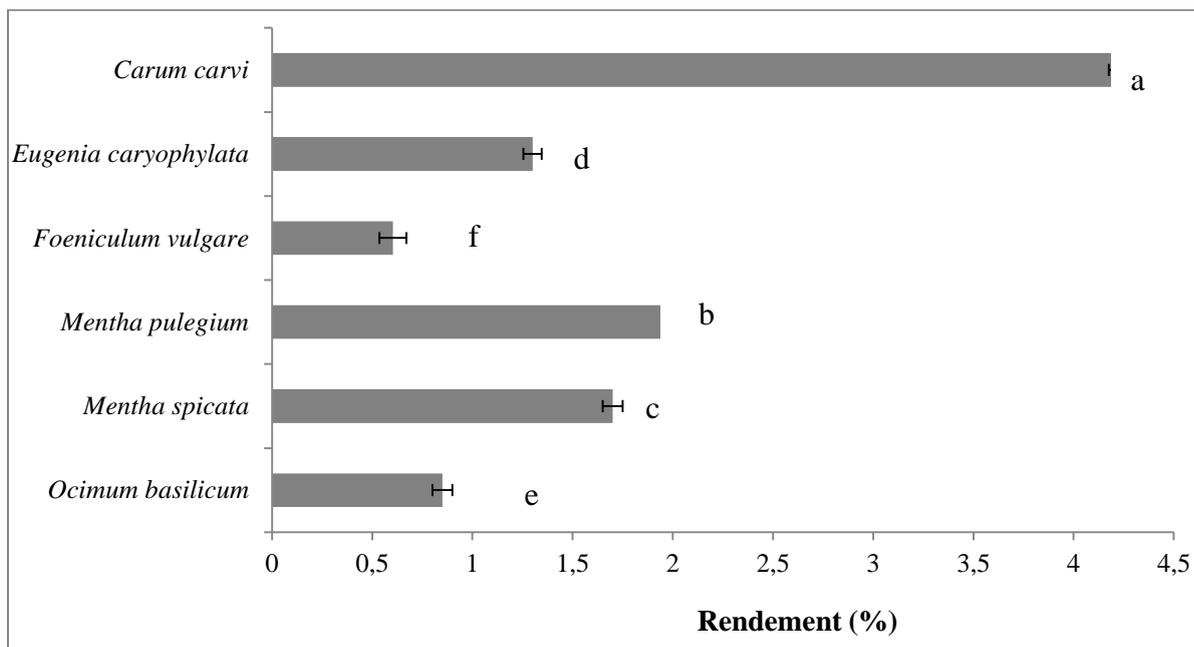
Selon Messaid (2008), la différence marquée entre les teneurs en eau peut être expliquée par l'âge de la plante, la saison et la région de récolte. Les plantes cultivées dans les régions tempérées comme le sud algérien ont une teneur en eau plus faible par rapport à celles cultivées dans le nord.

2. Extraction des huiles essentielles

2.1. Rendement en huiles essentielles

Le procédé utilisé pour l'extraction des huiles essentielles à partir des feuilles de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, et *Ocimum basilicum* et les graines de *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi* et *Eugenia caryophyllata* est l'hydrodistillation.

D'après ces résultats, le rendement en huile essentielle de *Carum carvi* est de $4,20 \pm 0,02\%$; il est significativement supérieur ($P < 0.05$) à ceux de *Mentha pulegium* ($2,08 \pm 0,00\%$), de *Mentha spicata* ($1,7 \pm 0,048\%$) et d'*Eugenia caryophyllata* ($1,30 \pm 0,04\%$). En revanche, le rendement en huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est de $0,60 \pm 0,06\%$ et celui d'*Ocimum basilicum* est de $0,85 \pm 0,05\%$; ces rendements sont significativement ($P < 0.05$) les plus faibles (Fig. 08).



Les barres avec des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

Figure 08: Rendement en huile essentielle.

Les résultats de ce travail sont conformes dans l'ensemble aux données de la littérature. En effet, Locabellis et *al.* (2004) et Den et *al.* (2010) ont trouvé des rendements variant respectivement de 0,48 à 1,41 % et de 0,47 à 7%. Les graines de *Foeniculum vulgare* ont donné un rendement moins important ($0,60 \pm 0,06\%$ %). C'est une valeur inférieure à celle trouvée (3,8 %) par Gulfranz et *al.* (2008) et à celle trouvée (1,2%) par Singh et *al.* (2006). Un rendement important (2,08%) a été enregistré avec l'huile extraite à partir des feuilles de *Mentha pulegium*. Cette valeur est proche à celle obtenue (2,32%) par Lahrech (2006) et supérieure à celle trouvée (0,82%) par Belghazi et *al.* (2002).

Les feuilles de *Mentha spicata* se sont révélées riches en huile essentielle avec un rendement appréciable de 1,7%, cette valeur est très proche de celles énoncées par Rajesswara (2002), où les rendements oscillent entre 1 et 2,5%. Ce résultat corrobore avec ceux obtenus par Benyoucef et *al.* (2004) à partir de la distillation des feuilles de deux échantillons de menthe verte. En effet, l'un provenant de Blida (Nord algérien) avec un rendement maximal de 1% et l'autre prélevé dans la région d'Ouargla (Sud algérien) avec 0,74% après 90 mn d'extraction. De même, Boukhebti

et *al.* (2011) ont obtenu des rendements variant de 0,1 à 1,8 % à partir des feuilles de menthe verte provenant d'Amoucha (Sétif, nord-est d'Algérie).

Le rendement en huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* est de 0,85%, cette valeur est beaucoup plus proche à celle obtenue par Isa et *al.* (2006) qui notent dans leur travaux ayant porté sur les huiles essentielles des rendements de 0,5 à 0,8%. Cette valeur est plus importante à celle rapporté (0,11 %) par Belong et *al.* (2013), à partir des feuilles d'*Ocimum basilicum* récoltées en juin 2009 et provenant d'un champ expérimental situé à Douala (Cameroun). En revanche, des taux respectifs de 0,59 et 0,60 % pour *Ocimum canum* et *Ocimum gratissimum* du Cameroun (Tchoumboungang et *al.*, 2009).

La grande variabilité de rendement en huile essentielle pourrait s'expliquer par diverse facteurs; les conditions climatiques, la période de récolte, la nature de l'espèce qui varie d'une région à une autre, l'emplacement des sites des huiles essentielles et les conditions opératoires. Ces différences dans le rendement doivent être essentiellement dues à la différence de morphologie des plantes et la nature du sol. Il faut noter que le rendement et la composition chimique dépendent de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu et la période de récolte, les pratiques culturales et la technique d'extraction (Kelen et Tepe, 2008).

Vekiari et *al.* (2002) ont rapporté que le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en huiles essentielles.

Pour expliquer l'impact de la technique d'extraction utilisée sur le rendement en huile essentielle obtenue, Djenane et *al.* (2011) ont observé des rendements nuls en huiles essentielles de myrte et d'Eucalyptus, utilisant un dispositif d'hydrodistillation à l'échelle du laboratoire, cependant les rendements en huiles essentielles de ces deux plantes ont été améliorés respectivement de 0,056 et 0,048% quand l'extraction a été réalisée à l'aide d'un hydrodistillateur semi-industriel chez SAIDAL (Alger, Algérie).

2.2. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Concernant les propriétés organoleptiques testées des huiles essentielles extraites, nous avons remarqué que ces propriétés sont conformes aux normes fixées par AFNOR 1989.

L'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'*Ocimum basilicum* possède un aspect liquide limpide, de coloration jaune pâle, donnant une impression de fraîcheur et rappelant l'odeur de la feuille.

Les huiles essentielles extraites à partir des feuilles de *Mentha pulegium* et *Mentha spicata* ont un aspect liquide, limpide et visqueux. La coloration varie respectivement du jaune ambré au jaune verdâtre (Tableau 03).

Les huiles essentielles de *Foeniculum vulgare* et de *Carum carvi* ont un aspect liquide et limpide ainsi qu'une odeur caractéristique de chaque espèce, alors que la couleur de l'huile essentielle de fenouil est jaune foncée, celle du carvi est jaune ambrée. L'huile essentielle extraite des graines d'*Eugenia caryophyllata* a un aspect liquide, limpide et légèrement visqueux, de couleur jaune avec une odeur forte, épicée et caractéristique de l'eugénol (Annexe II).

Tableau 03: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.

Huiles essentielles	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Jaune	Epicée et caractéristique du clou de girofle	Liquide, mobile et légèrement visqueux
<i>Foeniculum vulgare</i>	Jaune foncé	Caractéristique du fenouil	Liquide limpide
<i>Carum carvi</i>	Jaune ambré	Caractéristique aromatique du carvi	Liquide mobile limpide
<i>Ocimum basilicum</i>	Jaune pâle	une forte et persistante odeur de feuille	Liquide limpide
<i>Mentha pulegium</i>	Jaune ambré	caractéristique herbacée menthée	Liquide limpide visqueux
<i>Mentha spicata</i>	Jaune verdâtre	Donnant une impression de fraîcheur et rappelant l'odeur de la feuille.	Liquide mobile limpide visqueux

2.3. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

La détermination des propriétés physicochimiques comprend la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, l'indice d'acide et l'indice d'ester. Ces propriétés ont été déterminées selon les normes AFNOR (AFNOR, 1989).

Les valeurs de références de la densité, l'indice de réfraction et du pouvoir rotatoire sont notées par la norme AFNOR comme des indices de pureté. Alors que l'indice d'acide et l'indice d'ester sont variés selon le taux d'altération de chaque huile essentielle et peuvent nous informer sur la qualité de ces huiles, ils sont donc des indices de qualité. Les résultats des analyses physicochimiques révèlent que les indices de différentes huiles essentielles sont conformes à la norme AFNOR (1989).

La densité des huiles essentielles extraites varient de $1,056 \pm 0,003$ à $0,913 \pm 0,003$ (Tableau 04). En effet, la densité de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* ($1,056 \pm 0,003$) est significativement ($P < 0,05$) supérieure à celles des autres huiles essentielles. En comparant les résultats obtenus avec ceux notés par la norme, la densité de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Ocimum basilicum* ($0,962 \pm 0,002$) est proche de la norme ($0,948-0,970$), celle des feuilles de *Mentha pulegium* ($0,941 \pm 0,003$) est aussi proche de la norme ($0,930-0,944$). La densité de l'huile extraite des feuilles de *Mentha spicata* ($0,930 \pm 0,001$) se situe dans les limites fixées par la même norme ($0,920-0,937$). De même, les valeurs de la densité des huiles essentielles de *Foeniculum vulgare* ($0,97 \pm 0,00$), de celle de *Carum carvi* ($0,913 \pm 0,003$) et celle d'*Eugenia caryophyllata* ($1,056 \pm 0,003$) sont conformes à celles décrites par la norme AFNOR (1989).

Les valeurs obtenues de l'indice de réfraction des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Ocimum basilicum* ($1,512 \pm 0,00$), de celle de *Mentha pulegium* ($1,488 \pm 0,00$) et de celle de *Mentha spicata* ($1,487 \pm 0,017$) sont conformes à celles fixées par la norme, qui sont respectivement: $1,5100-1,5200$, $1,4800-1,4900$ et $1,4850-1,491$ (Tableau 04).

Les valeurs de l'indice de réfraction de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* ($1,519 \pm 0,000$) et celle de *Carum carvi* ($1,131 \pm 0,00$) sont très proches de celle énoncée par la norme AFNOR. L'indice de réfraction de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* est de $1,532$, c'est une valeur située dans l'intervalle fixé par la même norme ($1,528$ à $1,538$) (Tableau 04).

Les valeurs observées pour le pouvoir rotatoire sont aussi conformes aux normes. En effet, on note un angle égale à $-0,25 \pm 00,00^\circ$ pour l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*, de $+21 \pm 00,00^\circ$ pour l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et de $-57 \pm 00,00^\circ$ pour l'huile essentielle de *Mentha spicata*. Pour les huiles essentielles extraites à partir des graines, un pouvoir rotatoire de $+19 \pm 00,00^\circ$ est enregistré pour l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare*, de $+65 \pm 00,00^\circ$ pour l'huile essentielle de

Carum carvi alors que l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* présente un angle égale à $-1 \pm 00.00^\circ$ (Tableau 04).

Les valeurs de l'indice d'acide des huiles essentielles varient de $2,87 \pm 0,02$ à $4,48 \pm 0,087$. L'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est caractérisée par un indice d'acide ($4,48 \pm 0,087$) significativement élevé ($P < 0.05$) par rapport aux à ceux des autres huiles; celui de l'huile essentielle de *Carum carvi* est de $3,350 \pm 0,050$ et celui de *Mentha spicata* est de $3,366 \pm 0,00$. La faible valeur ($P < 0.05$) a été retrouvée pour l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* ($2,87 \pm 0,02$) (Tableau 04).

L'indice d'ester de l'huile extraite des graines de *Foeniculum vulgare* ($23,57 \pm 0,026$), celui de *Carum carvi* ($67,45 \pm 0,034$) et celui d' *Eugenia caryophyllata* ($32,41 \pm 0,02$) sont significativement élevés par rapport à ceux trouvés pour les feuilles d'*Ocimum basilicum* ($9,85 \pm 0,036$), de *Mentha pulegium* ($15,43 \pm 0,07$) et de *Mentha spicata* ($16,54 \pm 0,055$) (Tableau 04).

L'acidité d'une huile essentielle est un critère d'estimation de sa qualité. Un indice d'acide faible indique que les huiles essentielles sont stables et ne subissent pas d'oxydation car l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (De Cliff et Harerimana, 2013).

Les valeurs des indices d'ester indiquent que l'ensemble des huiles contiennent d'importantes quantités d'acide libres, et il est admis que l'indice d'ester est un bon indicateur pour évaluer la qualité de l'huile (Hilan et al., 2006).

Tableau 04: Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.

	Densité	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire (°)	Indice d'acide	Indice d'ester
<i>Ocimum basilicum</i>	0,962± 0,002 ^c	1,512±0,00 ^b	-0,25±00.00 ^e	3,081±0,002 ^c	9,85±0,036 ^f
<i>Mentha pulegium</i>	0,941± 0,003 ^d	1,4881±00,00 ^c	21 ±00.00 ^b	2,986 ±0,005 ^c	15,43±0,07 ^e
<i>Mentha spicata</i>	0,930 ±0,001 ^e	1,4872±0,017 ^c	-57±00.00 ^f	3,366±0,005 ^b	16,54±0,055 ^d
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,97± 0,00 ^b	1,519±0,00 ^{a,b}	19±00.00 ^c	4,48 ±0,087 ^a	23,57±0,026 ^c
<i>Carum carvi</i>	0,913±0,003 ^f	1,131±0,00 ^d	65±00.00 ^a	3,35±0,05 ^b	67,45±0,034 ^a
<i>Eugenia caryophyllata</i>	1,056± 0,003 ^a	1,532±0,005 ^a	-1±00.00 ^d	2,87 ±0,02 ^d	32,41±0,020 ^b

Les lettres différentes (a, b, c, d, e, f) dans chaque colonne indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont des activités biologiques (Djenane et *al.*, 2002; Bousbia, 2004; Bouzouita et *al.*, 2008). Les résultats de la composition chimique des huiles essentielles des plantes sélectionnées sont obtenus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

Le chromatogramme de chaque huile essentielle comporte plusieurs pics. Chaque pic est représenté par un temps de rétention qui représente la nature du composé de l'huile essentielle et par un pourcentage de l'aire du pic, qui constitue le pourcentage du composé de l'huile par rapport aux autres composés. Après identification des différents constituants des huiles essentielles, nous avons classé les composés terpéniques selon le nombre d'unités en C10 qu'ils comportent, par rapport au nombre total des composés de chaque huile essentielle (monoterpènes: C₁₀H₁₆, sesquiterpènes: C₁₅H₂₄ et les diterpènes : C₂₀H₃₂) (Guignard et Dupont, 2004).

Les huiles essentielles extraites sont formées d'hydrocarbures (des terpènes, des sesquiterpènes et des diterpènes) et de composés oxygénés (les alcools, les esters, les éthers, les aldéhydes, les cétones, les phénols et les éthersphénoliques).

3.1. Composition chimique des huiles essentielles de *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi*, et d'*Eugenia caryophyllata* par CG/SM

Les composants sont listés par ordre de leur temps de rétention sur la colonne HP-5MS. Les profils chromatographiques des huiles essentielles de *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi* et d'*Eugenia caryophyllata* et analysées par CG/SM sont présentés en annexe III.

3.1.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare*

L'analyse chromatographique a identifié vingt composés (97,36%) avec une dominance de trans-anéthol (43,01%), c'est un dérivé du phénylpropane possédant des activités anti-inflammatoire, anticarcinogène, antidiabétique, immunomodulant, neuroprotecteur, antithrombotique, antivirale et Antifongique. L'estragole (27,04%) est un composé organique aromatique de la famille des phénylpropène, C'est un isomère de l'anéthol. Le fenchone (06,63%) est un monoterpène polycyclique à effet anti-inflammatoire, cicatrisant et antitumorale. l'huile essentielle extraite de graines de *Foeniculum vulgare* est particulièrement riche en composés monoterpéniques. D'autres constituants ont été identifiés dont le limonene (4,68%), le sabinene (3,89%), le linalool (3,22%), le γ -terpinene (2,27%), l' α -pinene (1,36%), le myrcene (1,36%) et l' α -phellandrene (1,16%). Des composés chimiques minoritaires sont aussi présents tels que le thymol, le fenchyl acetate et le camphor (Tableau 05).

Ces résultats sont relativement différents à ceux obtenus par Bodoc et *al.* (1998) sur le fenouil (*Foeniculum vulgare*) provenant du bassin méditerranéen. En effet, la composition chimique de cette huile essentielle est constituée majoritairement de fenchone (31,765%) et de α - phellandrene (17,087%).

Pour la même espèce, le contenu biochimique de l'huile essentielle peut changer de manière significative selon les conditions où la plante a fait sa croissance (Bodoc et *al.*, 1993).

Plusieurs investigations de Belaiche (1979); Formacek et Kubeczka (1982) et Marotti et *al.* (1993) ont démontré que, généralement l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est constituée principalement de phénol méthyl-éther (anéthol), monoterpène (α - pinène, β - phellandrène et myrcène) et cétone (fenchone).

Tableau 05: Composition chimique de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* par CG/SM.

N°	Composés	(%)	Indice de rétention
1	α -Thujene	0,12	931
2	α -Pinene	1,36	935
3	Camphene	0,27	955
4	Sabinene	3,89	973
5	Myrcene	1,36	992
6	α -Phellandrene	1,16	1007
7	Limonene	4,68	1037
8	γ -Terpinene	2,27	1061
9	Fenchone	06,63	1089
10	α -Thujene	3,22	931
11	α -Pinene	0,23	935
12	Linalool	3,22	955
13	Camphor	0,23	1148
14	Terpinen-4-ol	0,31	1178
15	Verbenone	1,03	1204
16	Fenchyl acetate	0,16	1247
17	<i>trans</i> -Anethole	43,01	1285
18	Anethole	0,47	1288
19	Thymol	0,15	1290
20	Estragole	27,04	1297
21	α -Copaene	tr	1377
22	β -Caryophyllene	tr	1421
	Total	97,36	/

tr: trace ($\leq 0,1\%$).

3.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*

Quantitativement, les constituants les plus importants de l'huile essentielle isolée d'*Eugenia caryophyllata* sont l'eugénol (65,22%), composé majoritaire, appelé aussi 4-allyl-2-méthoxyphénol. Il s'agit d'un composé aromatique de la famille des phénylpropènes, une sous-classe des phénylpropanoïdes, l'acétate d'eugényle (18,77%) et le trans-caryophyllène (9,92%). Ces composés représentent 93,91% de la totalité des constituants identifiés (Tableau 06).

Nous avons déduit que d'autres éléments chimiques sont présents en teneurs relativement faibles, il s'agit de sesquiterpènes: α -humulène (1,53%), α -copaène (0,83%), δ -cadinène (0,25%) et le farnésol II (0,21%). Les composés terpéniques sont présents sous formes de traces (Tableau 06).

Pourmortzavi (2007) a rapporté que les principaux constituants biochimiques sont l'eugénol (phénol), caryophyllène (sesquiterpène) et l'acétate d'eugényle (ester). Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles du point de vue quantitative et qualitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison de plusieurs facteurs, comme: le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chémotypes.

Yadav et al. (2013) ont distingué que les huiles essentielles extraites d'*Eugenia caryophyllata* pourraient être de chimiotype eugénol, β -caryophyllène, α -humulène, acétate d'eugénol et acétyl eugénol.

Selon Peter et Marius (2007), le girofle est composé de plus de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antiseptique et antifongique. Il y a également, entre 9 et 15% d'acétate d'eugénol, entre 5 et 12%

Tableau 06: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* par CG/SM.

	N°	Composés	(%)	Indice de rétention	
tr: (≤	1	α -Pinene	tr	935	trace
	2	β -Pinene	tr	985	
	3	<i>p</i> -Cymene	tr	1025	
	4	Linalool	tr	1100	
	5	Carvone	tr	1244	
	6	Anethole	tr	1288	
	7	Eugenol	65,22	1355	
	8	α -Copaene	0,83	1377	
	9	β -Caryophyllene	tr	1421	
	10	<i>Trans</i> -caryophyllene	9,92	1425	
	11	α -Amorphene	tr	1477	
	12	α -Humulene	tr	1457	
	13	Eugenyl acetate	18,77	1527	
	14	δ -Cadinene	0,25	1242	
	15	Caryophyllene oxide	0,54	1244	
	16	Farnesol II	0,21	1285	
		Total	97,27	/	

0,1%).

de β -caryophyllène et 2% d'acide oléanique. D'autres composés sont aussi présents, en plus petites quantités, comme le caryophyllène oxyde, α -humulène et le copaène (moins de 1%). On trouve, enfin, des traces de furfural et de vanilline.

Les résultats du profil chimique de l'huile essentielle de clou de girofle convergent avec ceux obtenus par les différents travaux montrant que cette huile est formée essentiellement d'eugenol, d'acetate-d'eugenyle et du β -caryophyllène. En effet, Barbelet (2015) a trouvé que les essences de clou de girofle sont caractérisées par des concentrations élevées en eugénol (80,0%), β -caryophyllène (7,0%) et en

acétate d'eugényle (10,6%). De même, Fayemiwo et *al.* (2014) ont trouvé que l'huile essentielle de clou de girofle contient 28 composés dont l'eugénol (80,95%) est le composé majoritaire, suivi par eugényl acétate (5,01%), le β -caryophyllène (3,14%), le myrcène (1,84%) et l' α -terpinène (1,65%).

3.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Carum carvi*

La séparation chromatographique a identifié vingt-cinq constituants de l'huile essentielle de *Carum carvi* qui représentent 95,25% dont 91,26% sont des monoterpènes. Le carvone, l' α -pinène et le limonène ont été définis comme des composés majoritaires avec des pourcentages de 63,92, 8,43 et 4,81% respectivement (Tableau 07).

Les résultats du profil chimique de l'huile de *Carum carvi* ont montré la présence des composés minoritaires représentés essentiellement par le linalool (4,26%), l'anethol (2,49%), l'isocarveol (2,07%), le trans-Perillaldehyde (2,02%), l'eucalyptol (1,83%) et le cis-dihydrocarvone (1,47%). Des teneurs très faibles en sesquiterpènes ont été constatées, le β -caryophyllène (1,24%), le β -selinène (0,71%), le β -cadinène (0,69%) et le β -cubebene (0,3%). Les autres composés sont présents avec des teneurs relativement faibles à savoir le γ -terpinène (0,30%), l' α -terpineol (0,14%), le trans-carveol (0,12%) et le dihydrocarveol (0,14%) (Tableau 07).

L'étude réalisée par Farhat (2010) sur la composition de l'huile essentielle du carvi a confirmé la présence des cétones terpéniques (carvone et dihydrocarvone-cis) et des monoterpènes (limonène et myrcène).

Les résultats de la composition chimique de l'H.E. de *Carum carvi* rejoignent les constatations de Kamaleeswari (2005) et Roulier (2006). En effet, ces chercheurs ont démontré « *in vitro* » que, l'huile essentielle de carvi en renfermant comme principaux composés: le carvone et le limonène, cette huile exerçait un effet antibactérien puissant par l'inhibition de croissance bactérienne.

Ces résultats montrent d'une part que la composition chimique de l'huile essentielle des graines de carvi, obtenue par CG/SM, est constituée de cétone terpénique comme composant majeur, et d'autre part que les composés à faibles teneurs sont les sesquiterpènes (β -caryophyllène).

Selon Roulier (2009), qu'elle que soit la méthode d'extraction, l'H.E. de *Carum carvi* est constituée de composés aromatiques identiques. En effet, le limonène et le carvone sont présents en teneurs assez élevées par rapport aux autres constituants.

Tableau 07: Composition chimique de l'huile essentielle de *Carum carvi* par CG/SM.

N°	Composés	(%)	Indice de rétention
1	α -Pinene	8,43	935
2	Camphene	tr	955
3	β -Pinene	tr	985
4	α -Phellandrene	tr	1007
5	Eucalyptol	1,83	1015
6	Limonene	4,81	1037
7	γ -Terpinene	0,30	1061
8	Linalool	4,26	1100
9	<i>Trans</i> -Perillyl alcohol	tr	1116
10	Isocarveol	2,07	1129
11	limonene oxide	tr	1140
12	<i>Trans</i> -verbenol	tr	1145
13	<i>Trans</i> -perillaldehyde	2,02	1150
13	α -Terpineol	0,14	1194
15	<i>Cis</i> -dihydrocarvone	1,47	1208
16	<i>Trans</i> -Carveol	0,12	1217
17	Dihydrocarveol	0,14	1242
18	Carvone	63,92	1244
19	<i>Trans</i> -anethole	-	1285
20	Anethole	2,49	1288
21	Estragole	tr	1297
22	β -Cubebene	0,3	1390
23	β -Caryophyllene	1,24	1421
24	α -Guaiene	tr	1468
25	β -Selinene	0,71	1490
26	β -Cadinene	0,69	1503
27	Apiole	0,31	1247
	Total	95,25	/

tr: trace ($\leq 0,1\%$).

3.2. Composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum* par CG/SM

Les profils chromatographiques des huiles essentielles de *Carum carvi*, *Eugenia caryophyllata* et *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum* sont présentés en annexe III.

3.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

L'analyse chromatographique de l'huile de *Mentha spicata* a révélé la présence de trente-six constituants (97,21%). Le carvone (67,08%) et le limonène (14,34%) sont définis comme les composants majoritaires de cette huile essentielle. Des composés minoritaires représentés essentiellement par le γ -muurolène (2,29%), le myrcène (2,08%), le β -caryophyllène (1,76%) et le trans-Dihydro carvone (1,03%) sont identifiés par la CG/SM. Les autres composés sont présents avec des teneurs relativement faibles (inférieures à 1 %) (Tableau 08).

L'huile extraite de *Mentha spicata* est riche en carvone (67,08%) et en limonène (14,34%). Les mêmes résultats sont retrouvés pour l'huile extraite de *Mentha spicata* cultivé dans la région de Sétif (Algérie) (59,40% de carvone et 6,12% de limonène) (Boukhebti et al., 2011). De même, Benyoucef et al. (2004) ont analysé les huiles essentielles de deux échantillons de *Mentha spicata* l'un provenant de Ouargla (à 710 km au Sud-Est d'Alger) et l'autre de Larbâa dans la wilaya de Blida (à 50km au sud-ouest d'Alger). Les résultats ont révélé que la carvone est le composant majoritaire avec des proportions respectives de 80 et 56%. Ces huiles originaires d'Algérie sont des chémotypes à carvone et limonène. Ils sont différents à ceux analysés par Znini et al. (2011), à partir des feuilles fraîches de *Mentha spicata* prélevées à Tazouka dans la localité d'Errachidia (Sud du Maroc), avec des proportions respectives de 29 et 14 % en carvone et transcarvéol mais ce chémotype ne contient pas de limonène.

Tableau 08: Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par CG/SM.

N°	Composés	(%)	Indice de rétention
1	α -Pinene	0,51	935
2	Sabinene	0,14	973
3	β -Pinene	0,69	985
4	Myrcene	2,08	992
5	Limonene	14,34	1037
6	Linalool	0,48	1100
7	Allo-Ocimene	tr	1116
8	Neo-allo-Ocimene	0,11	1143
9	Santolinyl acetate	0,34	1171
10	Terpin-4-ol	0,07	1178
11	Trans-dihydrocarvone	1,03	1184
12	Trans-carveol	0,79	1217
13	Carvone	67,08	1244
14	Trans-carvone oxide	tr	1279
15	Dihydrocarveol acetate	0,06	1242
16	δ -Elemene	0,05	1340
17	Trans-carvyl acetate	0,24	1321
18	Cis-carvone oxide	tr	1263
19	α -Copaene	0,09	1377
20	β -Bourbonene	1,18	1381
21	β -Elemene	0,38	1388
22	α -Gurjunene	0,21	1405
23	β -Caryophyllene	1,76	1421
24	β -Gurjunene	0,19	1430
25	α -Humulene	0,63	1457
26	Cis-Muuorola-4(14),5-iene	0,66	1449
27	γ -Muurolene	2,29	1473
28	Bicyclogermacrene	0,33	1489
29	Cis-calamenene	0,72	1509
30	α -Cadinene	0,10	1503
31	Cis-muurool-5-en-bêta-ol	tr	1531
32	Cis-muurool-5-en-4-alpha-ol	tr	1555
33	Germacrene D-4-ol	0,11	1568
34	1,10-di-epi-Cubenol	0,29	1605
35	Epi- α -Cadinol	0,05	1626
36	α -Cadinol	0,21	1655
	Total	97,21	/

tr: trace ($\leq 0,1\%$).

Ghavam et al. (2022) ont déterminé la composition phytochimique des huiles essentielles de différentes plantes de la famille de lamiacées de l'Iran. En effet, l'étude a montré la richesse de ces huiles en composés bioactifs tels que le thymol (67,7%), l'acide oléique (0,5 à 62,1%), caryophyllène oxide (0,4 à 24,8%), α -pinène (1,1 à 19,4%), 1,8-cineole (0,2 à 15,4%), l'acide palmitique (0,32 à 13,28%), le spathulenol (11,16%), et le germacrene D (0,3 à 10,3%).

3.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Quantitativement, les constituants les plus importants de l'huile essentielle isolée de *Mentha pulegium* sont le piperitone (35,56%), le piperitenone (21,12%) et le α -terpineol (10,89%). Ce sont des monoterpènes représentant 67,57 % de la composition totale (97,22 %). D'autres éléments terpéniques sont présents en teneurs relativement faibles, il s'agit de : pulegone (6,42%), piperitone oxide (4,02%), menthol (3,28%), menthone (3,09%), neomenthol (2,82%), menthofuran (2,15%), isomenthone (1,56%), carvone (1,13%) et le limonène (1,02%) (Tableau 09).

Vingt-deux composants (89,9%) de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sont identifiés (Chalchat et al., 2000). En effet, le composé majeur est le menthone (30,9%), la pulegone (14,1%), le néomenthol (13,8%) et l'oxyde de caryophyllène (9,0%). L'huile essentielle de *Mentha pulegium* du sud d'Iran contient au total 55 composés dont les monoterpènes oxygénés sont dominants. Les principaux constituants sont la pulegone (46,18%), la pipériténone (19,56%), le 1,8-cineol (4,55%) et l'oxyde de pipériténone (4,23%) (Mahboubi et Haghi, 2008).

Trente-trois composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. d'origine cubaine. En effet, le neoisomenthol (20,68%) et la pulegone (25,14%) ont été les principaux constituants (Pino et al., 1996).

El Ghorab (2006) a montré que les principaux composés identifiés dans l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. cultivé en Egypte sont la pulegone (43,5%), la pipériténone (12,2%), le p-menthane-1,2,3-triol (6,5%), le γ -elemenène (3,6%), l'acétate de carvacrol (2,6%) et l'alcool phényléthylique (2,4%).

Tableau 09: Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* analysée par CG/SM.

N°	Composés	(%)	Indice de rétention
1	Limonene	1,02	1037
2	Sabinene	0,82	973
3	Camphene	tr	955
4	α -Myrcene	0,01	992
5	α -Terpineol	10,89	1194
6	Menthyl acetate	tr	1281
7	Pulegone	6,42	1222
8	β -Cadinene	tr	1503
9	Piperitenone	21,12	1316
10	Neomenthol	2,82	1157
11	Piperitone	35,56	1232
12	β -caryophyllene	0,42	1421
13	Trans β -ocimène	0,14	1050
14	Isomenthone	1,56	1146
15	Menthofuran	2,15	1152
16	Menthol	3,28	1162
17	1-Octen-3-ol	0,09	965
18	Germacrene D	1,03	1475
19	Geranyl acetate	1,06	1361
20	Terpinolene	0,54	1079
21	Piperitone oxide	4,02	1366
22	α -Terpinene	0,05	1010
23	Linalyl acetate	tr	1253
24	Menthone	3,09	1137
25	Terpinen-4-ol	tr	1164
26	Carvone	1,13	1244
27	1,8-Cineole	tr	1023
28	Linalool	tr	1100
	Total	97,22	/

tr: trace ($\leq 0,1\%$).

L'analyse chromatographique (CG/SM) de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Bulgarie a révélé la présence des composants majoritaires tels que la pulegone (42,9-45,4%), la pipériténone (21,7-23,1%) et l'isomenthone (11,3-12,8%) (Stoyanova et al., 2005).

La composition des huiles essentielles obtenues à partir de 10 populations sauvages de *Mentha pulegium* L. en Grèce a montré que la teneur en pulegone varie de 0,1 à 90,7%. Seules deux populations sont des huiles riches en pulegone (42,9% et 90,7%), tandis que les autres ont une faible teneur en pulegone (35,6%). Ces derniers sont riches soit en menthone / isomenthone, soit en pipéritone / pipériténone ou en pipéritone (jusqu'à 97,2% de l'huile totale) (Kokkini et al., 2002).

3.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* a identifié vingt-neuf constituants avec un total de 98,08%. Le Linalool (39, 58%), eugenol (16,23%), terpinen-4-ol (8,60%) et l'eucalyptol (7,03) sont définis comme composés majoritaires de cette huile essentielle (Tableau 10).

Le profil chimique de l'huile d'*Ocimum basilicum* a montré la présence des composés minoritaires représentés essentiellement par des sesquiterpènes, β -elemene (7,05%), germacrene-D (2,21%), α -guaïene (1,95%), epi- α -cadinol (1,74%), γ -muurolene (1,58%) et E-caryophyllene Cis (1,34%). Les autres composés sont présents avec des teneurs relativement faibles à savoir le cis- α -bergamotene (1,01%), le γ -terpinene (0,78%), le spathulenol (0,77%), le borneol (0,98%), le γ -terpinene (0,78%) et le limonene (0,33 %).

D'après Telci et al. (2006), quatre chémotypes de basilic ont été identifiés :

- Le chémotype européen ayant le linalol comme composant principal (Italie, France, Bulgarie, Egypte et Afrique du Sud).
- Le chémotype tropicale, riche en cinnamate de méthyle (Inde, Pakistan et Guatemala).
- Le chémotype de la Réunion possédant le méthyl chavicol comme constituant majoritaire (Madagascar, Thaïlande, et Vietnam) (Vernin et Metzger, 1984; Simon et al., 1999).

- Le chémotype eugénol d'Afrique du Nord et de la Russie (Vernin et Metzger, 1984).

Hadj Kelifa et *al.* (2012) ont également identifié

Le linalol est identifié comme composant principal avec un taux de 32,83% suivi d'acétate de linalyle 16%) dans l'huile essentielle du basilic cultivé dans la région de Khemis Miliana. Ces résultats sont identiques à ceux retrouvés par Brada et *al.* (2011) sur l'huile essentielle du basilic de la région de Chlef (Algérie). L'analyse chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*, de la région d'El Kala (Algérie) a fait ressortir 34 constituants, ce qui correspond à 98,71% du total d'huile de la plante. Elle est constituée majoritairement de monoterpènes dont β -linalol (22,43%), β -myrcène (12,48%), α -terpinéol acétate (10,82%), linalol acétate (9,49%), myrcenol (9,18 %) et 1,8-cinéole sont les principaux composants (Ouibrahim, 2015).

Les monoterpènes oxygénés constituent le groupe chimique majoritaire dans l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*, suivi d'hydrocarbures monoterpènes et d'autres classes chimiques.

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et *al.*, 2002; Gonny et *al.*, 2004; Burt, 2004; Boti et *al.*, 2006, Oussou et *al.*, 2009).

Tableau 10: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* par CG/SM.

N°	Composés	(%)	Indice de rétention
1	Limonene	0,33	1037
2	γ -Terpinene	0,78	1061
3	Terpinolene	0,14	1079
4	Eucalyptol	7,03	1015
5	α -Copaene	0,18	1377
6	N-Octyl Acetate	0,31	612
7	Cis- α -Bergamotene	1,01	1410
8	Linalool	39,58	1100
9	β -Elemene	7,05	1388
10	β - Caryophyllene	1,34	1421
11	Cis-Sabinene Hydrate	0,27	1056
12	β -longipinene	0,16	1405
13	α -Guaiene	1,95	1468
14	Terpinen-4-Ol	8,60	1178
15	γ -Muurolene	1,58	1473
16	Germacrene-D	2,21	1476
17	Camphor	1,42	1148
18	3-Cyclohexane	3,28	670
19	Borneol	0,98	1153
20	Cis-Calamene	0,09	1509
21	Z- Nerolidol	0,17	1524
23	Cubenol	0,31	1620
24	α -Gurjunene	0,31	1405
25	Epi- α -cadinol	1,74	1626
26	Spathulenol	0,77	1566
27	Carvacrol	0,12	1282
28	Eugenol	16,23	1355
	Total	98,08	/

4. Isolement et identification des bactéries pathogènes

4.1. Isolement et identification de *S. typhi*, *E. coli*, *C. freundii*, *Proteus mirabilis* et *B. cereus*

4.1.1. Examens bactériologiques

L'ensemencement sur gélose SS montre après 24 heures d'incubation à 37°C, des colonies incolores à centre noir de taille moyenne (2 à 3mm de diamètre) suspectées d'être *Salmonella*. Sur milieu EMB, les colonies apparaissent plates, sèches, violettes suspectées d'être *E. Coli*, ces caractéristiques ont été définies par Guiraud (1998).

Sur la gélose nutritive, les colonies apparaissent lisses, légèrement convexes à contour régulier correspondant au genre *Citrobacter*. Sur gélose Hektoen, *Proteus mirabilis* donne des colonies incolores de taille moyenne. Les mêmes observations ont été faites par Euzéby (2000). Sur la gélose nutritive, la majorité des colonies de *B. cereus* apparaissent blanches de forme ronde, lisse et humide, ce qui a été constaté par Guiraud (1998).

Des examens microscopiques ont été faits pour déterminer la forme de chaque bactérie. Pour *S. typhi*, nous avons observé de petits bâtonnets à Gram négatif. *E. coli* apparaît sous forme de bâtonnets courts à gram négatif. Le genre *citrobacter* apparaît sous forme de bacilles droits à Gram négatif, isolés ou groupés en paires. *Proteus mirabilis* forme des bacilles à Gram négatif et colorés en rose. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Euzéby (2000) et Guechi (2002). *B. cereus* apparaît sous forme bacillaire à Gram positif aux extrémités arrondies et souvent disposés en paires ou en chainettes. Ces observations ont été confirmées par Guiraud (1998).

4.1.2. Détermination des caractères biochimiques

Les résultats du tableau 11 montrent les caractères biochimiques recherchés pour : *S. typhi*, *E. coli*, *C. freundii*, *Proteus mirabilis* et *B. cereus* après 24 heures d'incubation à 37°C.

S.typhi possède une lysine décarboxylase, produit du gaz H₂S pendant la dégradation du sodium thiosulfate. Les sucres qui peuvent être fermentés par cette bactérie sont : D-glucose, D-

sorbitol et D-melibiose. Les résultats sont négatifs pour tous les autres tests, ce qui a été constaté par Bourgeois et *al.* (1996) et *sutra et al.* (1998).

E.coli est caractérisée par la présence d'une β -galactosidase, une lysine décarboxylase et une ornithine décarboxylase et par la production d'indole, elle fermente la plupart des sucres, elle ne possède pas la citratase, l'uréase et l'arginine dihydrolase. Ces caractères ont été démontrés par Larpent (1989).

C. freundii est une bactérie mobile, produit du H₂S et fermente la plupart des sucres : D-glucose, L-rhamnose, D-saccharose, D-melibiose, et L-arabinose. Elle possède une β -galactosidase et une Citratase, ces résultats sont conformes à ceux trouvés par Euzéby, (2000).

Les *Proteus* sont des bacilles très mobiles, ONPG-négative, TDA-positive, oxydase négatif, produisent H₂S et fermentent le glucose, ces observations ont été confirmés par celles décrites par Bourgeois et *al.* (1996). *B. cereus* est caractérisé par la présence d'une catalase ONPG-négative, TDA-positive, oxydase négatif et ne produisant pas H₂S.

Tableau 11: Identification des bactéries pathogènes par galerie API20E.

Souches Tests	<i>S.typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>B. cereus</i>
ONPG	-	+	+	-	-
ADH	-	-	-	-	+
LCD	+	+	-	-	-
OCD	-	+	-	+	-
CIT	-	-	+	-	-
H ₂ S	+	-	+	+	-
URE	-	-	-	+	-
TDA	-	-	-	+	+
IND	-	+	-	+	-
VP	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	+
GLU	+	+	+	+	-
MAN	+	+	+	-	-
INO	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	-
RHA	-	+	+	-	-
SAC	-	+	+	+	-
MEL	+	+	+	+	-
AMY	-	-	+	-	-
ARA	-	+	+	-	-

+: Réaction positive -: Réaction négative

4.2. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*

4.2.1. Examens bactériologiques

Sur le milieu de Chapman, les colonies de *S. aureus* s'entourent d'un halo jaune dû à l'attaque du mannitol d'après Marchal et *al.* (1987).

Les colonies de *C. perfringens* apparaissent grandes (3 à 5 mm de diamètre) entourées d'un précipité noir sur le milieu VF. D'après Marchal et *al.* (1987) et Bourgeois et *al.* (1996), toutes les colonies de *Clostridium* sont très nettement noires, leur taille varie selon l'espèce bactérienne, la réduction des sulfites génère le dégagement d'H₂S qui réagit avec les sels de fer pour former un précipité de sulfure de fer, noir, insoluble, qui se dépose autour des colonies.

L'examen microscopique de *C.perfringens* a permis d'observer de gros bacilles droits à bouts carrés se présentant seuls ou en paires dont la coloration de Gram est positive.

Les espèces de *S. aureus* sont des cocci à Gram positif se divisant en plusieurs plans en formant des amas irréguliers, ces caractéristiques ont été définies par Euzéby (2000) et Joly et Alain (2003).

4.2.2. Identification des caractères biochimiques

Le test de staphylocoagulase montre un résultat positif, une agglutination massive apparaissant en 15 secondes dans la suspension d'hématies sensibilisées, ce qui indique que les *Staphylocoques* testés appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

D'après Marchal et *al.* (1987), la recherche d'une coagulase libre est de toute première importance pour l'étude du genre *Staphylococcus*, sa mise en évidence permet, en effet, l'identification de l'espèce *S. aureus*.

La recherche de l'acétoïne ou la réaction de Voges-Proskauer (VP) confirme aussi la présence de *S. aureus* (Bourgeois et *al.*, 1996). Ce test a donné une réaction positive (coloration rouge cerise VP+).

Les tests étudiés pour l'identification de *C. perfringens* montrent que cette bactérie est strictement immobile (pas de trouble dans le milieu mannitol mobilité), réduit les nitrates en nitrites (apparition d'une coloration rouge) et fermente le lactose avec production d'acide entraînant le virage du milieu TSI au jaune. Ces trois caractères ont été étudiés par Bourgeois et *al.* (1996) pour identifier l'espèce *C. perfringens*.

4.3. Purification et identification d'*Helicobacter pylori*

4.3.1. Examens bactériologiques

L'examen des boîtes ensemencées a été fait après cinq jours d'incubation sous atmosphère micro-aérophile à 37 °C, de fines colonies, transparentes à grisâtres, luisantes, apparaissent sur milieu gélose chocolat (Annexe IV). L'examen microscopique d'une colonie a permis d'observer des bacilles de forme «U» et parfois «S» dont la coloration de Gram est négative. D'après les résultats de Sobhani et *al.* (1995), ces caractères correspondent à ceux d'*H. pylori*.

4.3.2. Test rapide à l'urée

La présence de la bactérie est indiquée par le changement de la couleur de l'urée-indole de l'orange au rose (Fig. 09). Les travaux de Cassel-Beraud et *al.* (1996) montrent que cette bactérie possède une activité uréasique très intense, cette propriété a été mise à profit pour un diagnostic rapide.



Figure 09: Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h.

D'après Sobhani et *al.* (1995), l'uréase produite par cette bactérie hydrolyse l'urée en ammoniac et en bicarbonates dans le but de neutraliser l'acidité de l'estomac, ce qui facilite son adhésion aux cellules du mucus.

4.3.3. Détermination des caractères biochimiques d'*H. pylori*

La lecture des résultats est faite après une incubation de la galerie classique pendant 24 heures à 37°C (Tableau 12).

Dans notre étude, le résultat du test de l'uréase est positif, d'après Cassel-Beraud et *al.* (1996), le virage de la couleur au rose indique la présence de l'enzyme «Uréase» et la production d'indole se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface, ceci après addition de 3 à 5 gouttes de réactifs de Kovacs dans le milieu Urée – indole. *H. pylori* possède de l'oxydase, la catalase, la citratase mais pas de β – galactosidase.

D'après Bourgeois et *al.* (1996), la fermentation du mannitol peut-être détectée par l'apparition d'une couleur jaune et la mobilité par le trouble du milieu, les bactéries immobiles persistent près de la piqûre centrale.

Le virage de la couleur des milieux LDC et ODC au rouge orangé indique la présence de la Lysine décarboxylase et de l'ornithine décarboxylase. *H. pylori* ne possède pas l'arginine décarboxylase et ne fermente pas les sucres, cette identification a été définie par Avril et *al.* (2000).

Tableau 12: Identification des caractères biochimiques d'*H. pylori*

Tests	Substrats	<i>H. pylori</i>
Uréase	Urée	+
Indole	L. tryptophane	+
Catalase	H ₂ O ₂	+
Oxydase	Cytochrome C	+
ONPG	2-Nitrophényl – β D galactopyranoside	-
LDC	Lysine	+
ODC	Ornithine	+
ADH	Arginine	-
Mannitol	D-mannitol	-
Mobilité		+
Citratase	Citrate	+
TSI	Glucose	-
	Saccharose	-
	Lactose	-
	H ₂ S ou gaz	-

+: Réaction positive -: Réaction négative

5. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

La méthode utilisée pour la réalisation de cette partie est celle de l'aromatogramme. Les résultats de la présente étude ont montré que les huiles essentielles utilisées possèdent une activité importante. Les zones d'inhibition sont claires et les bordures sont bien distinctes avec des diamètres variables selon l'huile essentielle utilisée et la bactérie pathogène testée. Pour les tests témoins, aucune inhibition n'a été observée avec toutes les bactéries pathogènes.

5.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles de *C. carvi*, *F. vulgare* et *E. caryophyllata*

Les diamètres des zones d'inhibition allant de $9,16 \pm 1,92$ à $33,00 \pm 1,87$ mm indiquent une bonne activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* et *Carum carvi* sur les souches bactériennes étudiées (*H.pylori*, *C.freundii*, *C.perfringens*, *P.mirabilis*, *B.cereus*, *E.coli*, *K.pneumoniae* et *S.aureus*).

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles extraites à partir des graines des plantes (*Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* et *Carum carvi*) vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation à 37°C.

	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Diamètres des zones d'inhibition (mm)</i>							
<i>Eugenia caryophyllata</i>	13,83± 1,42	14,3± 2,05	15,16± 1,02	17,00± 2,54	30,00± 2,12	22,33± 2,24	18,00± 2,04	24,16± 2,75
<i>Foeniculum vulgare</i>	16,83 ± 1,42	12,1± 2,68	19,83± 2,09	9,16± 1,92	20,16± 0,8	9,33± 1,10	11,16± 1,01	10,83± 1.08
<i>Carum carvi</i>	12,66 ± 2,11	20,3 ± 0,65	15,33± 0,99	10,16± 1,83	30,50± 0,40	33,00± 1,87	17,83± 2,09	25,66± 1,18

5.1.1. Effet de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* sur les bactéries pathogènes

L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* a montré une forte activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes, cela peut être liée à sa teneur élevée en eugénol (65,22%).

Notant que les meilleures zones d'inhibition ont été constatées avec l'huile essentielle de d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis *C. freundii* (Fig.10) et *S. aureus* (Fig.11) dont les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement $30,00 \pm 2,12$ et $24,16 \pm 2,75$ mm, ceci nous permet de déduire que ces deux souches présentent une grande sensibilité envers l'huile de clou de girofle.

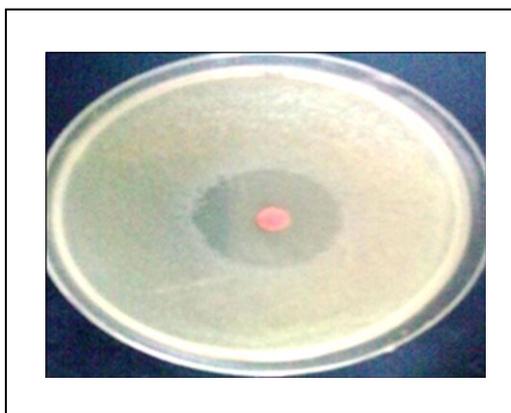


Figure 10 : Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis de *C. freundii*

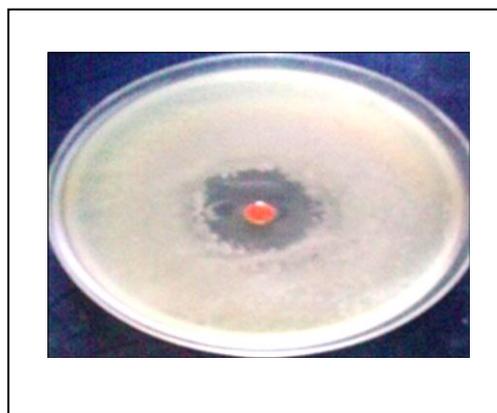


Figure 11 : Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis de *S. aureus*

Des résultats similaires ont été enregistrés par Dudai et *al.* (2006). En testant l'huile essentielle d'*E. caryophyllata* contre *S. aureus*, *Ps. Aeruginosa* et *E. coli*, ces auteurs ont indiqué une importante activité de l'huile de clou de girofle contre *S. aureus* (24,00 mm) et *E. coli* (30,00 mm). Dans le même contexte, Teuscher et *al.* (2005) ont rapporté la sensibilité de *S. aureus* aux différents composés chimiques de cette H. E. Ils ont déduit que l'eugénol et les composés terpéniques sont les responsables de l'effet inhibiteur puissant de l'huile de clou de girofle.

D'après El Karkouri et *al.* (2021), chaque huile essentielle a une composition différente et possède ainsi un composé majoritaire qui est le principe actif, c'est ce dernier qui agit au niveau des parois cellulaires des bactéries. L'eugénol est responsable des activités fongicides et

bactéricides de l'huile essentielle d'*E. caryophyllata* qui en contient, où il exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches.

Selon Ghedira et al. (2010), l'eugénol provoque des fuites d'ions de potassium sur *S. aureus*. Les travaux réalisés par Hoque et al. (2008) ont révélé un diamètre de zone d'inhibition de 14,2 mm contre *S.aureus*, étant différent de nos résultats, ceci est dû aux plusieurs paramètres comme le type de procédé d'extraction utilisé, les conditions opératoires et le chémotype de la plante.

L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* a montré des zones d'inhibition très importantes vis à vis de *B. cereus* ($22.33 \pm 2,24$ mm) (Fig.12) et *C. perfringens* ($18.00 \pm 2,04$ mm) (Fig.13).

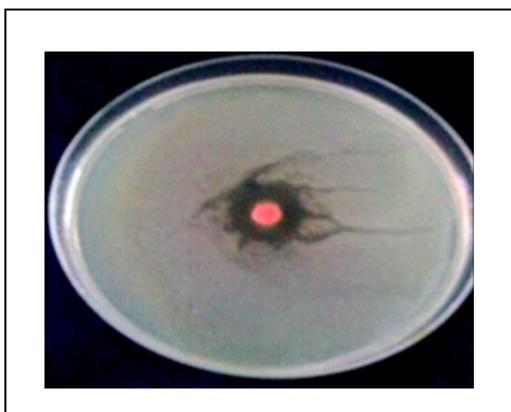


Figure 12 : Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis de *B. cereus*.

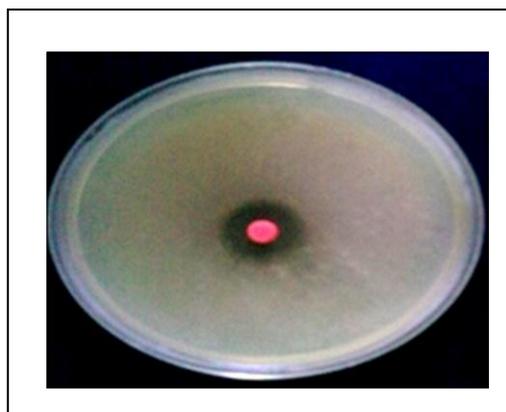


Figure 13 : Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis de *C. perfringens*.

Les résultats obtenus *in vitro* par Iserin (2001), suggèrent que l'eugénol (phénol) est le composant majeur en quantité comme en qualité d'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*, il possède de plus des propriétés anesthésiques et antiseptiques.

Plusieurs études ont montré que l'eugénol attaque la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme. Son effet sur ces trois sites dépend de la concentration appliquée : à de faibles concentrations, il produit des effets réversibles, alors qu'à des concentrations élevées, il provoque la mort cellulaire par coagulation générale (Zhiri, 2006).

Selon Rhayour (2002), les cellules de *B. cereus* en contact de l'H.E. de clou de girofle apparaissent enflées et déformées à cause de la libération des acides nucléiques révélés par électrophorèse.

Des diamètres moins importants sont observés avec l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis *Salmonella typhi* ($17,00 \pm 2,54$ mm) (Fig.14) et *E. coli* ($14,3 \pm 2,05$ mm) (Fig.15).

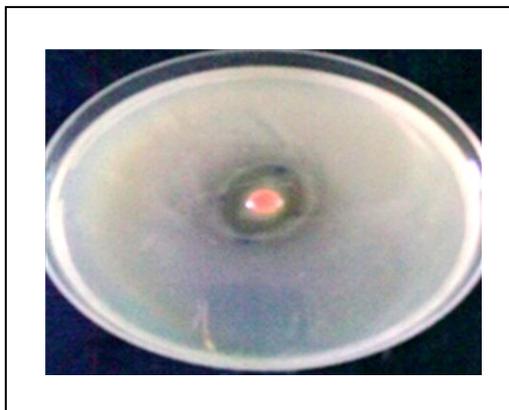


Figure 14: Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis de *Salmonella typhi*.



Figure 15: Effet de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis d'*E. coli*.

Selon Yadav et al. (2013), l'effet bactéricide de l'H.E. d'*Eugenia caryophyllata* conduit à une perte de constituants cellulaires par la lyse de cellules bactériennes, ceci débute par une fixation sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité.

L'activité antibactérienne de l'huile de clou de girofle s'est exprimée avec une zone d'inhibition moins importante (13,83 mm) vis-à-vis d'*H. pylori*.

5.1.2. Effet de l'huile essentielle de *Carum carvi* sur les bactéries pathogènes

L'effet de l'huile essentielle de carvi vis-à-vis d'*E. coli*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *B. cereus* et *S. aureus* est plus important que celui de l'huile de clou de girofle. En revanche *H. pylori* a révélé une sensibilité moins importante (12,66 mm) à l'huile de *Carum carvi* par rapport à l'huile d'*Eugenia caryophyllata*.

Une excellente activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Carum carvi* est observée vis-à-vis de *B. cereus* (Fig. 16) et *C. freundii* (Fig.17) dont les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement de $33,00 \pm 1,87$ et $30,50 \pm 0,40$ mm.

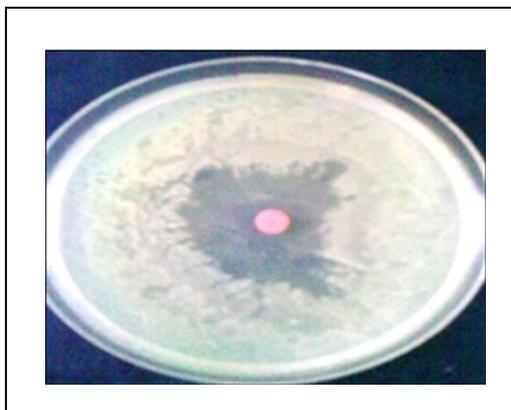


Figure 16: Effet de l'H.E de *Carum carvi* vis-à-vis de *Bacillus cereus*.

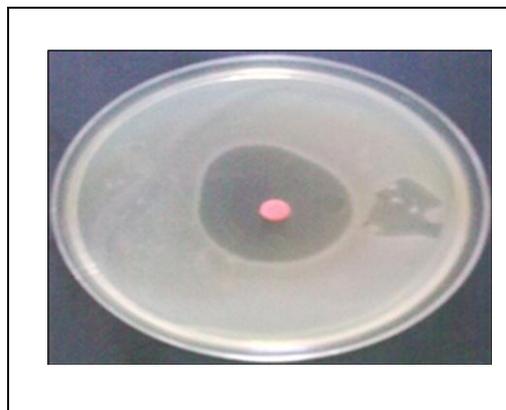


Figure 17: Effet de l'H.E de *Carum carvi* vis-à-vis de *Citrobacter freundii*.

Selon Sinic et *al.* (2008), l'huile essentielle de *Carum carvi* a un large spectre antibactérien vis-à-vis des bactéries pathogènes. Le composant majoritaire de l'huile essentielle de *Carum carvi* est le carvone (cétone) ayant une activité anti-infectieuse et qui est responsable de l'activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries pathogènes. Le carvone a été défini comme le composant principal (63,92%) de l'huile essentielle étudiée.

Selon les tests effectués par Hernandez-Ochoa (2005), la présence du carvone et du limonène dans l'huile essentielle du carvi est responsable de son excellent pouvoir inhibiteur. Ces constituants possèdent des effets calmants, antifongiques, antiviraux et antiseptiques.

Les grandes zones d'inhibition sont constatées avec l'huile essentielle de *Carum carvi* vis-à-vis de *S.aureus* ($25,66 \pm 1,18$ mm) (Fig.18), *E. coli* ($20,33 \pm 0,65$ mm) (Fig.19) et vis-à-vis de *C. perfringens* ($17,83 \pm 2,09$)(Tableau 13).

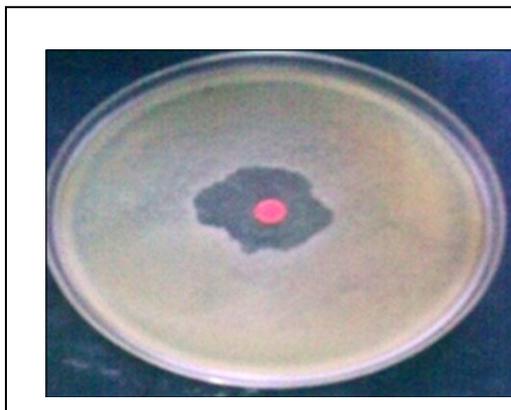


Figure 18 : Effet de l'H.E de *Carum carvi* vis-à-vis de *S. aureus*.

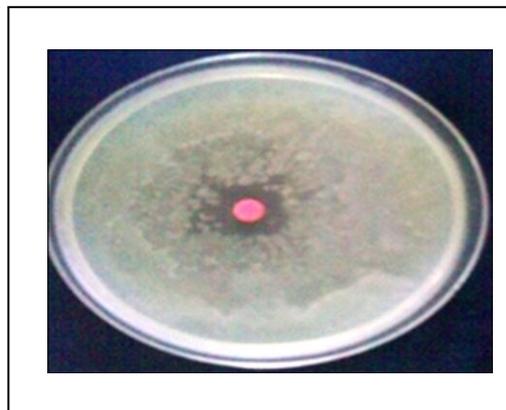


Figure 19 : Effet de l'H.E de *Carum carvi* vis-à-vis d'*E. coli*.

Toutefois, une activité inhibitrice moins importante est observée avec les souches de *P. mirabilis* et *S. typhi* dont les moyennes de diamètres des zones d'inhibition sont de $15,33 \pm 0,99$ et $10,16 \pm 1,83$ mm respectivement (Tableau 13).

Les travaux réalisés par Dispasqua et *al.* (2005) montrent un effet bactérien remarquable de l'huile essentielle de *Carum carvi* sur *E. coli* et *S. aureus*. Ceci marque le large spectre antibactérien de l'huile de carvi contre ces souches pathogènes.

Begum et *al.* (2008) ont rapporté que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les huiles essentielles de quelques espèces de graines testées. En effet l'huile essentielle de *C. carvi* (10 μ l/ disque) a montré une zone d'inhibition de 38 mm. Ils suggèrent que les propriétés détoxifiante, hépatique et antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes sont acquises grâce aux principaux composants de cette huile essentielle qui sont le carvone, le limonène et le β -caryophyllène. Ces composés ont été identifiés dans l'échantillon d'huile essentielle étudiée.

D'après les études effectuées par Langenhoven (2006), grâce auxquels il a pu déduire les composés responsables d'inhibition chez les huiles essentielles de *C. carvi*, le limonène (sesquiterpène) agit sur les enzymes impliquées dans la respiration et modifie de ce fait la perméabilité membranaire par action directe sur les phospholipides membranaires des bactéries pathogènes et à des fortes concentrations, ils provoquent une perte totale de l'homéostasie, ce qui entraîne la destruction des membranes cellulaires.

5.1.3. Effet de l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* sur les bactéries pathogènes

L'inhibition par l'huile de fenouil est constatée avec toutes les souches mais elle était moins importante par rapport à celle observée avec les huiles essentielles de clou de girofle et de carvi.

Les meilleures activités inhibitrices sont enregistrées avec l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* sur *Citrobacter freundii* (Fig. 20) et *Proteus mirabilis* (Fig. 21) dont les diamètres des zones d'inhibition sont de $20,16 \pm 0,8$ et $19,83 \pm 2,09$ mm respectivement.



Figure 20: Effet de l'H.E de *Foeniculum vulgare* vis-à-vis de *C. freundii*.

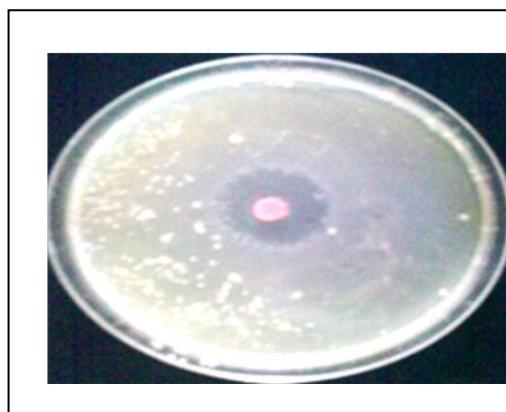


Figure 21: Effet de l'H.E de *Foeniculum vulgare* vis-à-vis de *P. mirabilis*.

H. pylori s'est montrée plus sensible à l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* par rapport aux deux autres huiles dont le diamètre de la zone d'inhibition était de $16,83 \pm 1,42$ mm. L'activité inhibitrice de l'huile essentielle de *F. vulgare* vis-à-vis de *E. coli* ($12,16 \pm 2,68$ mm) était moins importante que celle constatée avec l'huile essentielle de *E. caryophyllata* et de *C. carvi* (Tableau 13).

Des spectres antibactériens moins importants sont constatés avec l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* vis-à-vis de *C. perfringens* et de *S. aureus*, dont les diamètres de zones d'inhibition sont respectivement de $11,16 \pm 1,01$ et de $10,83 \pm 1,08$ mm (Tableau 13).

De faibles zones d'inhibition sont obtenues avec deux souches bactériennes qui sont résistantes à l'huile de fenouil par rapport aux deux autres huiles, il s'agit de *B. cereus* ($9,33 \pm 1,10$ mm) et *Salmonella typhi* ($9,16 \pm 1,92$ mm) (Tableau 13).

Les résultats obtenus par Richard (2005) suggèrent que l'inhibition des bactéries pathogènes par l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est obtenue grâce à l'anéthol (phénol) par son pouvoir bactéricide, et plusieurs auteurs ont montré que les composés phénoliques sont responsables de l'effet antimicrobien des essences. Gulfraz et *al.* (2008), trouvent que l'anéthol a un effet destructif sur le matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie. Selon Minakshi et *al.* (2002), l'anéthol provoque aussi des lésions irréversibles sur les membranes bactériennes.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'huile essentielle de clou de girofle a un effet inhibiteur plus élevé par rapport aux huiles essentielles de carvi et de fenouil.

Selon Iserin (2001), l'H.E de clou de girofle possède des activités antibactérienne puissante à large spectre, antivirale, antifongique, antiparasitaire, antiseptique, stimulante générale et neurotonique.

La puissance d'action des huiles essentielles varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié à la composition quantitative et qualitative en éléments chimiques. Mais cet effet reste assez complexe et difficile à étudier du point de vue moléculaire (Cox, 2000).

Des études réalisées par Kurita et *al.* (1979) rapportent que les phénols présents dans les huiles essentielles provoquent une forte diminution d'ATP dans la cellule bactérienne, une réduction du potentiel membranaire et du pH.

Selon nos résultats, nous avons observé des sensibilités variables des bactéries (Gram positif et Gram négatif) aux huiles essentielles étudiées.

D'après Kalemba et Kunicha (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend des propriétés de l'huile essentielle et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif. Plusieurs études testant l'activité

inhibitrice des huiles essentielles confirment ce phénomène (Poole, 2001; Cimanga et *al.*, 2002; Burt, 2004).

Selon Poole (2001), la grande résistance des bactéries à Gram négatif aux huiles essentielles est liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram positif. Quelques huiles essentielles semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif (Celikel et Kowas, 2008). Kim et *al.* (1995) rapportent que les modes d'actions des huiles essentielles sont expliqués par l'interférence avec la double couche lipidique de la membrane cellulaire, provoquant l'augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires. Les huiles essentielles altèrent ainsi les différents systèmes enzymatiques, dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure et détruisent le matériel génétique des bactéries.

5.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum*

D'après ces résultats, l'apparition des zones d'inhibition de diamètres allant de $12,00 \pm 0,26$ à $34,50 \pm 0,40$ mm traduit une excellente activité antibactérienne de la totalité des huiles essentielles sur les souches bactériennes étudiées (Tableau 14).

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles extraites des feuilles de plantes (*Mentha spicata*, *Mentha pulegium*, *Ocimum basilicum*) vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation à 37°C.

	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus</i>
Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
<i>Mentha spicata</i>	34,16± 0,30	28,0± 0,22	12,50± 0,11	33,00± 0,52	12,00± 0,34	14,00 ± 0,10	13,30± 0,20	22,50± 0,19
<i>Mentha pulegium</i>	34,50 ± 0,40	28,50 ± 0,29	16,30± 0,48	33,40± 0,00	12,50± 0,40	15,00± 0,18	12,70± 0,36	18,44± 0,20
<i>Ocimum basilicum</i>	32,00± 0,21	27,00 ± 0,00	13,30± 0,72	30,00± 0,57	24,00± 0,00	13,60± 0,09	12,00± 0,26	18,16± 0,32

5.2.1. Effet de l'huile essentielle des feuilles de *Mentha spicata* vis-à-vis les bactéries pathogènes

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha spicata* a exercé un effet inhibiteur important vis-à-vis des bactéries pathogènes étudiées (Tableau 14), cela peut être lié à sa composition chimique. L'huile extraite de *Mentha spicata* est riche en carvone (67,08%) et en limonène (14,34%).

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha spicata* a exercé une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de *H.pylori* (Fig. 22) et *S. typhi* (Fig. 23) dont les moyennes des diamètres des zones d'inhibition sont respectivement: 34,16± 0,30 et 33,00±0,52 mm.

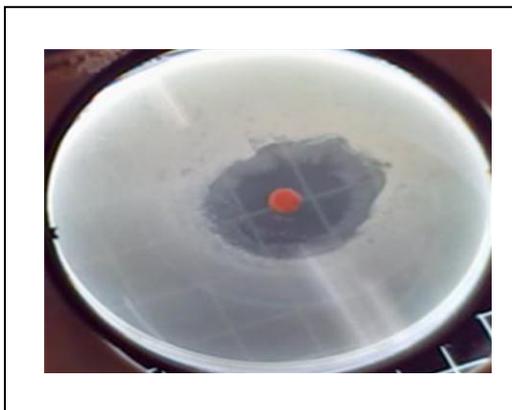


Figure 22: Effet de l'H.E. de *Mentha spicata* vis-à-vis d'*H.pylori*.

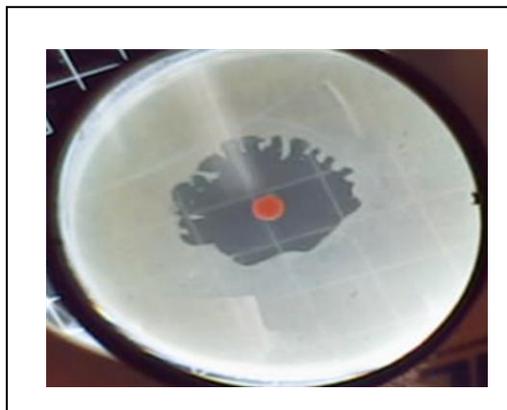


Figure 23: Effet de l'H.E. de *Mentha spicata* vis-à-vis de *S. typhi*.

Zaika (1988) et De Billerbeck (2002) ont confirmé que les huiles essentielles sont plus actives sur les bactéries Gram négatif que les bactéries Gram positif. Cette affirmation n'a cependant pas été confirmée par d'autres travaux. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000), ou dépend des huiles essentielles utilisées (Deans et Ritchie, 1987).

E.coli et *S. aureus* se sont montrées sensibles à l'huile de *Mentha spicata*, les diamètres des zones d'inhibition sont de $28,00 \pm 0,22$ (Fig.24) et $22,50 \pm 0,19$ mm respectivement (Tableau14).

Toutefois une inhibition moins importante est enregistrée avec les autres souches pathogènes : *B.cereus*, *C. perfringens*, *P. mirabilis* et *C. freundii* dont les diamètres sont respectivement : $14,00 \pm 0,10$, $13,30 \pm 0,20$, $12,50 \pm 0,11$ et $12,00 \pm 0,34$ mm (Tableau 14).

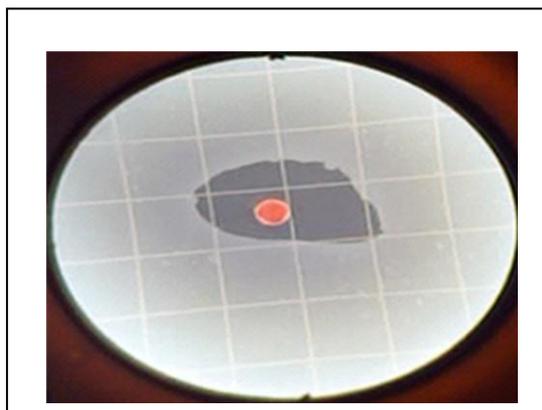


Figure 24: Effet de l'H.E. de *Mentha spicata* vis-à-vis d'*E. coli*.

L'étude de Hammer et *al.* (1999) a montré une activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de plusieurs plantes sur un large éventail de bactéries à Gram positif et Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* et *Serratia marcescens*). En particulier, les huiles essentielles de lemongrass et de menthe qui ont exercé un effet inhibiteur sur tous les organismes testés.

L'activité antibactérienne du thym et de menthe et de leurs principaux composants a été évaluée par Inouye et *al.* (2001). En effet, parmi les souches testées, *klebsiella pneumoniae* était la plus sensible aux huiles essentielles, suivie par *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*. Le *Staphylococcus aureus* y était moins sensible.

5.2.2. Effet de l'huile essentielle des feuilles de *Mentha pulegium* sur les bactéries pathogènes

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha pulegium* a exercé une activité antibactérienne très efficace. Les plus importantes moyennes des diamètres des zones d'inhibition sont enregistrées avec *H.pylori* (Fig.25), et *S.typhi* (Fig.26), dont les diamètres sont de $34,50 \pm 0,40$ et $33,40 \pm 0,00$ mm respectivement.

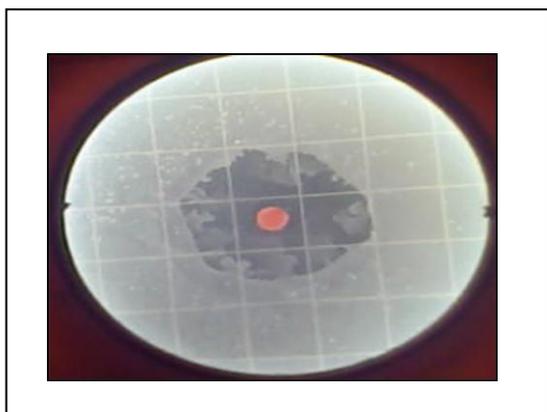


Figure 25: Effet de l'H.E. de *Mentha pulegium* vis-à-vis d'*H.pylori*.

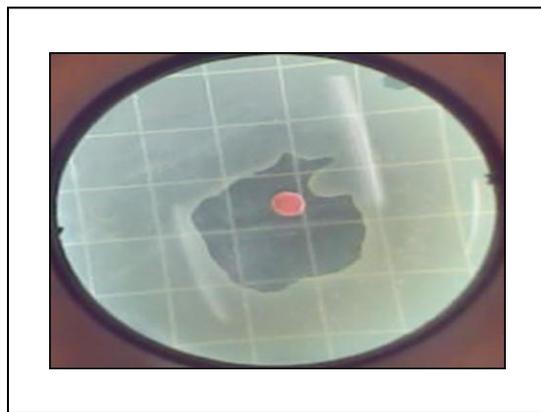


Figure 26: Effet de l'H.E. de *Mentha pulegium* vis-à-vis de *S.typhi*.

L'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites de *Mentha pulegium* est rapportée par de nombreux auteurs et sur divers souches bactériennes telles que: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* et *Escherichia coli* (Damien et al., 2003; Tripathi, 2004; Angioni et al., 2006; Teixeira et al., 2012).

Pour *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis* et *B. cereus*, des inhibitions importantes de l'huile essentielle des feuilles de *Mentha pulegium* sont enregistrées avec des diamètres de $28,50 \pm 0,29$ (Fig. 27), $18,44 \pm 0,20$ (Fig. 28), $16,30 \pm 0,48$ et de $15,00 \pm 0,18$ mm respectivement (Tableau 14).

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* peut être dû à sa richesse en piperitone (35,56%), en piperitenone (21,12%) et en α -terpineol (10,89%).

L'inhibition de *C. perfringens* et *C. freundii* par l'huile essentielle des feuilles de *Mentha pulegium* sont moins importantes, les diamètres enregistrés sont respectivement de $12,70 \pm 0,36$ et $12,50 \pm 0,40$ mm (Tableau 14).

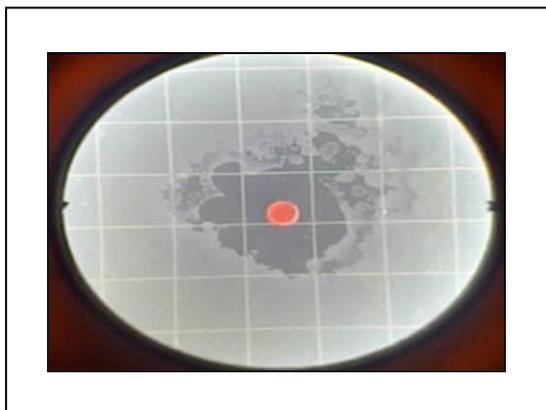


Figure 27: Effet de l'H.E de *Mentha pulegium* vis-à-vis d'*E. coli*.

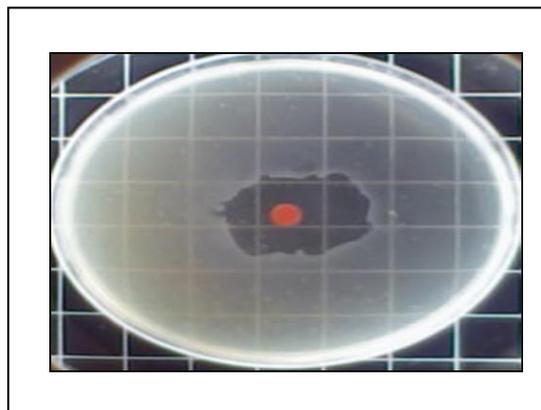


Figure 28 : Effet de l'H.E de *Mentha pulegium* vis-à-vis de *S.typhi*.

Selon Lorenzo et al. (2002), c'est la pulegone et le piperitenone qui dominent la composition des huiles essentielles de *Mentha pulegium*. Damien et al. (2003) et Tripathi (2004) ont montré que la richesse des huiles essentielles de *Mentha pulegium* en certains composants comme le pulegone peut être responsable de pouvoir inhibiteur. En effet, ce constituant a des effets biologiques très puissants. Il a des effets cardiovasculaires (activités sur les centres nerveux sympathiques : relaxant, stimulant, dépressant), ainsi que des propriétés antibactériennes et antifongiques.

Selon Kalemba et Kunicka (2003), les alcools terpénoides (comme le 1,8 cinéole) ont un effet contre les micro-organismes et agissent comme des agents dénaturant certaines protéines, ou des agents déshydratants. Ce qui démontre clairement les propriétés antibactériennes des huiles essentielles.

Kim et al. (2003) ont montré que les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols : thymol, menthol, carvacrol et l'eucalyptol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires.

5.2.3. Effet de l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* sur les bactéries pathogènes

L'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* a manifesté une activité antibactérienne très efficace. Les meilleures zones d'inhibition sont constatées avec *H. pylori* et *S. typhi*, les diamètres enregistrés étant respectivement : $32,00 \pm 0,21$ (Fig. 29) et $30,00 \pm 0,57$ mm (Fig. 30).

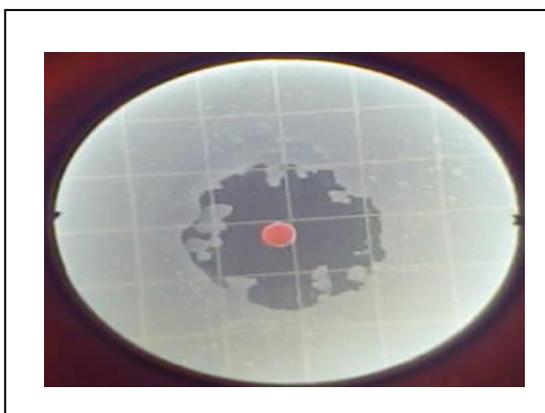


Figure 29: Effet de l'H.E d'*Ocimum basilicum* vis-à-vis d' *H.pylori*.

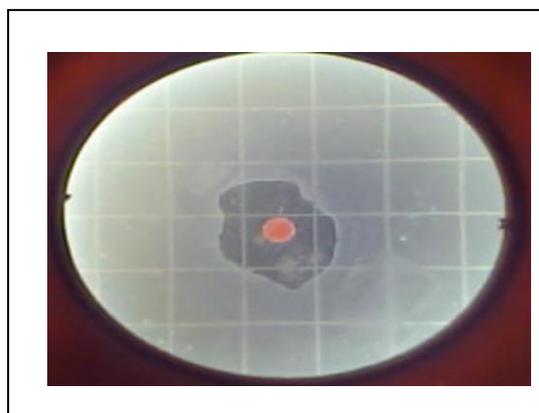


Figure 30: Effet de l'H.E d'*Ocimum basilicum* vis-à-vis de *S. typhi*.

E. coli et *C. freundii* se sont montrées sensibles à l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum*, les diamètres enregistrés sont respectivement : $27,0 \pm 0,00$ (Fig. 31) et $24,00 \pm 0,00$ mm (Fig. 32).

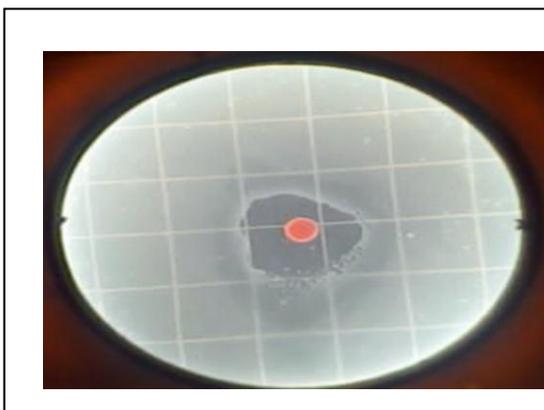


Figure 31: Effet de l'H.E d'*Ocimum basilicum* vis à vis d'*E. coli*.

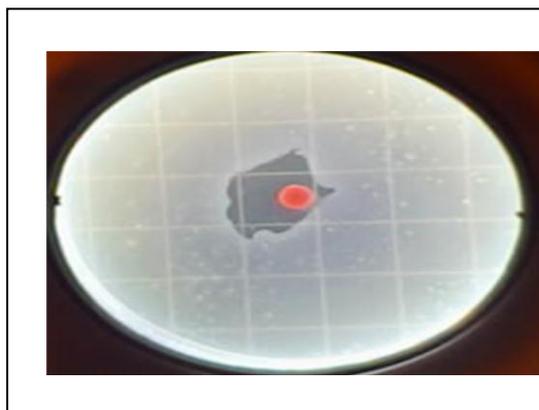


Figure 32: Effet de l'H.E d'*Ocimum basilicum* vis à vis de *C. Freundii*.

S. aureus, *B. cereus*, *P.mirabilis* et *C. perfringens* sont également inhibées par l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*, dont les zones d'inhibition sont de $18,16 \pm 0,32$, $13,60 \pm 0,72$, $13,30 \pm 0,72$ et de $12,00 \pm 0,26$ mm respectivement (Tableau 14).

L'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* a exercé un effet antibactérien plus important vis-à-vis de quelques espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus* (18,8 mm), *Klebsiella pneumonia* (16 mm), *Escherichia coli* (11,8 mm), *Enterobacter cloacae* (13,6 mm), *Citrobacter freundii* (8,4 mm) et *Acenitobacter baumannii* (11,7 mm) (Ouibrahim, 2015).

L'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum basilicum* contient une forte quantité de β -linalol suivi par α -terpinéol acétate, et de 1,8 cinéole. Ces composants sont à l'origine du pouvoir antibactérien de l'H.E du basilic. Plusieurs études ont démontré que le linalol est le composant responsable de l'activité antibactérienne (Sartoratotto et al., 2004; Koutsoudaki et al., 2005; Sokovic et al., 2006).

Plusieurs auteurs ont mentionné la forte activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*O.basilicum* contre les bactéries pathogènes (Suppakul et al., 2003; Lopez et al., 2005; Bozin et al., 2006; Sokovic et al., 2006). En revanche, d'autres travaux ont indiqué un potentiel antibactérien modéré à faible de l'H.E du basilic (Wannissorn et al., 2005; Di Pasqua et al., 2005; Shan et al., 2007; Runyoro et al., 2010), ce qui concorde avec les résultats de ce travail.

L'effet des composés mineurs n'est pas à négliger. En effet, les huiles essentielles entières ont une activité antimicrobienne supérieure à un mélange de composants majeures des mêmes huiles essentielles, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique (Wang et al., 2012).

Les propriétés des huiles essentielles varient en fonction de l'origine géographique (Chalchat et al., 1993; Elamrani et al., 2000), des facteurs environnementaux et agronomiques (Moghtader et al., 2009; Jordán et al., 2013), du stade de développement des plantes (Ruberto et Baratta, 2000) et de la méthode d'extraction des huiles essentielles (Hosni et al., 2013). Aussi, il a été démontré que dans la famille des lamiaceae, la durée de la journée et la luminosité augmentent la teneur en HE et la qualité des matières

actives (Moghaddam et *al.*, 2011) ce qui est valable pour les autres familles (Pintore et *al.*, 2002; Serrano et *al.*, 2002; Angioni et *al.*, 2004).

D'après Oussalah et *al.* (2007), l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les alcools terpénoïdes présents dans les huiles essentielles ont montré une activité contre les microorganismes testés et agissaient comme des agents dénaturant les protéines ou des agents déshydratants. Plusieurs essais démontrent clairement les propriétés antibactériennes des huiles essentielles, même si leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés (Dorman et *al.*, 2000).

Pattnaik et *al.* (2005) ont montré que le géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol sont les composés à large effet antibactérien.

6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice «CMI» et bactéricide «CMB»

La méthode de micro-dilution en milieu liquide est réalisée pour toutes les souches testées dont les diamètres des zones d'inhibition sont importants (>9 mm) (Yildirim et *al.*, 2001).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est alors la concentration de la première cupule ou on n'observe pas un trouble à l'œil nu et l'inoculation du contenu des cupules au-delà de CMI, sur milieu gélosé est nécessaire pour déterminer la nature de l'activité antimicrobienne (bactéricide ou bactériostatique) et déduire la CMB.

Pour la détermination de ces valeurs critiques une gamme de concentration allant de 0,048 jusqu'à 50 mg/ml a été préparée dans le bouillon Mueller Hinton à partir de la solution mère de chaque huile essentielle. Les valeurs de CMI sont variables selon le type d'huile essentielle et la souche visée. Les témoins préparés en parallèle ont présenté tous une croissance bactérienne ceci signifie que seule l'huile essentielle est

responsable de l'inhibition des espèces bactériennes pathogènes. En ce qui concerne le contrôle négatif (huile essentielle, DMSO et BMH) aucune croissance n'a été observée. Les résultats des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des différentes huiles essentielles sont représentés dans le tableau 15.

Chacune des huiles essentielles possède un pouvoir antibactérien remarquable. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient entre 0,19 et 25 mg/ml selon l'huile essentielle utilisée et la souche pathogène testée.

Le potentiel antimicrobien est attribué à l'effet des plusieurs molécules actives et particulièrement le carvacrol et le p-cymène présentes dans les différents extraits du *C. carvi* (Skrinjar et al., 2009).

Tableau 15: Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) des huiles essentielles en mg/ml et le rapport CMB/CMI.

		<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringe ns</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Eugenia caryophyllata</i>	CMI	6,25	1,56	3,12	1,56	0,39	0,78	1,56	0,78
	CMB	6,25	3,12	25	12,5	3,12	0,78	6,25	1,56
	CMB/ CMI	1	2	8	8	8	1	4	2
<i>Foeniculum vulgare</i>	CMI	1,56	1,56	3,12	6,25	3,12	25	12,5	12,5
	CMB	12,5	25	3,12	12,5	3,12	50	>50	>50
	CMB/ CMI	8	16	1	2	1	2	>4	>4
<i>Carum carvi</i>	CMI	6,25	0,78	3,12	12,5	0,39	0,19	0,78	0,39
	CMB	25	0,78	6,25	25	0,39	0,19	1,56	1,56
	CMB/ CMI	4	1	2	2	1	1	2	4
<i>Mentha spicata</i>	CMI	0,39	0,39	6,25	0,39	6,25	3,12	3,12	0,78
	CMB	0,39	0,78	6,25	1,56	25	3,12	6,25	0,78
	CMB/ CMI	1	2	1	4	4	1	2	1
<i>Mentha pulegium</i>	CMI	0,19	0,39	1,56	0,19	3,12	1,56	3,12	0,78
	CMB	0,39	0,78	6,25	0,19	6,25	1,56	3,12	3,12
	CMB/ CMI	2,05	2	4	1	2	1	1	4
<i>Ocimum basilicum</i>	CMI	0,19	0,39	6,25	0,19	0,39	6,25	12,5	3,12
	CMB	0,39	1,56	25	0,19	1,56	50	50	3,12
	CMB/ CMI	2,05	4	4	1	4	8	4	1

6.1. Détermination de CMI et CMB de l'H.E d'*Eugenia caryophyllata*

L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* a inhibé les souches bactériennes à des CMI allant de 0,78 mg/ml jusqu'à 6,25 mg/ml. Une sensibilité similaire est constatée avec *S. aureus* et *B.cereus* (CMI = 0,78 mg/ml) et *C. perfringens*, *S. typhi* et *E. coli* (1,56 mg/ml). *H. Pylori* était moins sensible à l'huile (CMI = 6,25 mg/ml). Nous avons constaté que les valeurs de CMB sont les mêmes que celles des CMI pour quelques souches et plus ou moins élevées pour les autres souches (Tableau 15).

Le rapport CMB/CMI donne une idée plus précise sur l'effet d'une substance antimicrobienne. En effet, si ce rapport est inférieure à 4, l'H.E est considérée comme bactéricide et s'il est supérieure à 4, l'huile essentielle est ainsi considérée comme bactériostatique.

Les rapports CMB/CMI indiquent des valeurs inférieures ou égales à 4 pour *H. Pylori*, *E.coli*, *B.cereus*, *C. perfringens* et *S. aureus* ce qui prouve que l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* exerce un effet bactéricide, par contre l'effet est bactériostatique sur les autres souches (CMB/CMI >4).

Des études ont démontré que les H.E de Clou de girofle sont fortement antibactériennes. Ce pouvoir pourrait être attribué à son composé majoritaire qui est "l'eugénol" (Valero et Giner, 2006).

Par ailleurs, l'étude de Rhayour (2002) a montré que H.E de girofle exerce une activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugénol appartenant à la famille des phénols. L'activité bactéricide des huiles essentielles débute par une fixation de ses molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité, conduisant à la perte de constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes.

6.2. Détermination de CMI et CMB de l'H.E de *Foeniculum vulgare*

L'huile de *Foeniculum vulgare* a marqué des CMI comprises entre 1,56 mg/ml et 25 mg/ml. Les souches les plus sensibles sont *H. Pylori* et *E.coli* (CMI = 1,56 mg/ml). *B.Cereus* s'est montrée résistante (CMI = 25 mg/ml). Les CMB varient de 3,12 mg/ml jusqu'aux valeurs supérieures à 50 mg/ml. Les rapports CMB/CMI donnent des valeurs inférieures à 4, pour *P. mirabilis*, *S. typhi*, *C.freundii* et *B.cereus* ce qui indique que l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* possède un effet bactéricide, par contre l'effet est bactériostatique avec les autres souches bactériennes (CMB/CMI >4) (Tableau 15).

La plus petite CMI de l'huile essentielle des graines de fenouil enregistrées par Bouguerra (2012), est celle constatée avec *E. coli* ATCC 25922 (20 000 µ/ml). C'est une valeur proche à celle trouvée avec notre huile testée. D'après les résultats trouvés par le même chercheur, le rapport CMB/CMI est compris entre 0.78 et 1.8 (inférieur à 4) conférant donc à cette huile un pouvoir bactéricide vis-à-vis des bactéries testées (Tableau 15).

L'extrait de la tige du fenouil montre une forte inhibition du *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* et *Cladosporium cladosporioides* avec des valeurs de CMI de 25, 250 et de 125 µg/mL respectivement. De plus, une activité inhibitrice élevée est présentée par l'huile essentielle de fenouil: les valeurs de CMI et de CMB sont de 1 et 2% contre *Esherichia coli*, et de 2 et 4% contre *Staphylococcus aureus*, respectivement (Taie et al., 2013; Singh et al., 2006).

Le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des graines du fenouil est dû à l'anéthol qui est le composant majeur (Dadalioglu et Evrendilek (2004). Ces résultats ont été confirmées par Ağaoğlu et al. (2007); Gulfraz et al. (2008) et Abdul Rahman et al. (2010). En revanche, des études démontrent que l'effet des composés mineurs n'est pas négligeable (Tantaoui-Elaraki, 1993; Hammer et al., 2003; Burt, 2004; Rasooli et al., 2008; Hussain et al., 2010).

L'activité antimicrobienne de toute huile essentielle est attribuée aux terpénoïdes et aux composés phénoliques (Cosentino *et al.*, 1999; Gulfraz *et al.*, 2008).

6.3. Détermination de CMI et CMB de l'H.E de *Carum carvi*

Toutes les souches se sont montrées sensibles à l'huile essentielle de *Carum carvi* (CMI comprises entre 0,19 mg/ml et 3,12 mg/ml) à l'exception de deux souches qui sont moins sensibles : *H. Pylori* (CMI = 6,25 mg/ml) et *S. typhi* (CMI = 12,5 mg/ml). Les concentrations minimales bactéricides (CMB) varient entre 0,19 mg/ml et 25 mg/ml. L'huile essentielle de *Carum carvi* possède un effet bactéricide sur toutes les souches pathogènes (CMB/CMI \leq 4) (Tableau 15).

Les huiles essentielles extraites des graines de *Carum carvi* possèdent une activité antibactérienne significative contre de nombreuses bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Xanthium brasilicum*). Elles montrent également une efficacité particulièrement élevée contre les espèces de *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Clavibacter* et *Ralstonia* (Iacobellis *et al.*, 2004).

Les CMI des H.E de carvi contre *E. coli* et *S. aureus* sont de 0,6 et 0,5%, respectivement, alors que les CMB sont de 0,8 et 0,6%, respectivement. L'extrait méthanolique de graines de carvi présente une activité anti-*H. pylori* avec une CMI moyenne de 100 µg/ml. La carvone, le limonène et le linalool sont responsables du pouvoir antibactérien de l'H.E de graines de *C. carvi*. (Damasius *et al.*, 2007).

6.4. Détermination de CMI et CMB de l'H.E de *Mentha spicata*

Un effet antibactérien élevé de l'H.E de *Mentha spicata* est observé avec *H.pylori*, *E.coli*, *S. typhi* et *S. aureus* avec des CMI ne dépassant pas 0,78 mg/ml. Pour les autres souches, des valeurs de CMI de 3,12 à 6,25 mg/ml sont enregistrées. Les CMB enregistrées varient de 0,39 à 25 mg/ml. Les rapports CMB/CMI sont équivalents à 4 pour *S. typhi* et *C.freundii* et inférieurs à 4 pour les autres souches, ce qui explique l'effet bactéricide de l'huile essentielle de *Mentha spicata* sur toutes les bactéries testées (Tableau 15).

Des résultats similaires ont été trouvés par Scherer et al. (2013), avec l'huile essentielle de *Mentha spicata* obtenue par hydrodistillation à partir des parties aériennes broyées à l'eau distillée d'un chémotype du Brésil. Elle est caractérisée par la présence dominante de carvone (67%). L'huile essentielle montre une activité importante contre les deux bactéries étudiées par la détermination de la CMI, mais le *Staphylococcus aureus* est le plus sensible dont la concentration finale de 0.67 mg/ml inhibe 100% de sa croissance. Pour *Escherichia coli*, la même concentration n'inhibe que 51.3% du développement.

Une étude réalisée par Hussain (2010), a montré que l'H.E de *Mentha spicata* cultivé en Pakistan est riche en carvone (59 à 63%). En effet, cette huile stoppe la croissance de *Staphylococcus aureus* à une concentration de 78 à 80 µg/ml et d'*Escherichia coli* à une concentration de 345 à 349 µg/ml. Ces résultats sont plus proches à ceux obtenus dans ce travail. L'ensemble des études montre que les menthes possèdent un réel potentiel antibactérien, ce qui explique l'usage traditionnel de l'H.E de *Mentha spicata* dans le traitement de maladies bactériennes.

6.5. Détermination de CMI et CMB de l'H.E de *Mentha pulegium*

Nos résultats montrent que les bactéries les plus résistantes à l'H.E de *Mentha pulegium* avec une CMI de 3,12 mg/ml sont *C. freundii* et *C. perfringens* tandis que les plus sensibles sont *H.pylori* et *S. typhi* avec une CMI de 0,19 mg/ml. *E. coli* et *S.aureus* sont inhibées respectivement à des CMI équivalentes de 0,39 et 0,78 mg/ml respectivement. Une CMI de 1,56 mg/ml a été enregistrée avec *P mirabilis* et *B.cereus*. Les valeurs de CMB sont faibles ce qui a permis d'obtenir des valeurs CMB/CMI inférieurs ou égales à 4, signifiant que l'effet de l'H.E de *Mentha pulegium* est bactéricide (Tableau 15).

L'huile de *Mentha pulegium* cultivé en Iran est riche en piperitone (38,0%), piperitenone (33.0%). Ces résultats confirment ainsi l'effet antibactérien de l'huile surtout avec les bactérie à Gram positif avec des zones d'inhibitions variant de 8 à 21 mm et une CMI allant de 0,25 à 4 µl/ml, et une forte résistance des bactéries à Gram négatif surtout *E.coli* (Mahboubi et Haghi, 2008).

L'H.E de *Mentha pulegium* cultivé en Portugal est riche en pulegone. Cette huile a montré aussi une bonne activité antibactérienne contre *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* et *Pseudomonas putida*, avec des CMI de 1,2 à 9,3 mg/ml. cette activité est due à la présence de pulegone, menthone et menthol (Teixeira *al.*, 2012). Ces résultats sont différents à ceux obtenus dans ce travail.

Bakkali et *al.* (2008) ont montré une cytotoxicité de l'H.E de *Mentha pulegium* se manifestant par des détériorations de la membrane bactérienne et la perturbation de la structure de leurs différentes couches de polysaccharides, acides gras et phospholipides.

6.6. Détermination de CMI et CMB de l'H.E d'*Ocimum basilicum*

Une excellente activité antibactérienne de l'H.E d'*Ocimum basilicum* est constatée avec une CMI de 0,19 $\mu\text{g/ml}$ vis-à-vis de *H. pylori* et *S. typhi*, et avec une CMI de 0,39 mg/ml vis-à-vis de *E.coli* et *C.freundii*. Les autres souches sont inhibées à des CMI allant de 3,12 à 6,25 mg/ml . Les valeurs de CMB sont faibles (0,19 à 1,56 mg/ml) et plus élevées pour *P. mirabilis* (25 mg/ml), *B. cereus* (50 mg/ml), *C. perfringens* (50 mg/ml) et *S. aureus* (3, 12 mg/ml). L'huile essentielle de d'*Ocimum basilicum* possède un effet bactéricide sur toutes les souches pathogènes (CMB/CMI \leq 4) à l'exception de *B.cereus* (CMB/CMI =8) (Tableau 15).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Ouibrahim et al. (2013). En effet, la CMI de l'huile essentielle d'*O. basilicum* cultivé dans le Nord-Est d'Algérie sur plusieurs souches microbiennes est de 4,95 mg/ml pour *E. faecalis* et de 9,5 mg/ml pour *Salmonella sp* et *E. coli*.

Hussain et al. (2008) ont révélé les CMI des huiles essentielles d'*O. basilicum* d'Iran vis-à-vis des souches microbiennes (*E. coli* et *S. aureus*). Ils ont enregistré des valeurs de 1,5 mg/ml pour *S. aureus* et de 2,1 mg/ml pour *E.coli*. De même, Runyoro et al. (2010) ont déterminé les CMI de l'huile essentielle de basilic sur plusieurs souches, notamment le *S. aureus* (12,5 mg/ml) et *E. coli* (4,25 mg/ml). Ces valeurs sont plus ou moins élevées par rapport à celles obtenues dans ce travail (Tableau 15).

L'activité antibactérienne des H.E d'*O. basilicum* est attribuée d'une part, aux composés majoritaires tels que les alcools terpéniques et autres hydrocarbures et phénols et d'autre part, à la synergie entre tous les constituants volatils (Burt, 2004; Lahlou, 2004; Zhiri et Baudoux, 2005). De plus, la variabilité du pouvoir bactéricide est due certainement à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques (Lawrence, 1993; Rasooli, 2005).

L'étude de l'effet antibactérien permet de déduire que les huiles essentielles de *Carum carvi*, de *Mentha spicata* et de *Mentha pulegium* possèdent un effet bactéricide vis-à-vis des germes pathogènes.

L'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* a un effet bactéricide sur *P. mirabilis*, *S. typhi*, *C.freundii* et *B.cereus*. L'H.E d'*Eugenia caryophyllata* a un pouvoir bactéricide vis-à-vis d'*H. Pylori*, *E.coli*, *B. cereus*, *C. perfringens* et de *S. aureus*.

7. Effet des antibiotiques sur les souches pathogènes

Le résultat de cette activité est exprimé en termes de diamètre de la zone d'inhibition qui traduit la sensibilité de la souche bactérienne testée contre les disques d'antibiotiques.

Le test antibiogramme effectué sur les souches bactériennes nous a montré plusieurs profils de résistance et de sensibilité entre les différentes souches testées avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 00,00 à 44,70±0,20 mm (Tableau 16).

Les bactéries testées se sont révélées extrêmement sensibles à la gentamicine avec des diamètres variés. Les plus importants sont enregistrés avec *C.perfringens* (32,20 ±0,10 mm), *E. coli* (28,20 ±0,00 mm) et *S. typhi* (28,00 ±1,00 mm). Les mêmes observations sont faites avec la kanamycine qui a exercé un effet inhibiteur sur *C.freundii* (30,10 ±1,00mm), *S. typhi* (30,00 ±0,00mm), *P.mirabilis* (33,20 ±0,00mm), *C.perfringen* (39,40 ±0,12mm), *B. cereus* (24,00 ±0,50mm) et *S.aureus* (22,00 ±0,00mm) (Tableau 16).

Tableau 16: Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques vis-à-vis des souches pathogènes après 24 h d'incubation à 37°C.

S. Pathogènes / Antibiotiques	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>H. pylori</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
	Diamètres des zones d'inhibition (mm)							
Vancomycine	–	–	18,50 ±0,10	29,80 ±0,11	34,60 ±0,20	–	–	–
Kanamycine	–	30,10 ±1,00	30,00 ±0,00	33,20 ±0,00	39,40 ±0,12	–	24,00 ±0,50	22,00 ±0,00
Gentamicine	28,20 ±0,00	20,60±0,50	28,00 ±1,00	26,10 ±1,00	32,20±0,10	–	25,20 ±0,30	24,00±0,00
Chloramphenicol	–	00,00 ±00	00,00 ±00	–	–	–	00,00±00	–
Céfadroxil	–	–	–	–	–	–	–	0,00±0,00
Rifampicine	–	12,00 ±0,00	20,00 ±0,00	11,00 ±0,00	0,00 ±0,00	–	–	00.00± 0,00
Ertapénème	20,00 ±0,20	–	–	–	–	–	–	– –
Imipénème	25,00 ±0,10	–	–	–	–	–	–	–
Ticarcilline	17,10 ±0,50	–	–	17,00 ±0,00	–	–	–	–
Amox + acide clavulanique	00,00 ±0,00	–	–	–	–	–	–	–
Tobramycine	–	32,00±0,00	–	–	27,50 ±0,50	–	–	17.00±0,00
Métronidazole	–	–	–	–	–	32,40 ±0,30	–	–
Clarithromycine	–	–	–	–	–	12,50 ±0,11	–	–
Amoxicilline	–	20,40 ±0,00	–	22,70 ±0,10	16,10 ±1,00	44,70 ±0,20	–	–
Tétracycline	–	–	–	–	–	0,00±0,00	–	–
Erythromycine	–	–	18,10 ±1,00	–	–	20,00±0,10	–	12,00 ±0,10
Ciprofloxacine	–	–	–	–	–	0,00 ±0,00	–	–

Des diamètres élevés sont trouvés avec *C.perfringens* ($34,60 \pm 0,20$ mm), *P.mirabilis* ($29,80 \pm 0,11$ mm) et *S. typhi* ($18,50 \pm 0,10$ mm) testées par la vancomycine. *B. cereus* et *S.aureus* se sont montrées résistantes aux chloramphenicol, céfadroxil et rifampicine. Aucun effet n'a été observé avec l'association de l'amoxicilline et d'acide clavulanique vis-à-vis d'*E. coli* et avec la kanamycine et la rifampicine vis-à-vis de *C.perfringens* et *S. typhi*. *C.freundii* et *C.perfringens* sont extrêmement sensibles à la tobramycine. Les mêmes observations sont faites avec l'amoxicilline vis-à-vis de *C.freundii* ($20,40 \pm 0,00$ mm) et de *P.mirabilis* ($22,70 \pm 0,10$ mm). *H.pylori* a été testée par six antibiotiques, l'effet le plus important a été trouvé avec l'amoxicilline ($44,70 \pm 0,20$ mm), le métronidazole ($32,40 \pm 0,30$ mm) et l'érythromycine ($20,00 \pm 0,10$ mm), par contre un effet moins important a été enregistré avec la clarithromycine ($12,50 \pm 0,11$ mm). Aucun effet n'a été trouvé avec la tétracycline et la ciprofloxacine (Tableau 16).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir des graines vis-à-vis les bactéries testées est moins importante comparativement à quelques antibiotiques. En revanche, l'effet antibactérien des H.E extraites à partir des feuilles est presque similaire à celle des antibiotiques. Parmi les souches étudiées, six sont nettement résistantes à quelques antibiotiques, mais aucune souche testée ne présente de résistance aux huiles essentielles extraites.

Conclusion

Conclusion

La présente étude entre dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques et médicinales. Dans une première partie de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation. La détermination des rendements en huiles essentielles a montré une rentabilité de $4,2 \pm 0,02$ % avec *Carum carvi*, $0,6 \pm 0,06$ % avec *Foeniculum vulgare* et de $1,3 \pm 0,04$ % avec l'espèce *Eugenia caryophyllata*. Des rendements respectifs de $2,08 \pm 0,00$, $1,7 \pm 0,048$ et de $0,85 \pm 0,05$ % ont été trouvés respectivement avec les huiles essentielles extraites à partir des feuilles de *Mentha pulegium*, *Mentha spicata* et *Ocimum basilicum*.

D'après les résultats obtenus les valeurs de densité, d'indice de réfraction et de pouvoir rotatoire des huiles essentielles sont conformes aux normes.

Les résultats de l'analyse chimique de la composition des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) indiquent :

- Une abondance de composés monoterpéniques dominée par la présence de trans-anéthol (43,01%), l'estragole (27,04%) et le fenchone (06,63%) pour l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare*.
- L'huile essentielle de *Carum carvi* est caractérisée par la présence de composés monoterpènes comme le carvone (63,92%), l' α -pinène (8,43%) et le limonène (4,81%).
- L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* est dominée par l'eugénol (65,22%), l'acétate d'Eugényle (18,77%) et le trans-caryophyllène (9,92%).
- l'huile de *Mentha spicata* est caractérisée par la présence de deux composés majoritaires : Le carvone (67,08%) et le limonène (14,34%).
- Les constituants quantitativement les plus importants de l'huile essentielle isolée de *Mentha pulegium* sont des monoterpènes comme le piperitone (35, 56%), le piperitenone (21, 12%) et le α -terpineol (10, 89%).

- Linalool (39, 58%), eugenol (16,23%), terpinen-4-O (1 8,60%) et l'eucalyptol (7,03%) ont été définis comme les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum*.

Une forte activité inhibitrice de l'huile essentielle des graines de *Carum carvi* est observée vis-à-vis de *B. cereus* (33,00±1,87mm) et *C. freundii* (30,50±0,40 mm), cela peut être dû à sa composition en carvone, α -pinène et limonène.

L'huile essentielle des feuilles de *Mentha pulegium* a exercé une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de *H.pylori* (34,50± 0,40 mm) et *S.typhi* (33,40±0,00 mm). Cette activité pourrait être expliquée par la présence des composés bioactifs comme le le piperitone, le piperitenone et le α -terpineol.

Les huiles essentielles étudiées ont présenté un effet inhibiteur avec des valeurs de CMI allant de 0,19 à 25 mg/ml vis-à-vis de toutes les souches bactériennes. Les valeurs de CMB sont les mêmes que celles des CMI pour quelques souches et plus ou moins élevées pour les autres souches.

H.pylori, *C.perfringens*, *E.coli* et *S. typhi* ont été inhibées par les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et *Foeniculum vulgare* à une concentration de 1,56 mg/ml, tandis qu'une concentration de 0,78 mg/ml des huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* est suffisante pour inhiber *S.aureus*. Une faible concentration de 0,19 mg/ml des huiles essentielles de *Carum carvi*, *Mentha pulegium* et *Ocimum basilicum* est nécessaire pour inhiber la croissance d'*H.pylori*, *S. typhi* et *B. cereus*.

Un effet bactéricide est observé avec l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* vis-à-vis d'*H. Pylori*, *E.coli*, *B.cereus*, *C. perfringens* et *S. aureus*. De même, l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* possède un effet bactéricide vis-à-vis de *P. mirabilis*, *S. typhi*, *C.freundii* et *B.cereus*, par contre l'effet est bactériostatique avec les autres souches (CMB/CMI >4).

Les huiles essentielles de *Carum carvi*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* ont exercé un effet bactéricide sur toutes les souches pathogènes.

Parmi les souches étudiées, *E. coli*, *S. typhi*, *C.perfringens*, *H.pylori*, *B. cereus* et *S.aureus* se sont montrées résistantes à quelques antibiotiques mais aucune souche testée ne présente de résistance aux huiles essentielles extraites.

Enfin, l'ensemble de ces résultats *in vitro* montre que les huiles essentielles des espèces étudiées renferment des substances ayant un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des bactéries responsables de maladies gastro-intestinales et sont capables d'exercer un effet équivalent à celui des antibiotiques.

En perspectives, il serait intéressant de:

- Séparer les composés bioactifs et étudier leurs mécanismes d'action séparément.
- Réaliser une étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles *in vivo*.
- Extraire systématiquement l'hydrolat et analyser sa composition et son potentiel antibactérien.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abayomi S. (2010).** Les plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed. Karthala, Paris, 22p.
- Abd El Basset M. (2004).** Medicinal herbal guide. Ed: Alfa, Egypte. 321p.
- Abdul Rahman M S, Thangaraj S, Salique SM, Khan KF et Natheer SE. (2010).** Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. *Internet Journal of Food Safety*, 12: 71-75.
- Abrassart JL. (1997).** Aromathérapie essentielle : huiles essentielles; parfums pour le corps et l'âme. Editions Guy trédaniel, 271p.
- Acar J et Rostel B. (2001).** Antimicrobial resistance: anie overview. *Revue Scientifique et Technique*, 20(3) :797-810.
- Adeola SA, Folorunso OS et Amisu KO. (2012).** Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. *Research Journal of Biology*, 2(05): 138-144.
- AFNOR (1989).** « Huiles essentielles ». 3^{ème} édition : recueil des normes françaises .Paris, France.
- AFNOR (1992).** Les huiles essentielles" 4^{ème} recueil de normes françaises, Paris, France.
- AFNOR (2000).** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.
- AFSSAPS (2008).** Pharmacopée européenne. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé.
- Ağaoğlu S, Dostbil N et Alemdar S. (2007).** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*, 51(1):53-57.
- Akhlaghi H. (2008).** The Essential Oils from Flowers, Stems and Leaves of *Ferulago angulate* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds* , 44 (3): 396-397.
- Allegrini J, Bouchberg MS et Maillols H. (1973).** Emulsions d'huiles esentielles fabrication et applications en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier*, 33: 73-86.
- Altun M et Yapici BM. (2022).** Determination of chemical compositions and antibacterial

- effects of selected essential oils against human pathogenic strains. *Academia Brasileira De Ciencias*, 94(1): 20210074.
- Amaral JA, Ekins A, Richards SR et Knowles R. (1998).** Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 520-525.
- Amjad HM. (2005).** Neem Seed oil: Bangladeshe. Examples of the Development of Pharmaceutical products from Medicinales plants. *Bangladeshe council of scientific and industrial research (BCSIR)*, (10): 59-63.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Rassoulian Barrett SL, Cookson BT, Logan SM et Aderem A. (2005).** Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26): 9247-9252.
- Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson DJ, Arlorio M. (2004).** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11): 3530–3535.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S et Cabras P. (2006).** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (12):4364–4370.
- Anton R (2003).** Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2^{ème} Ed : Edition médicale internationales. Lavoisier, Paris.221p
- Anton R et Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, 521p.
- Arsenakis M. (1996).** Antimicrobial and cytotoxicactivities of origanum essential oils. *Journal of agriculture and food chemestry*, 44: 1202 - 1205.
- Ashrafi S M, Rahman P, Ahmed S, Alam et Hossain MA. (2022).** Prospective Asian plants with corroborated antiviral potentials: Position standing in recent years. *Beni-Suef university journal of basic and applied sciences*, 11(1): 47.
- Assous MV, Guerineau AL., Bourhy H, Dhote R et Paugam A. (1999).** Microbiologie et pathologie infectieuse Vol. 2 : Ed. De Boeck, Paris: 191-253-256-257-696-697-698.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F et Montail H. (2000).** *Helicobacter pylori*. *Clinical*

Bacteriology, 30 : 406 – 410.

Baba Aissa F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb substance végétale d'Afrique d'orient et d'occident. Ed. : Librairie moderne, Algérie.

Badoc A, Amimar Z, Lamarti A et Deffieux G. (1998). Action de la colchicine lors de la micropropagation du fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) sur l'huile essentielle des fruits. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 137 : 25-36.

Bakkali F, Averbek S, Averbek D et Idaomar M. (2008). Biological Effects of Essential Oils - A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2): 446-475.

Barbelet S. (2015). Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Thèse de Doctorat d'Etat de docteur en pharmacie, Université de Lorraine, France, 22-24p

Bardeau F. (2009). Les huiles essentielles: découvrir les bienfaits et les vertus. Ed. Lanore, Paris, 32-198-201 p.

Barnola LF et Cedeno A. (1999). Inter-population differences in the essential oils of *Pinus caribaea* needles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (10) : 923-931.

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

Battistini R, Rossini I, Ercolini C, Gorla M, Rita Callipo M, Maurella C, Pavoni E et Serracc L. (2019). Antiviral Activity of Essential Oils Against Hepatitis A Virus in Soft Fruits. *Food and Environmental Virology*, 11:90–95.

Baydar H, Sagdic O, Ozkan G et Karadogan T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(13): 169–172.

Bayoub K, Baibai T, Moutassif D, Retmane A, Soukri A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 9(27): 4251-4258.

Bego P. (2003). Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB., Paris: 118-124.

Begum J, Bhuiyan M, Chowdhury JU, Hoque MN et Anwar MN. (2010). Antimicrobial Activity of Essential Oil from Seeds of *Carum carvi* and Its Composition. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 25(2), 85–89.

Bekhechi C, Atik-Bekkara F et Abdelouahid DE. (2008). Composition et activité

- antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6 : 153-159.
- Belaiche P. (1979).** Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie, Tome 1: L'aromatogramme. Ed: Paris, Maloine.
- Belghazi L, Lahlou N, Alaoui I, Abousaouria T, Habti N et Tantaoui IA. (2002).** Extraction et analyse chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de biochimie. Casablanca. *Biochim. santé*, 38-45.
- Belitz HD et Grosch W. (1999).** Food chemistry. Second edition. Spriger- Verlag. Berlin Heidelberg: 992p.
- Belkacem S. (2009).** Investigation phytochimique de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* (Compositae). Mémoire de magister, Univ. Mentouri, Constantine, 19 p.
- Belong P, Akono Ntonga P, Bakwo Fils EM, Foko Dadji G.A et Lebel Tamesse J. (2013).** Chemical composition and residue activities of *Ocimum canum* Sims and *Ocimum basilicum* L. essential oils on adult female *Anopheles funestus* SS. *Journal of animal and Plant Sciences*, 19(1):2854-2863.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoudef M, Desjobert JM, Bernardini JF et Costa J. (2007).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106 (1):132-139.
- Benjilali B, Tantaoui-Elarki A, Ismaili-Alaoui M. (1986).** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélose. *Plante médicinale et phytothérapie*, 20:155-167.
- Benyoucef EH, Yahiaoui N, Nacer Bey N, Khelfaoui A et Belhadj M. (2004).** Essential oil of *Mentha spicata* L. from Algeria. *Rivista Italiana EPPOS*, 30:31-35.
- Bergeron M et Dufour JC. (2004).** Protagonists of innate immunity during infection with *Salmonella*. *Médecine/Sciences*, 20 (12): 1119-1124.
- Berigaud B. (2002).** Aromathérapie. Ed. PARDES. Paris: 412-486.
- Bernadet M. (2000).** Phyto-Aromathérapie Pratique, Plantes Médicinales et Huiles Essentielles, Dictionnaire Thérapeutique de 530 Affections Courantes. Ed. Dangles, France, 376 p.

- Bernard JK, Amos HE et Froetschel MA. (1988).** Influence of supplemental energy and protein on protein synthesis and crude protein reaching the abomasum. *Journal of Dairy Science*, 71 (10): 2658–2669.
- Bethenod T. (1980).** L'eau et les hormones. Ed. INRA, Paris. 82p.
- Betts TJ. (2001).** Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatography stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 936 (1-2):33-46.
- Bigard MA. (2004).** L'ulcère gastroduodéal associé à l'*Helicobacter pylori*. *Revue de Formation Médicale Continue*, 29 (24): 6 – 9.
- Billerbeck VG. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 5, 249-253.
- Billerbeck VG. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5 : 249-253.
- Boti J, Muselli J, Tomi F, Koukoua G, N'Guessan T, Costa J et Casanova J. (2006).** Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR. *Comptes Rendus Chimie*, 9(1): 164-168.
- Botineau M. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs .Ed : Lavoisier .Paris,1023 p.
- Bouaoun D, Hilan C, Garabeth F, Sfeir R. (2007).** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie*, 5 : 129-134.
- Bouguerra A. (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine.128p.
- Boukhebt H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H et Harzallah H, 2011.** Chemical composition and antibacterial activity of menthe pulegium L. *Mentha spicata* L Essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3 (4): 268- 275.
- Bourgeois C. M, Mescle JF et Zucca J. (1996).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, 174p.
- Bourgeois CM, Mescle JF et Zucca J. (1996).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tec. et Doc.

Lavoisier, Vol (1), 174P.

- Bourrel C. (1993).** Analyse chimique, activité bio statique et antioxydante d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de Doctorat en biochimie. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.
- Bousbia N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option Sciences Alimentaires, INA. Algérie.
- Bouzouita N, Kachouri F, Ben Halima M, Chaabouni MM. (2008).** Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10 : 119 - 125 p.
- Bowles EJ.(2004).** The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Crows Nest, NSW: Allen & Unwin Academic.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N et Anackov G. (2006).** Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 54 (5): 1822-1828.
- Brada M, Khelifa LH, Achour D, Wathelet JP et Lognay G. (2011).** Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(6): 810 – 814.
- Brahmi F, Hauchard D, Guendouze N, Madani K, Kiendrebeogo M, Kamagaju L, Stévigny C, Chibane M. and Duez P. (2015).** Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) *Huds* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 74:722-730.
- Brahmi F, Madani K, Dahmoune F, Rahmani T, Bousbaa K, Oukmanou S et Chibane M. (2012).** Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications*, 2: 72-86.
- Braunwald EA, Dennisl M. Kasper JL. (2001).** Principe de medecine interne .Ed : Medecine Science Flamario. Paris.
- Breitmaier E. (2006).** *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Ed. Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 197p

- Brenes A et Roura E. (2010).** Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158 (1): 1-14.
- Bruneton J. (1995).** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Ed : Lavoisier. Paris P :412,459,460.
- Bruneton J. (1995).** Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants, Ed. Tec et Doc, Lavoisier, 4ème édition, Paris. 265 p.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, 4ème édition, Paris, p. 418-419.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants Vol 3: Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris : 120.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, 4ème édition, Paris. p.1292.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, 4ème édition, Paris. 1292 p.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3) 223-253.
- Caree P. (1953).** Précis de technologie et de chimie industrielle, Tome III, Ed. Ballière JB. Et fils, Paris.
- Cari C. (2008).** Microbiologie. Ed. Tec et doc, Lavoisier, Paris: 39-125.
- Carson CF, Mee BJ et Riley TV. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6): 1914–1920.
- Cassel-Beraud AM, Peghini M. Mouden JC et Rajaonarison P. (1996).** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* à Tananarive, Madagascar. *Bactériologie* n° 1441, 4p.
- Celikel N et Kowas G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 26 (3): 174-181.
- Chalchat JC, Gary RP, Michet A, Benjilali B et Chabart, JL. (1993).** Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain, France). *Journal of essential oil research*, 5(6): 613-618.
- Chalchat JC, Gorunovic MS, Maksimovic ZA et Petrovic S.D. (2000).** Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L from Yugoslavia. *Journal of Essential Oil*

Research, 12: 598–600.

Chao SC, Young DG et Oberg CJ (2000). Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 639-649.

Chaumont J P et Leger D. (1989). Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure - activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2): 124 - 126.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L et Vlietinck AJ (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213-220.

Clarke S. (2008). Chemistry of Essential Oil. Ed. Elsevier. British, 302 p.

CLSI (2006). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial susceptibilitytest. Fifteenth International Supplement. Wayne. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S16.

CLSI. (2007). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals. Approved standard, Third edition –CLSI document M11-A7- Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

CLSI. (2007). Clinical and Laboratory Standards Institute-Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals. Approved standard, Third edition –CLSI document M11-A7- Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Colombo RP, Martíneza AE, di Pardo AF, Bidondo LF, Van Baren C, Di Leo Lira P et Godeas AM. (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: 114-118.

Connolly JD et Hill RA. (2005). Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 22: 487–503.

Conseil de l'Europe and Pharmacopée Européenne 1. (1996). Maisonneuve S.A. Ed. SAINTE RUFFINE .150p

Cosentino S et Tuberoso CIG (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and

- chemical composition of Sardinian. Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29(2): 130-135.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E et Palmas F. (1999).** *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29 : 130-135.
- Couderc V L. (2001).** Toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Univ. Toulouse.123p.
- Couic-Marinier F et Lobstein A. (2013).** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52 (525): 18-21.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR et Wyllie SG. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- COX SDC. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1): 170-175.
- Croteau R, Kutchan TM et Lewis NG. (2000).** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W et Jones R. Ed. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. 1250-1318p.
- Curado A, Oliveira BA, Jesus JG, Santos C, Seraphin JC et Ferrip H. (2006).** Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 67: 2363-2369.
- Cutter CN. (2000).** Antimicrobial effet of herb axtracts against *E. coli* O157:H7. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella thyphimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5): 601-607.
- Dadalioglu I et Evrendilek GA. (2004).** Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.) and fennel (*Foeniculum vulgarei* Mill.) on common foodborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 8255-8260.
- Damasius J, Skemaite M, Kirkilaite G, Vinauskiene R et Venskutonis PR. (2007).** Antioxidant and antimicrobial properties of caraway (*Carum carvi* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) extracts. *Veterenary medecine and Zootechnics*, 40 (62): 9-13.

- Damien Dorman HJ, Kosar M, Kahlos K, Holm Y et Hiltunen R. (2003).** Antioxidant properties and Composition of aqueous Extracts from Mentha Species, Hybrids, Varieties and Cultivars. *Journal of agriculture and food Chemesty*, 51: 4563–4569.
- Dastidar SG, Manna A, Kumar KA, Mazumdar K, Dutta Nk, Chakrabatary AN, Motohashi N et Shirataki Y. (2004).** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial*, (23): 99-102.
- Davidson PM. (1997).** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle MP, Beuchat LR et TJ. Ed. Montville, ASM, Washington, 520- 556P.
- De Billerbeck VG, Roques C, Vaniere P et Marquier P. (2002).** Activités antibactérienne et antifongique de produits à base d’huile essentielle. *Hygiène (Revue officielles de la société française d’hygiène hospitalière)*, 10 : 248-251.
- De Cliff S et Harerimana PC. (2013).** Extraction de l’huile essentielle complète des fleurs de *Cananga odorata* de la plaine de l’Imbo : vers la vulgarisation d’une nouvelle filière de plantes industrielles au Burundi. *Revue de l’université de Burundi, Série Sciences Exactes*, 28 : 1-17.
- Deans SG et Ritchie G. (1987).** Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5 : 165-180.
- Degenhardt J, Köllner TG et Gershenzon J. (2009).** Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry* 70: 1621–1637.
- Degryse AC, Delpla I et Voinier MA. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier Santé Environnement, Environnement des Ingénieurs du Génie Sanitaire (IGS), EHESP, France, 87p.
- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B et Mazza G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101-109.
- Den X, Fang Z et Liu Y (2010).** Ultrasonic transesterification of *Jatropha curcas* L. oil to biodiesel by a two-step process. *Energy Conversion and Management*, 51 (12): 2802-2807.
- Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS et Fierbințeanu-Braticevici C. (2017).** Helicobacter pylori infection: old and new. *Journal of medicine and life*, 10(2):112–11

- Di Pasqua R, De Feo V, Villani F et Mauriello G, (2005).** *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against food borne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*. 55(2): 139-143.
- Djenane D, Sanchez-Escante A, Beltran JA et Roncalés P. (2002).** Ability of α -tocopherol, taurine and rosmarinic acid, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76: 407- 415.
- Djenane D, Yanguela J, Amrouche T, Boubrit S, Bousaad N et Roncales P. (2011).** Chemical Composition and Antimicrobial Effects of Essential Oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in Minced Beef. *Food Science and Technology International*, 17(6):505-15.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjmi B, Boutassouna D, Stocker P et Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Journal of food chemistry*, (97): 654-660.
- Dorman HJ et Deans SG. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatils oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316.
- Dosoky NS et Setzer WN. (2018).** Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Curcuma* Species. *Nutrients*, 10: 1196.
- Drugeon HB, Legallou F et Caillon J. (1990).** Méthodes d'études de l'activité bactéricide. In : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP et Goldstein F. Bactéricidie. Ed. Maloine. Paris, 113-126p.
- Dudai R, Defeo V, Villani F et Maurellog J. (2006).** *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from Mediterranean *Apiaceae*, *verbenaceae* and *lamiaceae* against food borne pathogène and spoilog bacteria. *Jornal of Microbiology*, 55: 139-143.
- Dunford NT et Vazquez RS. (2005).** Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grow under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*, 7(1): 20-22.
- Duval L. (2012).** Les Huiles Essentielles à l'Officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Rouen, France, 155p.
- Dwarakanath AD, Tsai HH, Hart CA et Rhodes JM. (1994).** Sialidase production by *Helicobacter pylori*. It's possible rôle in pathogenesis. *Digestive. Week. Aga*

(abstract 2521).

- Dweck AC (2002).** Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal care magazine*. 3(2) : 19-21.
- El amri J, Elbadaoui K, Zair T, Bouharb H, Shakir S et Aloui TA (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum*.L et l'extrait de Silène vulgarus sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences* (82): 7481-7492.
- El Ghorab AH. (2006).** The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9 (2): 183-195.
- El Haib A. (2011).** Valorisation de Terpènes Naturels Issus de Plantes Marocaine par Transformations Catalytiques. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III, France, 195p.
- Elufioye T, Habtemariam S. (2019).** Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108600.
- El Kalamouni C. (2010).** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse Doctorat, université de Toulouse, 263p.
- Elamrani A, Zrira S, Benjilali B et Berrada M. (2000).** A study of Moroccan rosemary oils. *Journal of essential oil research*. 12(4): 487-495.
- Elnour S, Hashim M et Ibrahim H. (2022).** Disseminated non typhoidal salmonella infection with *salmonella pneumonia* and vertebral osteomyelitis in sickle cell disease: A case report. *IDCases*, 27: e01390.
- Elumalai PN, Muninathan ST, Megalatha A, Suresh KS, Kumar N, Jhansi K. Kalaivani K et Krishnamoorthy G. (2022).** An Insight into Anticancer Effect of Propolis and Its Constituents: A Review of Molecular Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 5901191 :1-14..
- Enroth H, Wreiber K, Rigo R, Risberg D, Uribe A et Engstrand L. (1999).** *In vitro* aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter*, 4:7-16.
- Euzeby JP. (2000).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 26-30p.
- Euzeby JP. (2000).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris: 26-30p.

- Farhat A. (2010).** A surprising method for green extraction of essential oil from caraway seeds: microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography* 31 : 1023-1026.
- Fauchère JL et Avril JL (2002).** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses, Paris, 365p.
- Fayemiwo KA, Adeleke MA, Okoro OP, Awojide SH, Awoniyi IO. (2014).** Larvicidal Efficacies and Chemical Composition of Essential Oils of Pinus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): 30-4.
- Fellah S, Romadhane M et Abderraba M. (2006).** Extraction et étude des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. cueilli dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la société Algérienne de Chimie*, 16 (2): 193-202.
- Fennerty M. B. (1994).** *Helicobacter pylori*. *Jama*, 19(295): 27-35.
- Festy D. (2012).** Huiles essentielles de A à Z. Ed. CLM, Paris : 83-173p.
- Fiaud C. (1990).** Inhibiteurs de corrosion, Techniques de l'ingénieur, COR1005.
- Figueredo G. (2012).** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiacées) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse doctorat. Université Blaise pascal, 17p.
- Formacek V et Kubeczka KH. (1982).** Essential oils analysis gas chromatography and carbon13 NMR spectroscopy. Ed. John Wiley and Sons, New-York.
- Fouche JG, Marquet A et Humbuckers A. (2000).** Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman.
- Franchomme P, Pénéol D et Jollois R. (1990).** L'aromathérapie exactement- Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Ed. Jollois, 445p.
- Franz J et Novak J. (2009).** Sources of essential oils Ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 39-82p.
- Garneau FX. (2004).** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation, Manuel pratique. Laseve-uqac, Chicoutimi, Québec, 1-16.
- Gassier J et Magere A. (2005).** Biologie nutrition alimentaire, Ed. Masson, Paris, 23-74p.
- Geiger JL. (2005).** The Essential Oil of Ginger, *Zingiber officinale* and Anaesthesia. *International journal of aromatheapy*, 15 (1): 7-14.

- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL et Peek R.M. (2004).** *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *Journal of infectious disease*, 189(10): 1914-1920.
- Ghanmi A, Satrani B, Aberchane M, Ismaili R, Aafi A et El-Abid A. (2003).** Plantes aromatiques et médicinales du Maroc « Les milles et une vertu ». Ed. Centre de recherche forestière, Collection Maroc nature. 13p.
- Ghavam M, Bacchetta G, Castangia I et Letizia Manca M. (2022).** Evaluation of the composition and antimicrobial activities of essential oils from four species of Lamiaceae Martinov native to Iran. *Nature portfolio*, 12:1-12.
- Ghedira K, Goetz P et Lejeune R. (2010).** L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*. *Phytothérapie*, 8 :1-2.
- Giordani R et Kaloustian J. (2006).** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytotherapie*, 3 : 121-124.
- Gledel J. (1988).** Les Salmonelles. In : Microbiologie alimentaire. Ed : Lavoisier, Paris : 51 – 53.
- Glisic SB, Milojevic SZ, Dimimitrijevic SL, Orlovic AM et Skala D. (2007a).** Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *Journal of Serbian Chemistry Society*, 72 (4): 311-320.
- Glisic SB, Mistic DR, Stamenic MD, Zizovic IT, Asanin RM et Skala DU. (2007b).** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carrot Fruit Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry*, 105 (1): 346-352.
- Gonny M, Bradesi P et Casanova J. (2004).** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. Using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavor and fragrance journal*, 19(5): 424-433.
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins D, Sly L, Mc Connell W et Harper WES. (1989).** Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Systematic Bacteriology*, 39: 397-405.
- Guechi Z. (2002).** Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut Pasteur d'Algérie.

- Guechi Z. (2002).** Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut Pasteur d'Algérie.
- Guerin-fauble V et Carret G. (1999).** L'aromatogramme: principe, méthodologie, intérêt et limites. Journée nationale GTV-INRA. 5.12.
- Guessennd N, Oussou K, Bahi C, Coulibaly A, Djaman A, Dosso M, (2014).** Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(3): 11-92.
- Guignard JL et Dupont F. (2004).** Botanique: Systématique moléculaire. 13^{ème} édition Masson. p 271.
- Guignard JL, Cosson L et Henry M. (1985).** Abrégé de Phytochimie. Vol 1, Ed. Masson, Paris. 224 p.
- Guignard JL. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris; 54-571
- Guignard JL. (2000).** Biochimie végétale. Ed. Duno. Paris. P166- 274.
- Guignard JL. (2001).** Botanique systématiques moléculaire. Ed. Masson ; Paris.
- Guignard JL. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris. 213-218-223.
- Guinoiseau E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de Corse.
- Guiraud JP. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 54-571p.
- Gulfraz M, Mehmood S, Minhas N, Jabeen N, Kausar R, Jabeen K et Arshad G. (2008).** Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *African Journal of Biotechnology*, 7 (24), 4364-4368.
- Gulfraz M, Mehmoud S, Minhas N, Jabeen N, Kausar R, Jabeen K et Arshad G. (2008).** Composition and antimicrobial proprties of essential oil of *foeniculum vulgare*. *African journal of biothechnologie*,7: 4364-4368.
- Gupta R, Ratan A et Rajesh C. (2012).** Sequencing and analysis of a South Asian-Indian personal genome. *BMC Genomics* 13, 440.
- Hadj Khelifa L, Brada M, Brahmi F, Achour D, Fauconnier ML et Lognay G. (2012).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Ocimum basilicum* Leaves from the Northern Region of Algeria. *Topclass Journal of Herbal Medicine*, 1(2): 53-58.
- Hajlaoui H, Mighri H, Aouni M, Gharsallah N et Kadri A. (2016).** Chemical

composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95: 86–94.

Hammer K A, Carson CF et Riley T V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95 :853–860.

Hammer KA, Carson CF et Riley T V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985–990.

Haristory Aristory X, Angioi-Duprez K, Duprez A et Lozniewski A. (2003). Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(12) :39-82.

Harkati B. (2011). Valorisation et identification structurale des Principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera undulata*. Thèse de doctorat. Univ constantine. Algérie. 143p.

Haslett C. (2000). Médecine interne principe et pratique. Ed :Medecine Science Flanario. Paris. PP: 221, 234.

Hayes AJ, Leach DN, Markham JL et Markovic BJ. (1997). In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *Essential Oil Research*, 9: 575-582.

Hayes AJ et Markovic B. (2002). Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 535-543.

Hernandez-Ochoa LR. (2005). Substitutions des Solvants et Matières Actives de Synthèse par Combiné ‘Solvant/Actif’. D’origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse, Spécialité: Sciences des Agroressources, France, 225p.

Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S. (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiceae. *Lebanaise Science Journal*, 7 (2): 13- 22.

Hoque M, Barim L, Junejav K et Kawamoto S. (2008). Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food born pathogène and spoilage bacteria monocytogenes in Ground chicken meat with their essential oils. *National Food Research Institute*, 72: 9-21.

- Hosni K, Hassen I, Chaâbane H, Jemli M, Dallali S et Sebei H. (2013).** Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 47: 291–299.
- Howes MJR, Simmonds M et Kite GC. (2004).** Evaluation of the Quality of Sandalwood Essential Oils by Gas, Chromatography–Mass Spectrometry. *J Chromatogr. A*, 1028 (2): 307-312.
- Hussain A I, Anwar F, Chatha SA S, Jabbar A, Mahboob S et Nigam P.S.(2010).** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1070-1078.
- Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH et Przybylski R. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108: 986-995.
- Inouye S, Takazawa T et Yamaguchi H. (2001).** Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antibacterial Chemotherapy*, 47: 565-573.
- Inouye S, Uchida K, Maruyama N, Hideya L et Abe S. (2006).** A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Microbiol. Immunology*, 45(3) : 201-208.
- Inouye S, Tsuruoka T, Watanabe M, Takeo K, Akao M, Nishiyama Y et Yamaguchi H. (2000).** Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43: 17– 23.
- Inouye S. (2006).** Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7(4):251-4.
- Inouye S. Et Abe S. (2007).** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 1 : 2-4.
- Isa T, Emine B, Gungor Y et Betul A. (2006).** Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34: 489-497.
- Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bordas, Milan. PP : 99, 183, 121.

- Jean CC et Mehmet MO. (2008).** Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum L.*) used as herb. *Food Chemistry*, 110 (2):501-503.
- Jham GN, Dhingra OD, Jardim CM et Valente VMM. (2005).** Identification of the Major Fungitoxic Component of *Cinnamon Bark Oil*. *Fitopatol. Bras*, 30 (4): 404-408.
- Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi M P et Kaniampady M M. (2003).** Chemotaxonomical analysis of the essential oil aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. *European Food Research and Technology*, 217(2): 120-124.
- Jitka S, Blanta K et Vlastimil K. (2001).** Determination of essential oil content and composition in caraway. *Plant, Soil and Environment* , 49(6):277-282.
- Joly B et Alain R. (2003).** Genre *shigella* in Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic. Ed : médical international cedex, Lavoisier, Paris. 3 : 53 – 62.
- Joly B. et Alain R. (2003).** Genre *shigella* in Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic. Ed : médical international cedex, Lavoisier, Paris. PP: 53 – 62.
- Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JÁ. (2013).** Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis L.* *Food Control*, 30: 463–468.
- Juliani RH, Koroch A, Simon JE, Hitimana N, Daka A, Ranarivelo I et Langenhoven P.(2006).** Quality of geranium (*Pelargonium sp.*): Case studies in Southern and Eastern Africa. *Journal of essential oil research*, 18: 116-121.
- Juliani R H, Koroch A, Simon JE, Hitimana N, Daka A, Ranarivelo I et Langenhoven P. (2006).** Quality of geranium (*Pelargonium sp.*): Case studies in Southern and Eastern Africa. *Journal of essential oil research*, 18: 116-121.
- Juven B J, Kanner J, Schved F et Weisslowiez H. (1994)** « Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, 76:626-631.
- Kaddem SE. (1990).** Les plantes médicinales en Algérie identification description principale actif propriétés et usage traditionnel de plantes communes en Algérie .p :36-175.
- Kalembe D et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- Kalembe J et Kunika R. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10 :813-829.

- Kamaleeswari M. (2005).** Dose-response efficacy of caraway (*Carum carvi*) on tissue lipid peroxidation and antioxidant profile in rat colon carcinogenesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (8): 1121–1130.
- Kapoor R, Giri B et Mukerji KG. (2002).** *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum [*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague. *World. Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:459-63.
- Karthikeyan A, Shanthi V et Nagasathaya A. (2009).** Preliminary phytochemical and antibacterial screening of crude extract of the leaf of *Adhatoda vasica*. L. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(1),DOI: 10.4103/0973-8258.49381.
- Kelen M et Tepe B. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish. *Bioresource Technology*, 99: 4096-4104.
- Khenaka K. (2011).** Effet de divers plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l’ovin. Mémoire de Magister, Université Mentouri Canstantine. PP : 19-81.
- Kim J M, Marshall MR et Wei CI. (1995).** Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839-2845.
- Kim S, Park C, Ohh M, Cho H et Ahn Y. (2003).** Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*, 29:11-19.
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H et Weis N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1: 119-128.
- Kokkini S, Hanlidou E, Karousou R et Lanaras T. (2002).** Variation of Pulegone Content in Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) Plants Growing Wild in Greece. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14 (3): 224-227.
- Koohsari H, Allah Ghaemi E, Poli M S S et Sadegh A. (2013).** *Annals of Biological Research*, 4 (10): 52-55.
- Koth H. (2007).** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed : terre edition. PP : 120, 149.
- Koutsoudaki C, Krsek M et Rodger A. (2005).** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 53: 7681-7685.

Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y et Ichimura K. (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agricultural and Biological Chemistry*, 24 (1): 94-103.

Lacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F et Senatore F. (2004). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (1): 57–61.

Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 18:435-448.

Lahlou M. (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Agricultural and Biological Chemistry*, 19: 159–165.

Lahrech K. (2010). Extraction et Analyse des Huiles Essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides* : Tests d'activités antibactériennes et antifongiques. Thèse de magister. Université d'Oran -Sénia.

Lamarti A, Badoc A et Carde JP. (1993). Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.); caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 132 : 73-89.

Lamarti A, Badoc A, Deffieux G et Carde JP. (1994). Biogénèse des Monoterpènes: la Chaîne Isoprenique. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 133: 79-99.

Langenhoven P. (2006). Quality of geranium oils (*Pelargonium species*): Case Studies in Southern and Eastern Africa. *Journal of essential oil research*, 18: 116-121.

Lansing M, Prescott J et Harley P. (2003). Microbiologie Vol2: Ed. De Boeck, Bruxelles, 418-732-789-793 pp.

Lardry JM et Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither*, 61: 14-7.

Larpent JP. (1989). Les bactéries lactiques. In : Microbiologie alimentaire Vol. 2: Ed. Tech et Doc. Lavoisier. Paris. 3-13p.

Laure M. (2011). Agronomie biologique. Ed. CLM, Paris. PP : 96-210.

Lauwers G, Mino-Kenudson M, et Kradin R.L. (2010). Infections of the Gastrointestinal Tract. *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*, 215–254.

Layral G et Vierling A. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire Vol.3 Ed. Doin, Paris. PP : 66-67.

- Leclerc H, Gaillard J L et Simonet M. (1995).** Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien. Ed .Doin, Paris.535p.
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S et Josenhans C. (2003).** *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infection*, 5(15): 1345-1356.
- Licina BZ, Stefanovic OD, Vasic SM, Radojevic ID, Dekic MS et Comic LR. (2013).** Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*, 33: 498-504.
- Lin Y, Labbe R et Shetty K. (2004).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using Oregano and Cranberry synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:5672-5678.
- Linz B, Balloux F et Moodley Y. (2007).** An african origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*.*Rev. La santé*, 64(2): 58-97.
- Lopez P, Sanchez C, Batlle R, Nerin C. (2005).** Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6939- 6946.
- Lorenzo D, Paz Eduardo D, Philip D, Roser D et Salvador V. (2002).** Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (4):519- 525.
- Lorrain E. (2013).** 100 questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie. 133p.
- Mahboubi M et Haghi G. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 119: 325-327.
- Mahboubi M et Haghi G. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 119: 325-327.
- Malecky M. (2007).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris, pp. 30-35.
- Malik S, de Mesquita LSS, Silva CR, de Mesquita JWC, de Sá Rocha E, Bose J, Abiri R, de Maria Silva Figueiredo P, Costa-Júnior LM. (2019).** Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Artemisia vulgaris* L. Cultivated in Brazil. *Pharmaceuticals*,12(2):49.
- Marchal N, Bourdon JL et Richard Cl. (1987).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. DOIN-Paris : 483p.

- Marotti M, Dellacecca V, Piccaglia R et Ciovanelli E. (1993).** Agronomic and chemical evaluation of three varieties of *Foeniculum vulgare*. Ed. WOCMAP, Italy.43p.
- Marotti M, Picaglia R et Giovanelli E. (1994).** Effects of variety and ontogenic stages on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Essential Oil Research*, 6: 57-62.
- Marshall BJ, Royce H, Annear D I, Goodwin CS, Pearman JW, Warren J R et Armstrong J A. (1984).** Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *FEMS Microbiology Letters*, 25: 83-88.
- Martinetti PH. (2013).** Mon guide des huiles essentielles .Ed :Lanore .Paris .
- Maurice M. (1975).** Mon herbier de santé. Ed. Robert Laffont S.A.Paris.
- Megraud F, Francis, Broutet et Nathalie. (2000).** Epidémiologie acquisition et transmission d' *Helicobacter pylori*. *Rev. Du Praticien*, 50 : 1414-1417.
- Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, Unge P, van Zanten SV, Wrangstadh M, Burman CF. (1999).** Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2747-2752.
- Megraud F. (1994).** *Helicobacter pylori*. Manuel de bacterial. Clin N°3: 1311-1324.
- Messaid H. (2008).** Optimisation du processus d'immersion-réhydratation du système dattes sèches-Jusd'orange. Thèse de Magister en Génie alimentaire. L'université M'Hamed BOUGARA de Boumerdès, Algérie.
- Miele M, Ponder R, Ciarallo G et Mazzei M. (2001).** Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. 'Genovese gigante'. *Chemistry*, 49: 517-521.
- Minakshi DE, Krishna DEA, Parimal SEN et Banerjee AB. (2002).** Antimicrobial properties of star anis (*illicium verum Hook f*), PTR. *Phytothérapie research*, 16: 94-95.
- Moghaddam AMD, Shayegh J, Mikaili P et Sharaf JD. (2011).** Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15): 3453-3456.
- Mojab F. et Nickavar B. (2003).** Composition of the Essential Oil of the Root of *Heracleum persicum* from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2 (4): 245-247.
- Monteiro L. (1995).** *Helicobacter pylori*. Facteurs payhogènes bactériens. *Hépatogastroenterol, suppl.2*: 30-227.
- Moreau M. C. (2005).** Bactéries lactiques probiotiques et immunité in « Bactéries lactiques

- et probiotiques ». Ed. Tec et Doc, Paris. 211-253p.
- Moro Buronzo A. (2008).** Grand guide des huiles essentielles santé, beauté, bien être. Ed. Hachette pratique, Paris. 4-23 p.
- N'guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D et Aké-Assi L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, cote-d'Ivoire). *The Science of Nature*, 6(1):1-15.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R et De Feo V. (2017).** Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 10(4): 86.
- Nazzaro F, Polito F, Amato G, Caputo L, Francolino A, D'Acerno F, Fratianni V, Candido R, Coppola T et De Feo V. (2022).** Chemical Composition of Essential Oils of Bulbs and Aerial Parts of Two Cultivars of *Allium sativum* and Their Antibiofilm Activity against Food and Nosocomial Pathogens. *Antibiotics*, 11(6):724.
- Ndip RN, Malange Takang AE, Ojongokpoko JE, Luma HN, Malongue A, Akoachere JF, Ndip LM, MacMillan M et Weaver LT. (2008).** *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Tropical Medicine & International Health*, 13:848–854.
- Nogaret-Ehrhart AS. (2008).** La phytothérapie : se soigner par les plantes. Ed. Eyrolles, Paris.13p.
- Nostro A, Germano M P, D'angelo V, Marino A et Cannatelli M A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliqué*, 30(5) : 379.
- Ohno T. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3):207-215.
- Oke F, Aslim B, Ozturk S et Altundag S. (2009).** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112: 874–879.
- Omolo OM, Okinyo D et Ndiege O. (2004).** Repellency of essential oil of some Kenya plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*, 65: 2797-802
- Onawunmi GO. (1984).** Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf. *J. Ethnopharmacol*, 12(3): 279-86.
- Ottemann KM et Lowenthal AC. (2002).** *Helicobacter pylori* uses motility for initial

colonization and to attain robust infection. *Infection and immunity*, 70(4): 1984-1990.

Ouibrahim A, Tlili-Ait-kaki Y, Bennadja S, Amrouni S, Djahoudi AG et Djebbar MR. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (42): 4968-497.

Ouibrahim A. (2015). Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar – Annaba.

Oussalah MS Caillet L, Saucier et Lacroix M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli*O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5): 414-420

Oussallah M, Caillet S, Saucier L et Lacroix M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73: 236-244.

Oussou KR, Yolou S, Boti JB, Guessennend KN, Kanko C, Ahibo C et Casanovad J. (2009). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 2(1): 94-103.

Ozcan M et Chanchat JC. (2002). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech journal of food science*, 20:223-228.

Özcan M M et Chalchat JC. (2007). Chemical Composition of Carrot Seeds (*Daucus carota*L.) Cultivated in Turkey: Characterization of the Seed Oil and Essential Oil. *Grasas y Aceites*, 58(4): 359-365.

Packer M. (2021). Pitfalls in Using Estimated Glomerular Filtration Rate Slope as a Surrogate for the Effect of Drugs on the Risk of Serious Adverse Renal Outcomes in Clinical Trials of Patients With Heart Failure. *Circulation, heart failure*, 14(6): e008537.

Panikar S, Shoba G, Arun M, Sahayarayan J, NanthinI D, Chinnathambi A, Alharbi S, Nasif O et King H. (2021). Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. *Journal of infection and public*

health, 14(5):601-610.

- Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M et Kole CR. (1997).** Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbiois*, 89 (358):39-46.
- Pibiri M C. (2006).** Assainissement Microbiologique de l'Air et des Systèmes de Ventilation au Moyen d'Huiles Essentielles. Thèse de Doctorat, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse.28-52p.
- Pichersky E, Noel JP et Dudareva N. (2006).** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808–811.
- Pino JA, Rosado A et Fuentes V. (1996).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 8(3): 295-296
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R et Casanova J. (2002).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 15-19.
- Poole K. (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4:500-508.
- Porter N. (2001).** Essential oils and the production. *Crop & Food Research*. 39p.
- Pourmortazavi S M. (2007).** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1162:2-24.
- Rahal K, Benslimani A, Belouni R et Bouheraoua M. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme, 5ème édition. 12-13 p.
- Rajesswara R. (2002).** Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L; *F.piperascens* Malinv. Ex Holmes). *Industrial corps and products*, 16: 133-144.
- Randrianalijoana JA, Ramanoelina AR, Rasoarahona JRE et Gaydou EM. (2005).** Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Analytica chimica acta*, 545: 46-52.
- Randrianarivelo R. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar « *cinnamosma fragrans* », alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo. 45 p.

- Rasooli I, Fakoor M.H, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A et Rezaei MB. (2008).** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 122(2) : 135-140.
- Rasooli I. (2005).** Antibacterial and Chemical Properties of *Thymus persicus* Essential Oils at Pre and Flowering Stages. *Targeted Screening of MAPs, Economics and Law*, 4 :139-147.
- Regnault J.P. (2002).** Infections gastro-intestinales et intra-abdominales in élément de microbiologie et d'immunologie. Decarie éditeur inc et Dumbar bureau, Montréal (Québec).
- Reynolds D, Tranter M.S Eet Hambleto P. (1986).** Scaled up production and purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology*, 60 : 517 – 525.
- Rhayour K. (2002).** Etude du Mécanisme de l'Action Bactéricide des Huiles Essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc.170p.
- Richard F. (1992).** Manuel des corps gras, Ed: Lavoisier, Paris. PP :1228-1242.
- Richard H. (2005).** Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à graisse. Ed : Harmattan. Paris, France. PP: 114, 123, 140-142.
- Roulier G. (2009).** Les huiles essentielles pour votre santé. Ed Tec et Doc., Paris. 358-359 p.
- Roux D et Catier O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3^{ème} Edition, wolters Kluwer. 141 p.
- Rož man T et Jeršek B. (2009).** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93(1): 51-58.
- Ruberto G et Baratta MT. (2000).** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemesty*, 69: 167-174.
- Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, Aligiannis N, Graikou K et Chinou I. (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum species* growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 119: 311–316.
- Saad EA, El-Sharkawy SH et Halim AF. (1995).** Composition of the Essential Oils of the Leaves and Stems of *Torilis arvensis*. *Pharmacology Acta Helveticus* (70): 85-87.

- Saadabi AM et Abu Zaid IE. (2011).** An *In vitro* antimicrobial activity of *Moringa oleifera* L. seed extracts against different groups of microorganisms *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5):129-134.
- Sallé JL. (1991).** Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie», Edition Frison –Roche, Paris, p : 21.
- Sartoratotto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. (2004).** Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 275-280.
- Schauenberg P. (2006).** Guide des plantes médicinales. Analyse, description, et utilisation de 400 plantes. Ed : Delachaux et Niestlé. P : 41-84.
- Scherer R, Fumiere Lemos M, Coimbra Martinelli G, Damasceno Lopes Martins J et Ary Gomes da Silva A. (2013).** Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50: 408-413.
- Selles C. (2012).** Valorisation d'une Plante Médicinale à Activité Antidiabétique de la Région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'Extrait Aqueux à l'Inhibition de Corrosion d'un Acier Doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse Doctorat. Université Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie. 214p.
- Serme A, Millogo-Rasolodimby J, Guinko S et Nacro M. (2008).** Propriétés thérapeutiques des plantes a tanins du Burkina Faso . *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, (15): 41-49.
- Serrano E, Palma J, Tinoco T, Venancio F, Martins A, (2002).** Evaluation of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from different zones of "Alentejo" (Portugal). *Journal of Essential Oil Research*, 14(2): 87-92.
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD et Corke H, (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119.
- Sharkay TD et Sunsun Y. A. (2001).** Plant physiology. *Plant Molecular Biology*, 52: 407-436.
- Sikkema J, De Bont JM et Poolman B. (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59: 201-222.
- Simon JE, Quinn J et Murray RG. (1999).** Basil: a source of essential oils. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advanced in New Crops*. Timber Press, Portland. 484-489p.

- Simpson William T. (1999).** Drying and Control of Moisture Content and Dimensional Changes. Gen. Tech. Rep. FPL–GTR–113. Madison, Forest Products Laboratory. 463 p.
- Singh G, Maurya S, De Lampasona MP et Catalan C. (2006).** Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17(9): 745–752.
- Sinic A, Ramcic A, Sokovic M, Ristic M et Marin P.D. (2008).** Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Journal of Pharmaceutical Biology*, 46: 437-441.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T et Skrinjar M, Mandic A, Misan A, Sakac M, Saric L et Zec M. (2009).** Effect of mint (*Mentha piperita* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) on the growth of some toxigenic aspergillus species and aflatoxin B1 production, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 116: 131–139.
- Skouloubris, Stephane, Hilde, Reuseo, Labigne, Agnes (2000).** Bactériologie et pathogénéicité d'*Helicobacter pylori*. *Revue De praticien*, 50: 1409-1413.
- Smallfield B. (2001).** Introduction to growing herb for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop and food research*, 45:4-8.
- Sobhani I, Dospai, Mignon M et Flejou F. (2000).** *Helicobacter pylori*. Epidémiologie, mécanismes d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic. *Gastroentéology Bactériology*, 55 : 301-308.
- Sobhani I, Vallot T et Mignon M. (1995).** *Helicobacter pylori* , une bactérie redécouverte son implication dans les maladies gastroduodénales. *Presse Médicale*, 2 (24) : 67-79.
- Sobhani I, Vallot T et Mignon M. (1995).** *Helicobacter pylori*, une bactérie redécouverte son implication dans les maladies gastroduodénales. *Presse Médicale*, 2 (24): 67-79.
- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M et Sahin F. (2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15: 627-634.
- Sokovic M, Griensven LJLDV, (2006).** Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom,

- Agaricus bisporus*. *European journal of plant pathology*, 116: 211-224.
- Souza EL, Guerr NB, Stamford M et Lima EO. (2006).** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Revista Brasileira de Farmácia*, 87 (1): 22-25.
- Soysal Y. (2005).** Mathematical Modeling and Evaluation of Microwave drying Kinetics of mint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Applied Sciences*, 5(7): 1266-1274.
- Steer T. (2000).** Effect of selected lactic acid bacteria on Growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Nutrition research reviews*, 13: 229 – 254.
- Stoyanova A, Georgiev E, Kula J et Majda T. (2005).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17 (5): 475-476.
- Sudjana N, Orazcob C et Ryaux V. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33: 461-463.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K et Bigger SW. (2003).** Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of agriculture and food Chemistry*, 51: 3197-3207.
- Surk KI et Nielsen PV. (2003).** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology*, 99: 665-674.
- Sutra L, Federighi M et Jouve JL. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. : Polytechnica, Paris, **306** (6) : 31-249.
- Svoboda K.P. (2000).** Secretary Structures of Aromatic and Medicinal Plant – A Review and Atlas of Micrographs. Ed. Microscopix Publications. Powys, UK. 60 p.
- Svoboda KP et Hampson JB. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement, Riverside Campus Ayr-Sac (Scottish Agricultural College), Auchincruive Ayr, Scotland,UK.
- Taie H, Helal M, Helmy W et Amer H. (2013).** Chemical composition and biological potentials of aqueous extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L). *Journal of applied sciences and Research*, 9 (3): 1759–1766.
- Tantaoui-Elaraki A, Ferhout H et Errifi A. (1993).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*.

Journal of essential oil Research, 5: 45-53.

Tchoumboungang F, Jazet Dongmo PM, Sameza ML, Nkouaya Mbanjo EG, Tiako Fosto GB, Amvam Zollo PH et Menut C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie. Agronomie Société et Environment*, 13(1) : 77-84.

Teixeira B, Marques A, Ramos C, Batista I, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira MFJ, Saraiva JA et Nunes ML. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products* 36: 81-87.

Telci I, Bayram E, Yilmaz G et Avci B. (2006). Variability in essential oil composition of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemistry System and Ecology*, 34: 489–497.

Teusher E, Anton R et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, Paris. 522 p.

Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB et Ehlers B. (2002). Qualitative and quantitative variation in monoterpenes co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical ecology*, 29(4): 859-880.

Thompson JD, Chalchat JC, Michet A et Linhart YB. (2003). Ehlers B- qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*; 29(4): 859-880.

Tippayatam P et Chonhenchob V. (2007). Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. *Kasetsart journal of natural sciences*, 41: 319 - 323.

Tortora G. J, Funke BR et Case C. L. (2003). Introduction à la microbiologie. Ed: ERPI. 756-819 p.

Tortora GJ et Grabowski SR. (2001). Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. Deboeck. 867-970 p.

Toure D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat.

- Université Félix Houphouët- Boigny, Côte d'Ivoire. 116 p.
- Toure Daouda M. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse De Doctorat. Université Félix HOUPHOUËT, ABIDJAN. 155p.
- Tournaire G. (1980).** Parfums, cosmétiques et arômes. Ed. De Boeck, Paris. 36-79 p.
- Tripathi AK. (2004).** Essential oils and herbal products in the management of household pests. In proceeding of the training programme on manegement in Building for pest Management professionals. 16-18, 2004, CBRI, Roorkee. Undia.
- Usman LA, Ismaeel RO, Zubair MF, Saliu BK, Olawore NO et Elelu N. (2013).** Comparative studies of constituents and antibacterial activities of leaf and fruit essential oils of *Ocimum basilicum* grown in north central Nigeria. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 3: 47-52.
- Valero M et Giner M.J. (2006).** Effects of Antimicrobial Components of Essential Oils on Growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the Sensory Qualities of Carrot Broth. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 90-94.
- Vekiari S, Protopapadakis E, Papadopoulou P, Papanicolaou D, Panou C et Vamvakias M. (2002).** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agrcultural and Food Chemistry*, 5(1): 147-153.
- Viuda Martos M, Mohamady MA, Fernández López J, Abd El Razik KA, Omer EA, Pérez Alvarez JA et Sendra E. (2011).** *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22: 1715-1722.
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T et Thubthimthed S. (2005).** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76(2): 233-236.
- Wang W, Wu N, Zu YG et Fu YJ. (2008).** Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil compared to its main compounds. *Food chemistry*, 108 (3): 1019-
- Wei A et Shibamoto T J. (2007).** Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of agricultural and food chemestry*, 55: 1737-1742.
- Wei K, Louis H, Emori W, Idante P, Agwamba E, Cheng C, Eno E, Unimuke T. (2022).** Antispasmodic activity of carnosic acid extracted from *rosmarinus officinalis*: Isolation, spectroscopic characterization, DFT studies, and in silico molecular docking investigations. *Journal of Molecular Structure*, 1260, 132795.

- Wendakoon CN et Sakaguchi M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58: 280-283.
- Yadav M, Park S, Chae SW, Song JS, Chul Kim H. (2013).** Antimicrobial activities of *Eugenia caryophyllata* extract and its major chemical constituent eugenol against *Streptococcus pneumoniae*. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 121(12):1198-206.
- Yildirim A, Mavi A et Kara A. A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 411-420.
- Zaika LL. (1988).** Spices and herbs: their antibacterial activity and its determination. *Journal of food safety*, 23: 97-118.
- Zambonelli A, D'Aulerio A.Z, Severi A, Benvenuti S. Maggi L et Bianchi A. (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of essential oil research*, 16: 69– 74.
- Zani F, Massimo G, Benvenuti S, Bianchi A, Albasini A, Melegari M, Vampa G, Bellotti A et Mazza P. (1991).** Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and Salmonella/Microsome Reversion Assay. *Planta Medica*, 57: 237-241.
- Zhiri A et Baudoux D. (2005).** Huiles Essentielles Chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development. Luxembourg. 80 p.
- Znini M, Bouklah M, Majidi L, Kharchouf S, Aouiniti A, Bouyenzar A, Hammouti B, Costa J et El-Deyab S.S. (2011).** Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *International Journal of Electrochemical Science*, 6: 691-704.

Annexes

Annexe I: Techniques d'identification des bactéries

1. Coloration de Gram (Singleton, 1999).

Mode opératoire

- ◆ Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane ;
- ◆ il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante ;
- ◆ traité pendant une minute par la solution de lugol ;
- ◆ le frottis est de nouveau, rincé rapidement.
- ◆ Après le traitement avec l'éthanol (95°), la lame est maintenue inclinée : On fait couler le solvant sur le frottis pendant une à trois secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis ;
- ◆ Rincer à l'eau courante ;
- ◆ Faites une contre coloration de 30 secondes à la Fuschine basique diluée ;
- ◆ Rincer brièvement et sécher le frottis au buvard ;
- ◆ Examiner à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) ;
 - Les cellules à Gram positif sont en violet.
 - Les cellules à Gram négatif sont roses.

2. Principe de la galerie API 20 E (ref.20.100.BioMérieux).

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

3. Réactifs et disques

- ◆ Disque d'ONPG : pour la mise en évidence de la β -galactosidase.
- ◆ H₂O₂ volume 10: pour la recherche de la présence de catalase.
- ◆ Réactifs de Kowacs pour la détection de la présence d'indole.
- ◆ Disque OX (Oxydase) : pour la mise en évidence du cytochrome oxydase.

Tableau 01: Tableau d'identification par galerie AP20E (BioMérieux, 2006).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIO NS/ENZIMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-Nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	B-galactosidase (ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune (1)
ADH	L-Argine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge/orangé (2)
LCD	L-Lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge/orangé (2)
ODC	L-Ornithine	1,9	Ornithine Décarboxylase	jaune	rouge/orangé (2)
CIT	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du CITrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu (3)
H ₂ S	Sodium thiosulfate	0,075	Production d' H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir / fin liseré
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	rouge/orangé (2)
<u>TDA / immédiat</u>					
TDA	L-Tryptophane	0,38	Tryptophane Dés.Aminase	jaune	marron-rougeatre
<u>JAMES / Immédiat</u>					
IND	L-Tryptophane	0,19	Production d'INDole	vert pâle/jaune	rose
<u>VP1 + VP2 / 10 min.</u>					
VE	Sodium pyruvate	1,9	Production d'acétolne (voges Proskauer)	incolore	Rose / rouge (5)
GEL	Gélatine (Origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-Glucose	1,9	Fermentation/oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune - gris
MAN	D-Mannitol	1,9	Fermentation/oxydation (MANnitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	Inositol	1,9	Fermentation/oxydation (INOsitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-Sorbitol	1,9	Fermentation/oxydation (SORbitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-Rhamnose	1,9	Fermentation/oxydation (RHAmmose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-Saccharose	1,9	Fermentation/oxydation (SACcharose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-Melibiose	1,9	Fermentation/oxydation (MELibiose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	0,57	Fermentation/oxydation (AMYgdaline)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-Arabinose	1,9	Fermentation/oxydation (ARAbinose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune

Tableau 02: Lecture d'une galerie biochimique classique (Marshall, 1982).

Tests	Substrats	Réactions / enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
Uréase	Urée - indole	Possession d'une uréase	Orange	Rouge
Catalase	H ₂ O ₂	Possession d'une catalase	Pas de bulles	Présence de bulles
ONPG	2-Nitro-Phényl-Galactopyranoside	Bêta galactosidase	Incolore	Jaune
LDC	L-lysine	L-décarboxylase	Violet	Jaune
ODC	L-ornithine	O-décarboxylase	Violet	Jaune
ADH	L-arginine	A-dihydrolase	Violet	Jaune
Mannitol			Rouge	Jaune
Mobilité	D-mannitol	Dégradation du mannitol et voir la mobilité du germe	Diffusion de la bactérie à travers la ligne de croissance	
Citrate de Simmons	Citrate	Utilisation du citrate comme source de carbone	Vert	Bleu

Annexe II : Huiles essentielles extraites

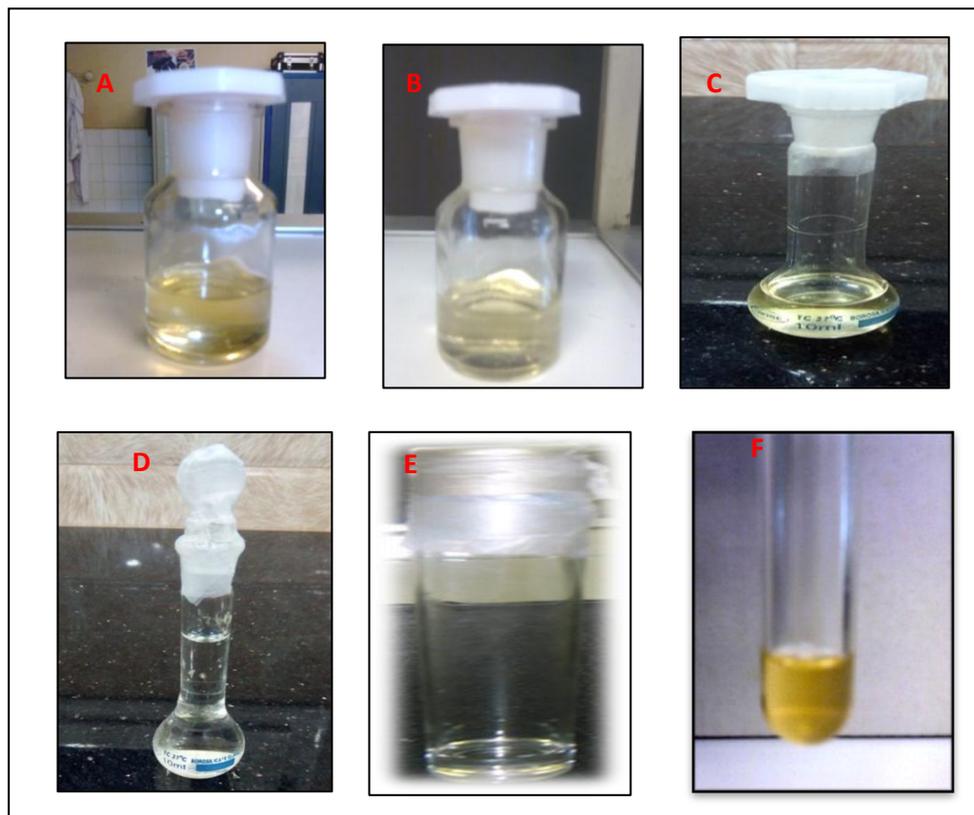


Figure 01: Huiles essentielles extraites.

A: H.E d'*Eugenia caryophyllata*, **B:** HE de *Carum carvi*, **C:** H.E de *Foeniculum vulgare*, **D:** H.E d'*Ocimum basilicum*, **E:** H.E de *Mentha spicata*, **F:** H.E de *Mentha pulegium*.

Annexe III: Profils chromatographiques des huiles essentielles par GC /MS

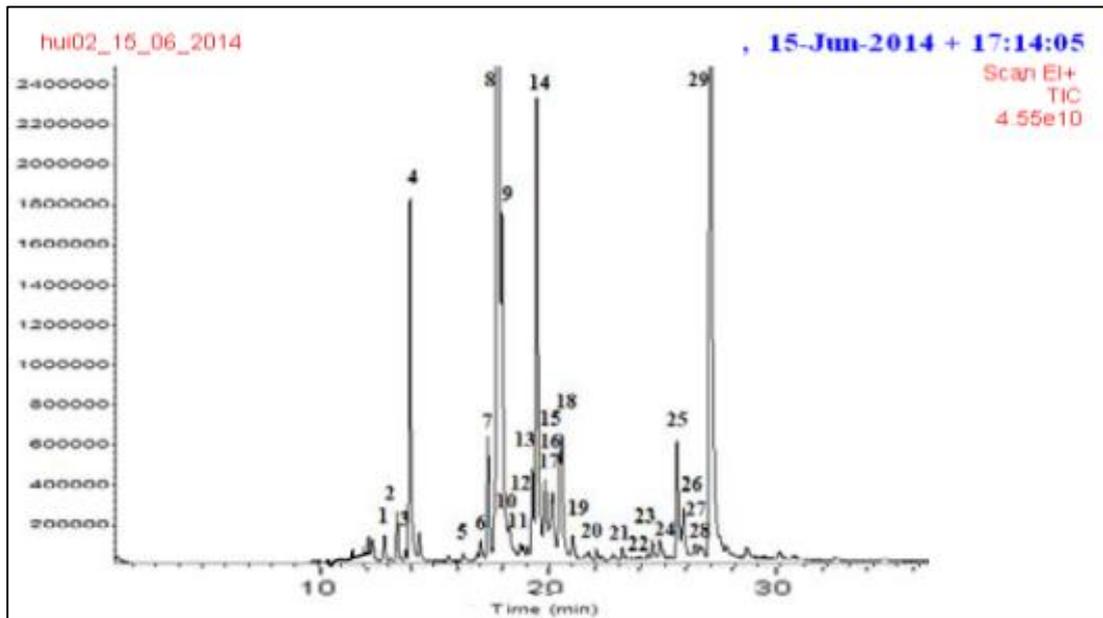


Figure 02: Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Ocimum basilicum* L. par CG/SM.

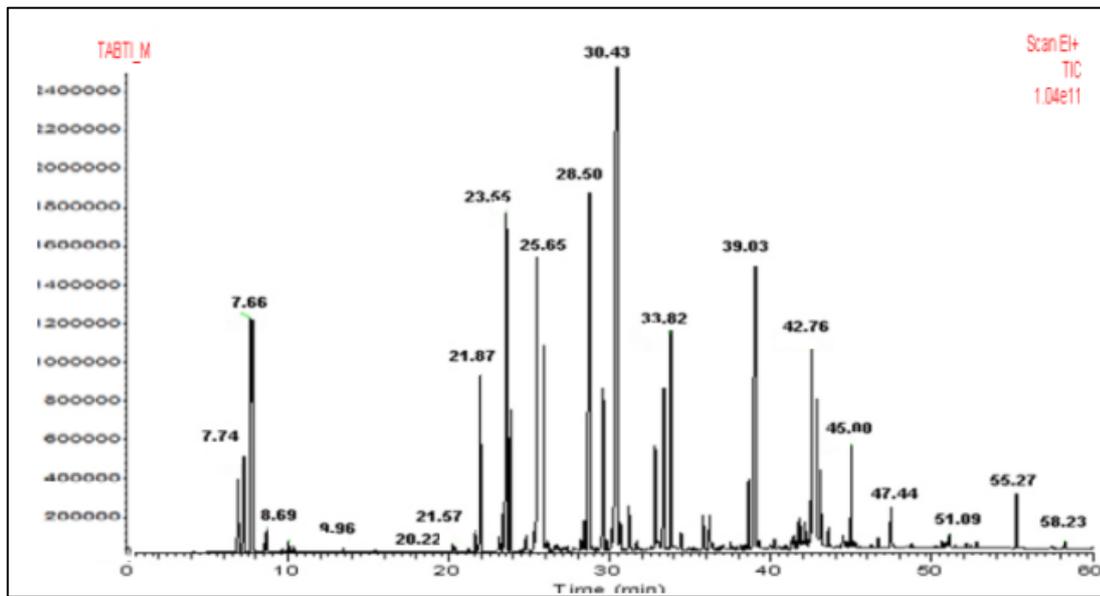


Figure 03: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par CG/SM.

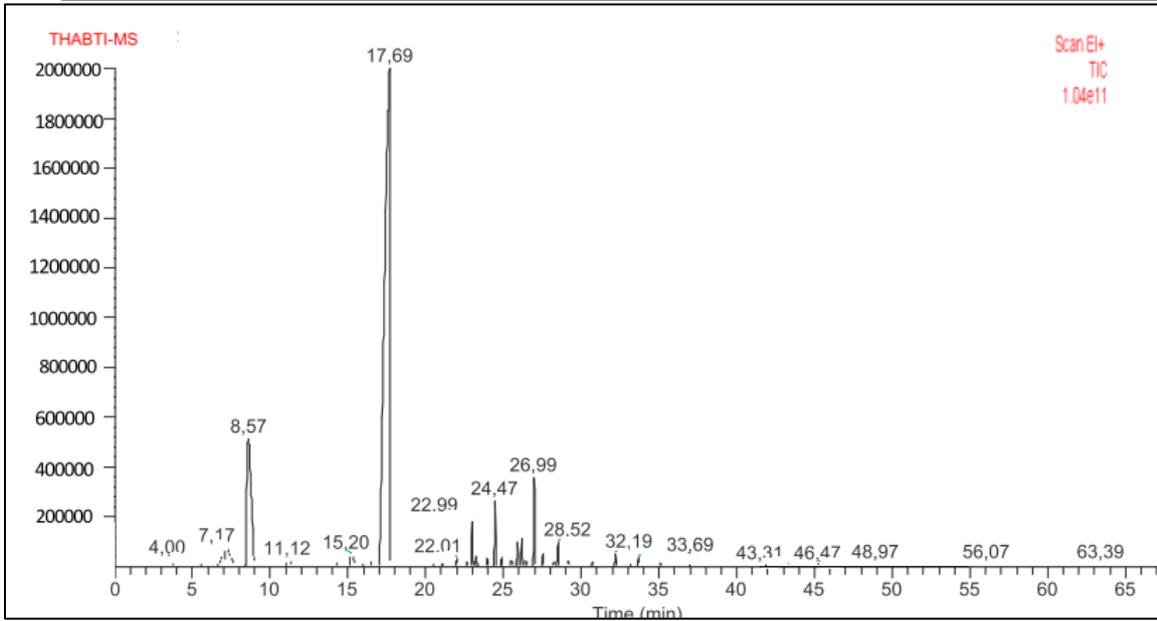


Figure 04: Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par CG/SM.

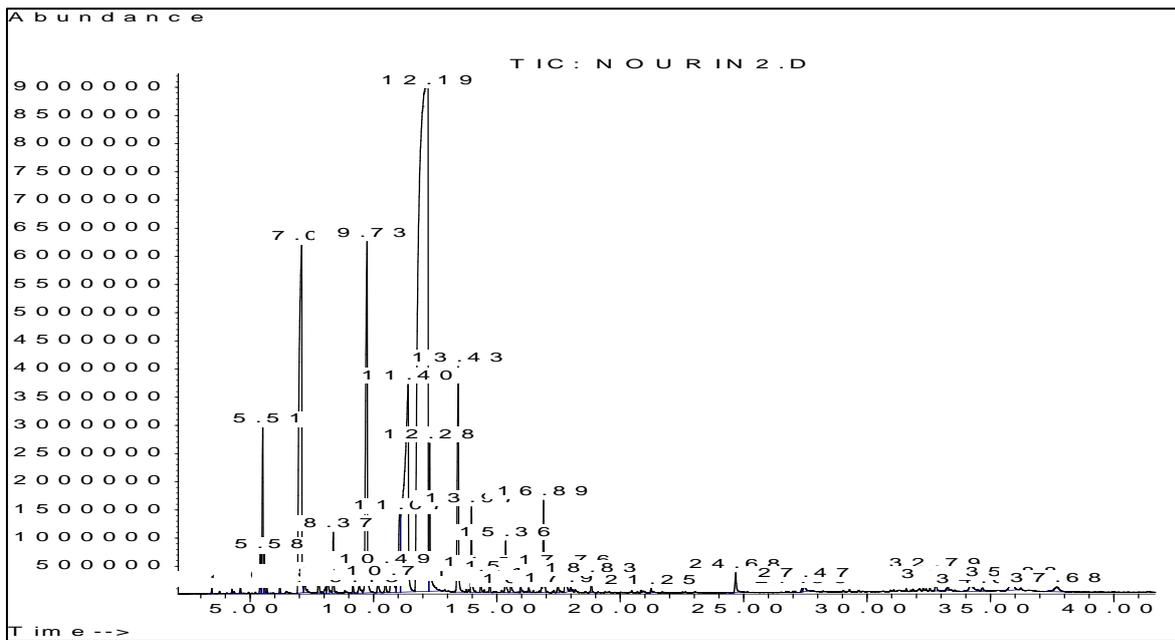


Figure 05: Profil chromatographique de l'H. E. de *Foeniculum vulgare* par CG/SM.

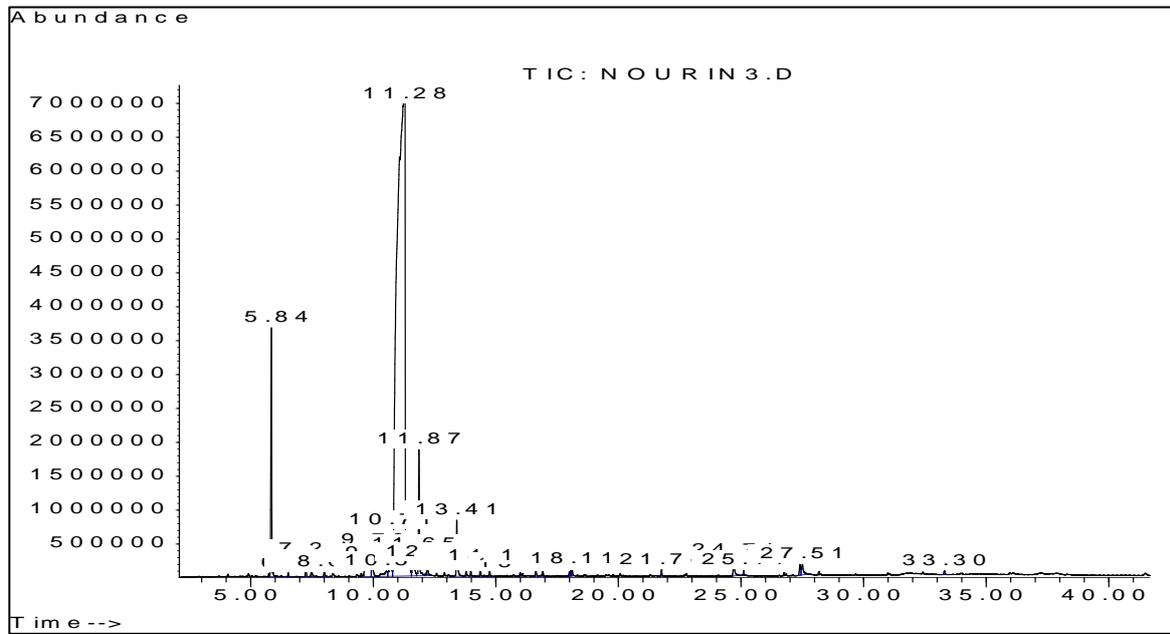


Figure 06: Profil chromatographique de l'H. E. de *Carum carvi* par CG/SM.

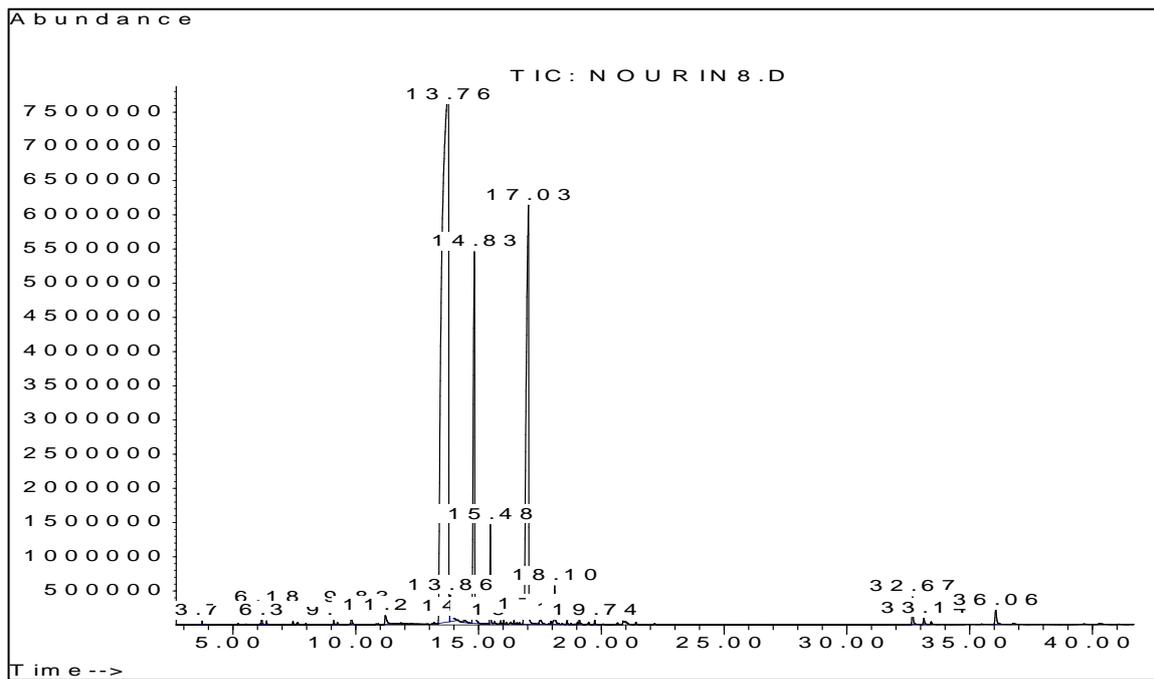


Figure 07: Profil chromatographique de l'H. E. d'*Eugenia caryophyllata* par CG/SM.

Annexe VI : Examens bactériologiques

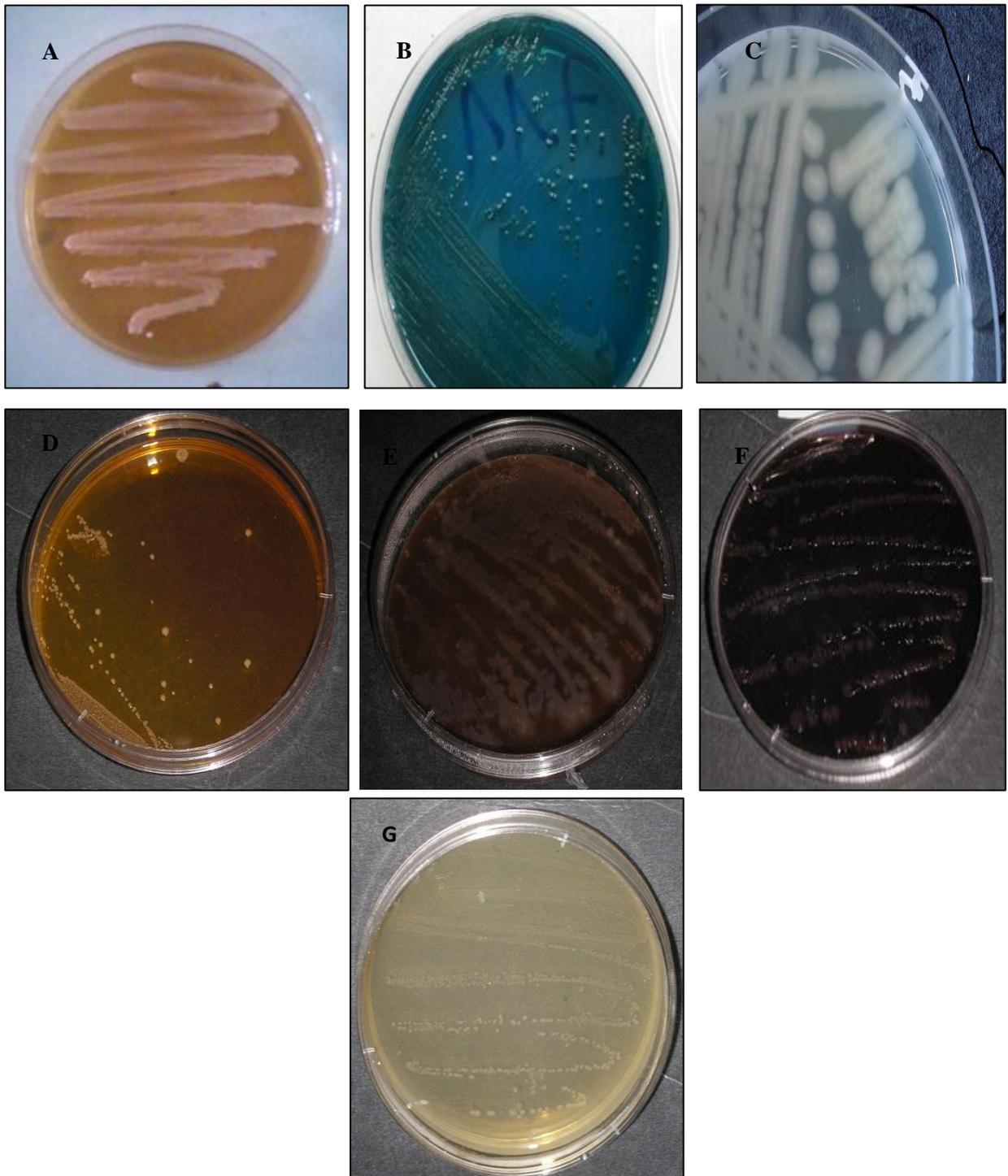


Figure 08: Aspect des colonies des bactéries isolées.

A: *Salmonella typhi* sur gélose SS, **B:** *Proteus mirabilis* sur gélose Hektoen, **C:** *B. cereus* sur gélose nutritive, **D:** *S. aureus* sur gélose Chapman, **E:** *Helicobacter pylori* sur gélose chocola, **F :** *Escherichia coli* sur milieu EMB, **G :** *C. freundii* sur gélose nutritive.

Annexe V : Effet des antibiotiques sur les bactéries testées

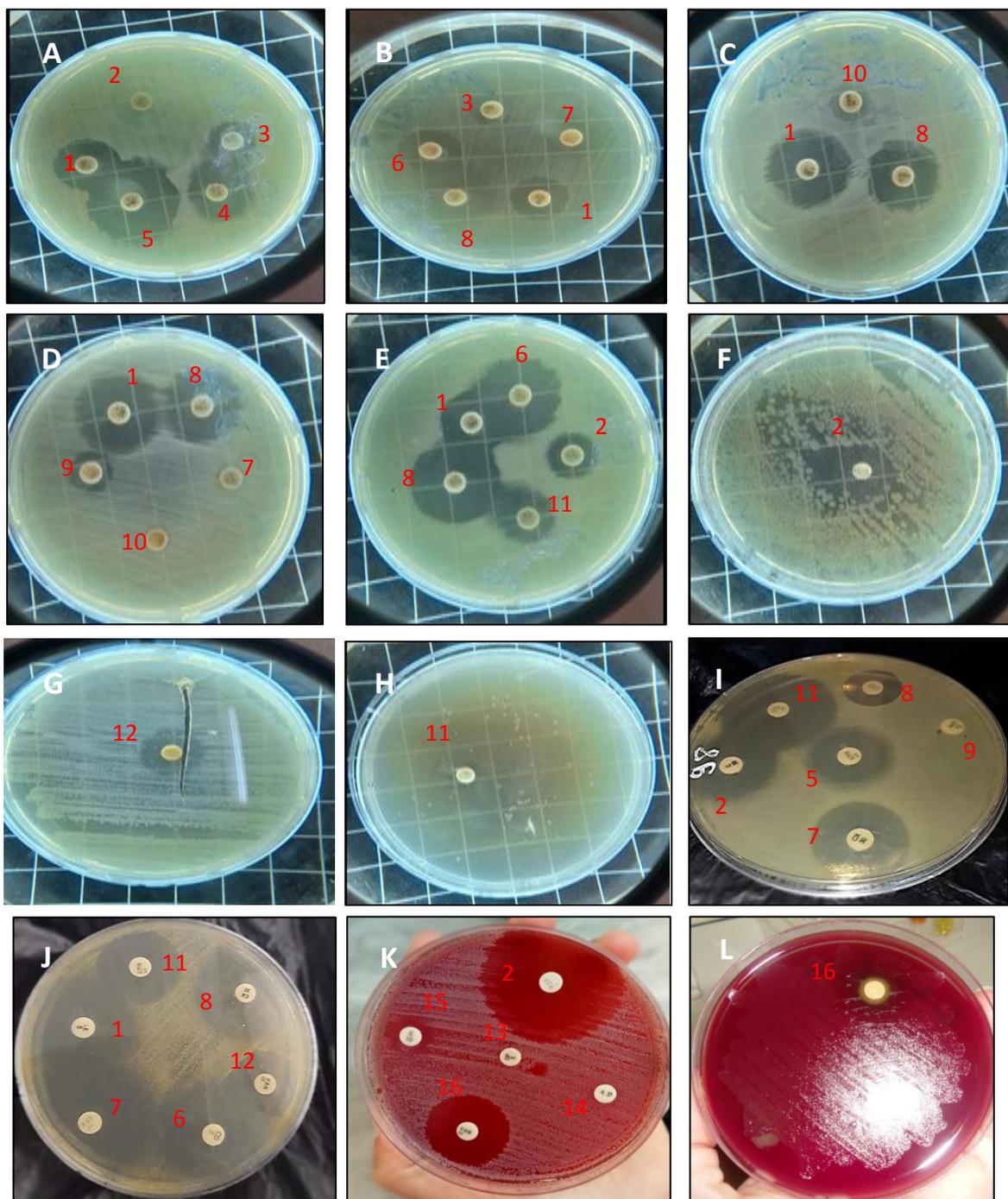


Figure 09: Effet des antibiotiques sur les bactéries isolées.

A : *E. Coli*, **B :** *P.mirabilis*, **C:** *B. cereus*, **D:** *S. aureus*, **E:** *C.perfringens*, **F:** *P.mirabilis*, **G:** *S. aureus*,
H: *S. aureus*, **I:** *C.frendii*, **J:** *S. typhi*, **K:** *H.pylori*, **L:** *H. pylori*.

1. Gentamicine, 2. Amoxicilline + Acide clavulanique, 3. Ticarcilline, 4. Ertapénème, 5. Imipénème, 6. Vancomycine, 7. Rifampicine, 8. Kanamycine, 9. Céfadroxil, 10. Chloramphenicol, 11. Tobramycine, 12. Amoxicilline, 13. Tétracycline, 14. Ciprofloxacine, 15. Erythromycine, 16. Clarithromycine.

Annexe VI : Différence significative de Tukey

Tableau 03: Comparaisons multiples

Variable dépendante	(I) Plante	(J) Plante	Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
						Borne inférieure	Borne supérieure
Taux d'humidité	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	6,32333*	,42828	,000	4,8848	7,7619
		<i>Mentha pulegium</i>	21,56267*	,42828	,000	20,1241	23,0012
		<i>Foeniculum vulgare</i>	57,48333*	,42828	,000	56,0448	58,9219
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	56,45000*	,42828	,000	55,0114	57,8886
		<i>Carum carvi</i>	56,44667*	,42828	,000	55,0081	57,8852
	<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-6,32333*	,42828	,000	-7,7619	-4,8848
		<i>Mentha pulegium</i>	15,23933*	,42828	,000	13,8008	16,6779
		<i>Foeniculum vulgare</i>	51,16000*	,42828	,000	49,7214	52,5986
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	50,12667*	,42828	,000	48,6881	51,5652
		<i>Carum carvi</i>	50,12333*	,42828	,000	48,6848	51,5619
	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-21,56267*	,42828	,000	-23,0012	-20,1241
		<i>Mentha spicata</i>	-15,23933*	,42828	,000	-16,6779	-13,8008
		<i>Foeniculum vulgare</i>	35,92067*	,42828	,000	34,4821	37,3592
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	34,88733*	,42828	,000	33,4488	36,3259
		<i>Carum carvi</i>	34,88400*	,42828	,000	33,4454	36,3226
	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-57,48333*	,42828	,000	-58,9219	-56,0448
		<i>Mentha spicata</i>	-51,16000*	,42828	,000	-52,5986	-49,7214
		<i>Mentha pulegium</i>	-35,92067*	,42828	,000	-37,3592	-34,4821

		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-1,03333	,42828	,226	-2,4719	,4052
		<i>Carum carvi</i>	-1,03667	,42828	,223	-2,4752	,4019
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-56,45000*	,42828	,000	-57,8886	-55,0114
		<i>Mentha spicata</i>	-50,12667*	,42828	,000	-51,5652	-48,6881
		<i>Mentha pulegium</i>	-34,88733*	,42828	,000	-36,3259	-33,4488
		<i>Foeniculum vulgare</i>	1,03333	,42828	,226	-,4052	2,4719
		<i>Carum carvi</i>	-,00333	,42828	1,000	-1,4419	1,4352
	<i>Carum carvi</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-56,44667*	,42828	,000	-57,8852	-55,0081
		<i>Mentha spicata</i>	-50,12333*	,42828	,000	-51,5619	-48,6848
		<i>Mentha pulegium</i>	-34,88400*	,42828	,000	-36,3226	-33,4454
		<i>Foeniculum vulgare</i>	1,03667	,42828	,223	-,4019	2,4752
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	,00333	,42828	1,000	-1,4352	1,4419
Rendement	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	-,86333*	,05799	,000	-1,0581	-,6685
		<i>Mentha pulegium</i>	-1,23000*	,05799	,000	-1,4248	-1,0352
		<i>Foeniculum vulgare</i>	,24667*	,05799	,011	,0519	,4415
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,45000*	,05799	,000	-,6448	-,2552
		<i>Carum carvi</i>	-3,35000*	,05799	,000	-3,5448	-3,1552
	<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	,86333*	,05799	,000	,6685	1,0581
		<i>Mentha pulegium</i>	-,36667*	,05799	,000	-,5615	-,1719
		<i>Foeniculum vulgare</i>	1,11000*	,05799	,000	,9152	1,3048
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	,41333*	,05799	,000	,2185	,6081
		<i>Carum carvi</i>	-2,48667*	,05799	,000	-2,6815	-2,2919
	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	1,23000*	,05799	,000	1,0352	1,4248
		<i>Mentha spicata</i>	,36667*	,05799	,000	,1719	,5615
		<i>Foeniculum vulgare</i>	1,47667*	,05799	,000	1,2819	1,6715

	<i>Eugenia caryophyllata</i>		,78000*	,05799	,000	,5852	,9748
	<i>Carum carvi</i>		-2,12000*	,05799	,000	-2,3148	-1,9252
Foeniculum vulgare	<i>Ocimum basilicum</i>		-,24667*	,05799	,011	-,4415	-,0519
	<i>Mentha spicata</i>		-1,11000*	,05799	,000	-1,3048	-,9152
	<i>Mentha pulegium</i>		-1,47667*	,05799	,000	-1,6715	-1,2819
	<i>Eugenia caryophyllata</i>		-,69667*	,05799	,000	-,8915	-,5019
	<i>Carum carvi</i>		-3,59667*	,05799	,000	-3,7915	-3,4019
Eugenia caryophyllata	<i>Ocimum basilicum</i>		,45000*	,05799	,000	,2552	,6448
	<i>Mentha spicata</i>		-,41333*	,05799	,000	-,6081	-,2185
	<i>Mentha pulegium</i>		-,78000*	,05799	,000	-,9748	-,5852
	<i>Foeniculum vulgare</i>		,69667*	,05799	,000	,5019	,8915
	<i>Carum carvi</i>		-2,90000*	,05799	,000	-3,0948	-2,7052
Carum carvi	<i>Ocimum basilicum</i>		3,35000*	,05799	,000	3,1552	3,5448
	<i>Mentha spicata</i>		2,48667*	,05799	,000	2,2919	2,6815
	<i>Mentha pulegium</i>		2,12000*	,05799	,000	1,9252	2,3148
	<i>Foeniculum vulgare</i>		3,59667*	,05799	,000	3,4019	3,7915
	<i>Eugenia caryophyllata</i>		2,90000*	,05799	,000	2,7052	3,0948
La densité	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	,031000*	,002186	,000	,02366	,03834
		<i>Mentha pulegium</i>	,020000*	,002186	,000	,01266	,02734
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-,009000*	,002186	,014	-,01634	-,00166
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,095000*	,002186	,000	-,10234	-,08766
		<i>Carum carvi</i>	,048000*	,002186	,000	,04066	,05534
	<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,031000*	,002186	,000	-,03834	-,02366
		<i>Mentha pulegium</i>	-,011000*	,002186	,003	-,01834	-,00366
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-,040000*	,002186	,000	-,04734	-,03266
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,126000*	,002186	,000	-,13334	-,11866

		<i>Carum carvi</i>	,017000*	,002186	,000	,00966	,02434
<i>Mentha pulegium</i>		<i>Ocimum basilicum</i>	-,020000*	,002186	,000	-,02734	-,01266
		<i>Mentha spicata</i>	,011000*	,002186	,003	,00366	,01834
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-,029000*	,002186	,000	-,03634	-,02166
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,115000*	,002186	,000	-,12234	-,10766
		<i>Carum carvi</i>	,028000*	,002186	,000	,02066	,03534
<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Ocimum basilicum</i>	,009000*	,002186	,014	,00166	,01634
		<i>Mentha spicata</i>	,040000*	,002186	,000	,03266	,04734
		<i>Mentha pulegium</i>	,029000*	,002186	,000	,02166	,03634
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,086000*	,002186	,000	-,09334	-,07866
		<i>Carum carvi</i>	,057000*	,002186	,000	,04966	,06434
<i>Eugenia caryophyllata</i>		<i>Ocimum basilicum</i>	,095000*	,002186	,000	,08766	,10234
		<i>Mentha spicata</i>	,126000*	,002186	,000	,11866	,13334
		<i>Mentha pulegium</i>	,115000*	,002186	,000	,10766	,12234
		<i>Foeniculum vulgare</i>	,086000*	,002186	,000	,07866	,09334
		<i>Carum carvi</i>	,143000*	,002186	,000	,13566	,15034
<i>Carum carvi</i>		<i>Ocimum basilicum</i>	-,048000*	,002186	,000	-,05534	-,04066
		<i>Mentha spicata</i>	-,017000*	,002186	,000	-,02434	-,00966
		<i>Mentha pulegium</i>	-,028000*	,002186	,000	-,03534	-,02066
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-,057000*	,002186	,000	-,06434	-,04966
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,143000*	,002186	,000	-,15034	-,13566
Indice de réfraction	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	,0350667*	,0060894	,001	,014613	,055520
		<i>Mentha pulegium</i>	,0242000*	,0060894	,018	,003746	,044654
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-,0067000	,0060894	,872	-,027154	,013754
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,0230333*	,0060894	,024	-,043487	-,002580
		<i>Carum carvi</i>	,3813000*	,0060894	,000	,360846	,401754

<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,0350667*	,0060894	,001	-,055520	-,014613	
	<i>Mentha pulegium</i>	-,0108667	,0060894	,509	-,031320	,009587	
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-,0417667*	,0060894	,000	-,062220	-,021313	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,0581000*	,0060894	,000	-,078554	-,037646	
	<i>Carum carvi</i>	,3462333*	,0060894	,000	,325780	,366687	
<i>Mentha pulegium</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,0242000*	,0060894	,018	-,044654	-,003746	
	<i>Mentha spicata</i>	,0108667	,0060894	,509	-,009587	,031320	
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-,0309000*	,0060894	,003	-,051354	-,010446	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,0472333*	,0060894	,000	-,067687	-,026780	
	<i>Carum carvi</i>	,3571000*	,0060894	,000	,336646	,377554	
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	,0067000	,0060894	,872	-,013754	,027154	
	<i>Mentha spicata</i>	,0417667*	,0060894	,000	,021313	,062220	
	<i>Mentha pulegium</i>	,0309000*	,0060894	,003	,010446	,051354	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,0163333	,0060894	,150	-,036787	,004120	
	<i>Carum carvi</i>	,3880000*	,0060894	,000	,367546	,408454	
<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	,0230333*	,0060894	,024	,002580	,043487	
	<i>Mentha spicata</i>	,0581000*	,0060894	,000	,037646	,078554	
	<i>Mentha pulegium</i>	,0472333*	,0060894	,000	,026780	,067687	
	<i>Foeniculum vulgare</i>	,0163333	,0060894	,150	-,004120	,036787	
	<i>Carum carvi</i>	,4043333*	,0060894	,000	,383880	,424787	
<i>Carum carvi</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,3813000*	,0060894	,000	-,401754	-,360846	
	<i>Mentha spicata</i>	-,3462333*	,0060894	,000	-,366687	-,325780	
	<i>Mentha pulegium</i>	-,3571000*	,0060894	,000	-,377554	-,336646	
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-,3880000*	,0060894	,000	-,408454	-,367546	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-,4043333*	,0060894	,000	-,424787	-,383880	
Indice d'acide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	-,285000*	,034306	,000	-,40023	-,16977

	<i>Mentha pulegium</i>	,095000	,034306	,131	-,02023	,21023
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-1,405667*	,034306	,000	-1,52090	-1,29043
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	,211000*	,034306	,001	,09577	,32623
	<i>Carum carvi</i>	-,269000*	,034306	,000	-,38423	-,15377
<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	,285000*	,034306	,000	,16977	,40023
	<i>Mentha pulegium</i>	,380000*	,034306	,000	,26477	,49523
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-1,120667*	,034306	,000	-1,23590	-1,00543
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	,496000*	,034306	,000	,38077	,61123
	<i>Carum carvi</i>	,016000	,034306	,997	-,09923	,13123
<i>Mentha pulegium</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,095000	,034306	,131	-,21023	,02023
	<i>Mentha spicata</i>	-,380000*	,034306	,000	-,49523	-,26477
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-1,500667*	,034306	,000	-1,61590	-1,38543
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	,116000*	,034306	,048	,00077	,23123
	<i>Carum carvi</i>	-,364000*	,034306	,000	-,47923	-,24877
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	1,405667*	,034306	,000	1,29043	1,52090
	<i>Mentha spicata</i>	1,120667*	,034306	,000	1,00543	1,23590
	<i>Mentha pulegium</i>	1,500667*	,034306	,000	1,38543	1,61590
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	1,616667*	,034306	,000	1,50143	1,73190
	<i>Carum carvi</i>	1,136667*	,034306	,000	1,02143	1,25190
<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	-,211000*	,034306	,001	-,32623	-,09577
	<i>Mentha spicata</i>	-,496000*	,034306	,000	-,61123	-,38077
	<i>Mentha pulegium</i>	-,116000*	,034306	,048	-,23123	-,00077
	<i>Foeniculum vulgare</i>	-1,616667*	,034306	,000	-1,73190	-1,50143
	<i>Carum carvi</i>	-,480000*	,034306	,000	-,59523	-,36477
<i>Carum carvi</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	,269000*	,034306	,000	,15377	,38423
	<i>Mentha spicata</i>	-,016000	,034306	,997	-,13123	,09923

		<i>Mentha pulegium</i>	,364000*	,034306	,000	,24877	,47923
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-1,136667*	,034306	,000	-1,25190	-1,02143
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	,480000*	,034306	,000	,36477	,59523
Indice d'ester	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Mentha spicata</i>	-6,69000*	,03590	,000	-6,8106	-6,5694
		<i>Mentha pulegium</i>	-5,58000*	,03590	,000	-5,7006	-5,4594
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-13,72000*	,03590	,000	-13,8406	-13,5994
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-22,56000*	,03590	,000	-22,6806	-22,4394
		<i>Carum carvi</i>	-57,60000*	,03590	,000	-57,7206	-57,4794
	<i>Mentha spicata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	6,69000*	,03590	,000	6,5694	6,8106
		<i>Mentha pulegium</i>	1,11000*	,03590	,000	,9894	1,2306
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-7,03000*	,03590	,000	-7,1506	-6,9094
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-15,87000*	,03590	,000	-15,9906	-15,7494
		<i>Carum carvi</i>	-50,91000*	,03590	,000	-51,0306	-50,7894
	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	5,58000*	,03590	,000	5,4594	5,7006
		<i>Mentha spicata</i>	-1,11000*	,03590	,000	-1,2306	-,9894
		<i>Foeniculum vulgare</i>	-8,14000*	,03590	,000	-8,2606	-8,0194
		<i>Eugenia caryophyllata</i>	-16,98000*	,03590	,000	-17,1006	-16,8594
<i>Carum carvi</i>		-52,02000*	,03590	,000	-52,1406	-51,8994	
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	13,72000*	,03590	,000	13,5994	13,8406	
	<i>Mentha spicata</i>	7,03000*	,03590	,000	6,9094	7,1506	
	<i>Mentha pulegium</i>	8,14000*	,03590	,000	8,0194	8,2606	
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	-8,84000*	,03590	,000	-8,9606	-8,7194	
	<i>Carum carvi</i>	-43,88000*	,03590	,000	-44,0006	-43,7594	
<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	22,56000*	,03590	,000	22,4394	22,6806	
	<i>Mentha spicata</i>	15,87000*	,03590	,000	15,7494	15,9906	

	<i>Mentha pulegium</i>	16,98000*	,03590	,000	16,8594	17,1006
	<i>Foeniculum vulgare</i>	8,84000*	,03590	,000	8,7194	8,9606
	<i>Carum carvi</i>	-35,04000*	,03590	,000	-35,1606	-34,9194
<i>Carum carvi</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	57,60000*	,03590	,000	57,4794	57,7206
	<i>Mentha spicata</i>	50,91000*	,03590	,000	50,7894	51,0306
	<i>Mentha pulegium</i>	52,02000*	,03590	,000	51,8994	52,1406
	<i>Foeniculum vulgare</i>	43,88000*	,03590	,000	43,7594	44,0006
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	35,04000*	,03590	,000	34,9194	35,1606

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

Publication

Liste des communications et publication

Séminaires internationaux

- Effet de *Lactococcus lactis* locales sur des bactéries impliquées dans la pathologie digestive (Etude *in vitro*). Séminaire international sur : Filière Lait: Productions et Biotechnologies. Chlef, Algérie, 02 et 03 décembre 2008.

Auteurs: Tabti M, Dilmi- Bouras A et Allem R.

- Effet des souches de *Lactococcus lactis* sur *Helicobacter pylori in vitro*. Séminaire international sur : Filière Lait: Productions et Biotechnologies. Chlef, Algérie, 02 et 03 décembre 2008.

Auteurs: Allem R, Dilmi- Bouras A et **Tabti M**.

- Effet des huiles essentielles extraites à partir des graines sur les bactéries impliquées dans la pathologie gastro-intestinale. Séminaire international sur : Les plantes médicinales. Chlef, Algérie, novembre 2012.

Auteurs: Tabti M et Allem R.

Séminaires nationaux

- Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles sur *Helicobacter pylori*. Journée scientifiques sur la biotechnologie de la reproduction des animaux Chlef, Algeria, 28 février et 01 Mars 2018.

Auteurs: Tabti M et Allem R.

- Effet des huiles essentielles extraites des feuilles de *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Eucalyptus camaldulensis* sur des bactéries impliquées dans la pathologie gastrointestinale. Le premier séminaire National de la Nutrition et Santé Chlef, Algérie, 16 et 17 Décembre 2019.

Auteurs: Tabti M et Allem R.

Publication internationale

- **TABTI Meriem, ALLEM Rachida et MEROUANE Abdelaziz. (2019).** Chemical profiles and efficacy of essential oils obtained from three spice against

Helicobacter pylori. Perfiles químicos y eficacia de los aceites esenciales obtenidos a partir de tres especias contra *Helicobacter pylori*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2019; 24(3):e668. Esta obra está bajo una licencia. https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es_ES

Chemical profiles and efficacy of essential oils obtained from three spices against *Helicobacter pylori*

Perfiles químicos y eficacia de los aceites esenciales obtenidos a partir de tres
especies contra *Helicobacter pylori*

Meriem Tabti¹ <https://orcid.org/0000-0002-3900-0636>

Abdelaziz Merouane^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-0900-4625>

Rachida Allem¹ <https://orcid.org/0000-0003-2970-2543>

¹Hassiba Benbouali University, Laboratory of Natural Bio-Ressources, Faculty of Life and
Natural Sciences. Chlef, Algeria.

* Author for correspondence: merouanaziz@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: the medicinal herbs constitute one of the most preferred alternative solutions as antimicrobial agents due to their availability, biodegradability, fewer side effects. Unfortunately, rare are the studies focused on the efficacy of plant extracts against *Helicobacter pylori* to either confirm or refute their effectiveness.

Objective: determinate the chemical profiles and evaluate the antibacterial activity against *Helicobacter pylori* of the essential oils obtained from *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* and *Carum carvi*.

Methods: the essential oils obtained from flower buds of *Eugenia caryophyllata* and seeds of *Foeniculum vulgare* and *Carum carvi* were extracted by hydrodistillation. The antibacterial potency against local clinical isolate of *Helicobacter pylori* was tested using agar disc diffusion and minimum inhibitory concentration techniques and the chemical composition was determined via gas chromatography-mass spectrometry.

Results: the phytochemical analysis identified *trans*-anethole (43.01%), estragole (27.04%) and fenchone (06.63%) as main compounds in *F. vulgare* oil. Carvone and α -pinene were defined as major components of *C. carvi* oil with 63.92% and 8.43% respectively, whereas the abundant constituents of *E. caryophyllata* were eugenol

(65.22%), eugenyl acetate (18.77%) and *trans*-caryophyllene (9.92%). The strongest anti *H. pylori* activity was exhibited by *F. vulgare* oil reaching similar action of Clarithromycin ($p < 0.05$) used as positive control.

Conclusion: this is the first report showing the potency of essential oils from spices against *H. pylori*, the results indicated that these resources can constitute potential natural treatment.

Keywords: carvone; *trans*-anethol; eugenol; medicinal herbs; gastric cancer.

RESUMEN

Introducción: las hierbas medicinales constituyen una de las soluciones alternativas preferidas para desempeñar el papel de agentes antimicrobianos debido a su disponibilidad, biodegradabilidad y pocos efectos secundarios. Desafortunadamente, son raros los estudios centrados en la eficacia de los extractos de las plantas contra *Helicobacter pylori* que confirman o refutan su eficacia.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* de los aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* y *Carum carvi*.

Métodos: los aceites esenciales obtenidos de los brotes de la flor del *E. caryophyllata*, de semillas del *F. vulgare* y del *C. carvi* fueron extraídos por el *hydrodistillation*. La potencia antibacteriana contra el aislante clínico local *Helicobacter pylori* fue probada usando la difusión del disco del agar. Las técnicas de concentración inhibitoria mínima y la composición química fueron determinadas vía cromatografía del gas, espectrometría de masas.

Resultados: los análisis fitoquímicas de los aceites esenciales identificado *trans*-anethole (43,01 %), estragole (27,04 %) y fenchone (6,63 %) como compuestos mayoritarios en *F. vulgare*. El aceite extraído del *C. carvi* reveló la presencia del carvone y α -pinene con los compuestos abundantes a 63,92 % y 8,43 % respectivamente, mientras que los componentes principales para *E. caryophyllata* eran el eugenol (65,22 %), eugenyl acetate (18,77 %) y *trans*-caryophyllene (9,92 %). De los aceites esenciales obtenidos, el de *F. vulgare* presentó mayor actividad anti-*H. pylori*, con la acción similar al del Clarithromycin ($p < 0,05$) usada como control positivo.

Conclusión: los aceites esenciales de *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* y *Carum carvi* pueden constituir un potencial tratamiento natural contra *H. pylori*.

Palabras clave: carvone; *trans*-anethol; eugenol; hierbas medicinales; cáncer gástrico.

Recibido: 16/10/2018.

Aceptado: 10/12/2019.

Introduction

Infectious diseases caused by microbial pathogens affect millions of people around the world without frontiers with variation in the effects depending on their pathogenicity and development level of countries/regions affected. Indeed, the majority of infections occur in developing nations where it can attain 100% of population.⁽¹⁾

Helicobacter pylori, a ubiquitous gastric microbe, infects more than half of the world's population and can accompany human for decades since the early childhood.⁽²⁾ Infection with *H. pylori* is a major risk factor to arouse peptic ulcer disease and increases the probability to express gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by three to six folds.⁽³⁾ In relation to the high risk of gastric cancer of this bacterium, the International Agency for Research on Cancer⁽⁴⁾ has categorized *H. pylori* infections as type I of carcinogen.

The ideal tendency to avoid *H. pylori* pathologies is to eradicate this rogue pathogen. In fact, defeat in the eradication route (patients with peptic ulcer disease) increase the ulcer recurrence at more than 55% compared with 10% for success cases.⁽⁵⁾ However, successful *H. pylori* elimination may be not an optimal clinical achievement without suitable eradication regimen even with complex therapeutic treatment.⁽⁶⁾

Currently, the triple therapy involving two antibiotics metronidazole and clarithromycin accompanied with inhibition of acid secretion is the conventional clinical treatment in the fight against *H. pylori*.⁽⁷⁾ However, the major obstacle of this heavy treatment is related to the antibiotic resistance.⁽⁸⁾ This great hindrance is generally related to various factors such as half-life and instability of antibiotics in stomach acidity⁽⁶⁾ and limited antibiotic action on mucosal surface without effect on “*invasive H. Pylori*”⁽³⁾ that can colonize intercellular spaces and the lamina propria.^(9,10) Thus, some researchers have argued the effectiveness of nature to control *H. pylori* infections.^(7,8,9,10,11)

The medicinal herbs constitute one of the most preferred alternative solutions as antimicrobial agents for the modern communities due to their availability, biodegradability, fewer side effects and less toxicity. Unfortunately, rare are the studies

focused on the effect of plant extracts against *H. pylori* to either confirm or refute their effectiveness. To the best of our knowledge, no previous scientific reports have been published on antibacterial effects of spices on *H. pylori*.

Therefore, the aim of this study is to determine the chemical profiles of essential oils of three commercial and widely consumed spices *Eugenia caryophyllata*, *Foeniculum vulgare* and *Carum carvi* and to test their possible action against clinical isolate of *H. pylori*.

Methods

Plant material and essential oil extraction

The flower buds of clove (*Eugenia caryophyllata*), fennel seeds (*Foeniculum vulgare*) and caraway seeds (*Carum carvi*) were purchased at a local market of Chlef (North-West of Algeria). 100 g of each spice were separately subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for 3 h. The oils were dried over anhydrous sodium sulphate and then stored in dark glass vials at +4 °C until analysis and bioassay.

GC-MS analysis

The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed on Hewlett-Packard 6890 series GC systems (Agilent Technologies) coupled to a quadrupole mass spectrometer (model HP 5973) equipped with an HP5 MS capillary column (5 % phenyl methylsiloxane, 30 m×0.25 mm, 0.25 µm film thickness). Analytical conditions were: injector temperature 250 °C, oven temperature: isothermal 60 °C, 8 minutes, to 250 °C at 2 °C/minute then, isothermal, 30 minutes; carrier gas helium at 0.5 mL/minute; split 1/20; ionization voltage, 70 eV; scan range, 35-500 uma.

Identification of the constituents was based on comparison of the retention times with those of authentic samples, comparing their linear retention indices relative to the series of n-hydrocarbons, and on computer matching against commercial (NIST 98 and ADAMS) and home-made library mass spectra (MS) built up from pure substances and components of known oils and MS literature data.⁽¹²⁾

Isolation and growth conditions of bacterial strain

The *Helicobacter pylori* strain was an endoscopic specimen received systematically at *Enterobacteriaceae* service's in Pasteur Institute of Algiers for diagnostic and antimicrobial susceptibility. Isolation was performed on Columbia agar supplemented with 10% horse blood and Helicobacter selective supplement (SR147E, Oxoid, England). Under microaerophilic atmosphere (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) in an anaerobic jar using BD GasPak EZ Pouch Systems at 37 °C for 2-14 days. *H. pylori* isolate was stored in brain heart infusion broth (BHIB) supplemented with 20% glycerol at -80 °C until tests.

Antibacterial bioassay

Antibacterial activity of essential oils was tested using disk diffusion method following Semeniuc *et al.*⁽¹³⁾ protocol. In brief, *H. pylori* suspension prepared at 10⁸ CFU/mL, was inoculated on Mueller Hinton agar supplemented with 10% (v/v) horse blood (MHA10%HB) plates by using cotton swabs. Sterile filter paper disks (Whatman paper no.3; Ø: 6 mm) were impregnated with 40µl of the essential oil and placed in the centre of agar surface. Disks without saturation were used as negative control, whereas the Clarithromycin (1µg/ml) was used as positive control. Each plate received one disc and all tests were carried out in triplicate. The plates were incubated for 48 H at 37 °C under microaerophilic conditions (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) in an anaerobic jar using BD GasPak EZ Pouch Systems. Zones of inhibition appearing around disks were measured and recorded in mm.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC assay of essential oils was tested using the modified method of Medjkane *et al.*⁽⁷⁾ Briefly, aliquots of essential oils were dissolved separately in liquid MHA10%HB supplemented with 5% (v/v) Tween 80 at 45 °C in test tubes (final volume: 15 mL) to obtain different concentrations (1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 and 1/5000 (v / v)). Rapidly vortexed, the emulsions were cooled in Petri dishes (Ø: 90 mm), then inoculated with the bacterial suspension (10⁶ CFU/ml) with a STEERS apparatus. In parallel, the negative control (essential oil free) was performed. All Plates were incubated in microaerophilic environment for 48 hours. The MIC was determined as the lowest concentration that completely inhibited the bacterial growth.

Statistical analysis

All tests were carried out in triplicate and in identical conditions. The statistical analysis (ANOVA one way) was accomplished using SPSS 16.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Differences between diameter inhibitions at $p \leq 0.05$ were regarded to be significant.

Results

Yield and composition of essential oils

The hydrodistillation extraction of essential oils from *E. caryophyllata*, *F. vulgare* and *C. carvi* spices yielded 1.3%, 0.6% and 4.2% (w/w) respectively.

The results about the chemical composition are given in Table 1. The components are listed in order of their retention time on the HP-5MS column. The GC-MS identified twenty compounds in the essential oil extracted from seeds of *F. vulgare* (97.36%) with dominance of *trans*-anethole (43.01%), estragole (27.04%) and fenchone (06.63%).

The chromatographical analysis identified twenty five constituents for *C. carvi* oil's that represent 95.25% of the total composition, the carvone and α -pinene were defined as the main components with 63.92% and 8.43% respectively as well as the limonene represented in the oil by 4.81%.

The quantitatively most important constituents in the essential oil isolated from *E. caryophyllata* were eugenol (65.22%), eugenyl acetate (18.77%) and *trans*-caryophyllene (9.92%), these compounds represents 93.91% from the total percentage identified (97.27%).

Table 1 -Chemical composition of essential oils obtained from three commercial spices.

N°	Compound	L.R.I	<i>Carum carvi</i> (%)	<i>Eugenia caryophyllata</i> (%)	<i>Foeniculum vulgare</i> (%)
1	α -thujene	931	-	-	0.12
2	α -pinene	935	8.43	tr	1.36
3	camphene	955	tr	-	0.27
4	sabinene	973	-	-	3.89
5	β -pinene	985	tr	tr	-
6	myrcene	992	-	-	1.36
7	α -phellandrene	1007	tr	-	1.16
8	eucalyptol	1015	1.83	-	-
9	<i>p</i> -cymene	1025	-	tr	-
10	limonene	1037	4.81	-	4.68
11	γ -terpinene	1061	0.30	-	2.27
12	fenchone	1089	-	-	06.63

13	linalool	1100	4.26	tr	3.22
14	<i>trans</i> -Perillyl alcohol	1116	tr	-	-
15	isocarveol	1129	2.07	-	-
16	limonene oxide	1140	tr	-	-
17	<i>trans</i> -verbenol	1145	tr	-	-
18	camphor	1148	-	-	0.23
19	<i>trans</i> -Perillaldehyde	1150	2.02	-	-
20	terpinen-4-ol	1178	-	-	0.31
21	α -terpineol	1194	0.14	-	-
22	verbenone	1204	-	-	1.03
23	<i>cis</i> -Dihydrocarvone	1208	1.47	-	-
24	<i>trans</i> -Carveol	1217	0.12	-	-
25	dihydrocarveol	1242	0.14	-	-
26	carvone	1244	63.92	tr	-
27	fenchyl acetate	1247	-	-	0.16
28	<i>trans</i> -anethole	1285	-	-	43.01
29	anethole	1288	2.49	tr	0.47
30	thymol	1290	-	-	0.15
31	estragole	1297	tr	-	27.04
32	eugenol	1355	-	65.22	-
33	α -copaene	1377	-	0.83	tr
34	β -cubebene	1390	0.3	-	-
35	β -caryophyllene	1421	1.24	tr	tr
36	<i>trans</i> -caryophyllene	1425	-	9.92	-
37	α -amorphene	1477	-	tr	-
38	α -humulene	1457	-	1.53	-
39	α -guaiene	1468	tr	-	-
40	β -selinene	1490	0.71	-	-
41	β -cadinene	1503	0.69	-	-
42	eugenyl acetate	1527	-	18.77	-
43	δ -cadinene	1530	-	0.25	-
44	caryophyllene oxide	1573	-	0.54	-
45	apiole	1678	0.31	-	-
46	farnesol II	1696	-	0.21	-
	Total	/	95.25	97.27	97.36

LRI: Linear retention index;
tr: trace ($\leq 0.1\%$).

The components are listed in order of their retention indices on HP-5MS column.

Antimicrobial activity of essential oils

Antimicrobial screening test using disc diffusion and MIC assays was employed to estimate the potencies of *E. caryophyllata*, *F. vulgare* and *C. carvi* oils against *H. pylori*. The results are shown in Table 2. As can be seen from this table, all essential oils exhibited anti *H. pylori* activity, the highest potency was exhibited by the *F. vulgare* oil showing 16.83 ± 1.42 mm as inhibition zone diameter with a lowest CMI recorded. This potential is comparable ($p < 0.05$) to the activity of Clarithromycin used as positive control prepared at $1 \mu\text{g/mL}$. The anti-*H. pylori* of essential oils isolated from *E. caryophyllata*

(13.83 ± 1.42 mm) and *C. carvi* (12.66 ± 2.11 mm) was moderate in comparison to the positive control (16.66 ± 0.93 mm), taking into the account the values of MIC test, *C. carvi* (1/500 v/v) exhibited a strong potential than *E. Caryophyllata* (1/1000 v/v) essential oil.

Table 2 -Antibacterial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*.

Essential oils	Diameter inhibition (mm)	MIC (v/v)
<i>Foeniculum vulgare</i>	16.83 ± 1.42 ^a	1/250
<i>Carum carvi</i>	12.66 ± 2.11 ^b	1/500
<i>Eugenia caryophyllata</i>	13.83 ± 1.42 ^b	1/1000
Clarithromycin	16.66 ± 0.93 ^a	NT

Notes: a-b: Values in the same column sharing different letters are significantly different (P < 0.05).
MIC, Minimum Inhibitory Concentration.
NT: not tested

Discussion

According to Raal *et al.*⁽¹⁴⁾ the yield of essential oil from *C. carvi* seeds from different European countries ranged from 0.6% to 5.4%. Our result is belongs to this interval, whereas the yield obtained from *F. vulgare* seeds is low than the previous extraction by Sellam *et al.*⁽¹⁵⁾ showing 2.8%.

In general, the essential oil yields from medicinal plants is a fluctuate factor that depends on multiple parameters such as, climatic conditions, harvesting date, storage period, origin, variety, cultivar or population.⁽¹⁶⁾

The compounds *trans*-anethole, estragole and fenchone are reported previously^(15,17,18) as main and/or characteristic constituents of *F. vulgare* essential oil. The study realized by Raal *et al.*⁽¹⁴⁾ on essential oils extracted from twenty samples of caraway commercialized in European countries indicated the dominance of carvone and limonene with amounts ranging between 44.5-95.9% and 1.5-51.3% respectively. In the other hand, carvone and limonene were reported as major constituents for Chinese caraway.⁽¹⁹⁾ The current study is in accordance with all previous investigations.

The most representative components of *E. Caryophyllata* essential oil are frequently reported to be eugenol and *trans*-caryophyllene.^(20,21) in another study by Chaieb *et al.*⁽²²⁾ eugenol (88.58%), eugenyl acetate (5.62%) and β-caryophyllene (1.39%) were the major components with 95.59% of the total chemical mixture.

Many previous studies have been reported the powerful antibacterial efficacy of *E. caryophyllata*, *F. vulgare* and *C. carvi* spices oils against human pathogenic bacteria

through *in vitro* tests.^(15,22,23,24,25,26,27) To the best of our knowledge, no previous scientific studies have been published on anti *H. pylori* activity of spices oils and our study seems to be the first data on this subject.

The antimicrobial effect of essential oils depends on their chemical compositions. The potency recorded for commercial spices oils in the current study could be attributed to the presence of some major bioactive constituents such as limonene (*F. vulgare* and *C. carvi* oils), α -pinene,⁽²⁸⁾ *trans*-anethole and fenchone (*F. vulgare* oil).⁽²⁹⁾ Eugenol found as the most abundant component in *E. Caryophyllata* oil is well known to have antimicrobial activity⁽²²⁾ together carvone (*C. carvi*).⁽²⁷⁾ However, the possible contribution of minor constituents by synergistic and modulatory functions should not be neglected.⁽³⁰⁾ These components of essential oils affect generally the cell membrane properties, resulting in the expansion and augmentation of the fluidity of the membrane and enzymatic inhibition.⁽³¹⁾ Medjkane *et al.*⁽⁷⁾ evaluated the effect of essential oil isolated from *Pistacia lentiscus* leaves against 48 clinical isolates of *H. pylori*, no isolate was resistant this oil with important inhibition diameter reaching 32±1.00 mm. On the other hand, Ohno *et al.*⁽³²⁾ have been investigated the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of thirteen essential oils against *H. pylori*, their findings showed a very strong *in vitro* inhibition by the oils with remarkable bactericidal effect of *Cymbopogon citratus* and *Lippia citriodora* at 0.01%.

The antibacterial efficacy of the widely consumed spices *E. caryophyllata*, *F. vulgare* and *C. carvi* essential oils against *H. pylori* demonstrated a potential action as natural product. However, we think that phytotherapy is not an absolute solution but useful as permanent prevention and should be combined with other therapeutic regimens. Further studies are needed to test the effect of combination of essential oils and their individual constituents on *H. pylori* as well as the *in vivo* investigation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Director of LBRN in University of Chlef, for providing infrastructure and excellent laboratory facilities to success this research.

Bibliographic references

1. Marshal BJ, Gilman RH. *Helicobacter pylori* infections. In: *Tropical Infectious Diseases*. Edits. R.L. Guerrant, D. Walker and P. Weller, pp.300-309, Philadelphia: Churchill Livingstone; 1999.
2. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.*2006;19:449-90.
3. Dudley J, Wiczorek T, Selig M, Cheung H, Shen J, Odze R, Deshpande V, Zukerberg L. Clinicopathological characteristics of invasive gastric *Helicobacter pylori*. *Hum Pathol.* 2017;61:19-25.
4. Cancer monographs on the evaluation of arcinogenic risks to humans: schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. [Meeting report]. International Agency for Research. Volume 61. Lyon: IARC;1994.
5. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol.* 1994;89:116-28.
6. Bezmin Abadi AT. *Helicobacter pylori* treatment: new perspectives using current experience. *J Glob Antimicrob Resist.*2017; 8:123-30. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716517300097>.
7. Medjkane M, Allem R, Medjahed H, Taleb F, Merouane A, Mouffok F. Antimicrobial activity of the essential oil isolated from pistacia lentiscus leaves against *Helicobacter pylori* Algerian clinical isolates. *J Essent Oil Bear Pl.* 2016; 19:466-74. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2015.1119659>
8. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo(a)pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:7610-5.
9. Dubois A. Intracellular *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis: an “old” frontier worth revisiting. *Gastroenterology.* 2007;132:1177-80.
10. Jhala NC, Siegal GP, Klemm K, Atkinson BF, Jhala DN. Infiltration of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. *Am J Clin Pathol.* 2003;119:101-7.
11. Safavi M, Shams-Ardakani M, Foroumadi A. Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Pharm Biol.* 2015;53:939-60. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2014.952837>
12. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 5th edn. Texas: Texensis Publishing; 2017.
13. Semeniuc CA, Rodica Pop C, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J Food*

- Drug Anal. 2017; 25(2):403-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300801>
14. Raal A, Arak E, Orav A. The content and composition of the essential oil Found in *Carum carvi* L. commercial fruits obtained from different countries. J Essent Oil Res.2012; 24: 53-9. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2012.646016>
15. Sellam K, Ramchoun M, Bammou M, Alem C, El Rhaffari L. Chemical composition and bioactivity of essential oils of seed and leaf from *Foeniculum vulgare* mill cultivated in southeast of Morocco. J Nat Sci Res. 2014;17(4):33-8.
16. Das M. Traditional herbal medicines for modern times: Chamomile: Medicinal, Biochemical, and Agricultural Aspects. New York: CRC Press Taylor and Francis Group;2014.
17. Raal A, Orav A, Arak E. Essential oil composition of *Foeniculum vulgare* Mill. Fruits from pharmacies in different countries. Nat Prod Res. 2012;26:1173-8.
18. Chowdhury JU, Mobarok H, Bhuiyan NI, Nandi NC. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. Bangladesh J Bot. 2009;38:181-3.
19. Jiang Z-T, Sun M-L, Li R, Wang Y. Essential oil Composition of Chinese Caraway (*Carum carvi* L.). J Essent Oil Bear Pl. 2011;14:379-82.
20. Fichi G, Flamini G, Giovanelli F, Otranto D, Perrucci S, Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. Exp Parasitol.2007;115:168-72.
21. Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. Cell Prolif. 2006;39:241-8.
22. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Ben Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. Phytother Res. 2007;21:501-6.
23. Mahboubi M, Mahboubi M. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Eugenia caryophyllata* Essential Oil. J Essent Oil Bear Pl. 2015;18:967-75.
24. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol. 2003;36:162-7.
25. Feres M, Figueiredo LC, Barreto IM, Coelho MN, Araujo MW, Cortelli SC. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. J Int Acad Periodontol. 2005;7:90-6.

26. Larhsini M, Oumoulid L, Lazrek HB, Wataleb S, Bousaid M, Bekkouche K, Jana M, Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res.* 2001;15:250-2.
27. Khan M, Sastry V. Antibacterial activity of carvone containing essential oils. *J Chem Pharm Sci.* 2009;2:126-7.
28. Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis A, Chinou JB, Mitaku S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* Var. Chia. *Planta Med.* 1999;65:749-52.
29. Ebeed NM, Abdou HS, Booles HF, Salah SH, Ahmed ES, Fahmy K. Antimutagenic and chemoprevention potentialities of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) hot water crude extract. *J Am Sci.* 2010;6:822-31.
30. Medjahed F, Merouane A, Saadi A, Bader A, Luigi Cioni P, Flamini G. Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study. *Chil J Agr Res.* 2016;76:195-200.
31. Yoko Suzuki É, Augusto Caneschi C, Costa Fochat R, Fernandes Brandão MA, Rezende Barbosa Raposo N. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja-amarga). *Rev Cubana Plant Med.* 2016;21(3):346-58. Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/376/187>
32. Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodama T, Kashima K, Imanishi J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2003; 8:207-15.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors' contributions

M. Tabti: has carried out the experiments and literature survey with help and supervision of other authors.

A. Merouane: has helped in GC/MS analysis, statistical analysis and prepared the manuscript.

R. Allem: has conceived, designed and supervised the research. All authors have read and approved the final manuscript.

