

UNIVERSITÉ MOHAMMED V – AGDAL
FACULTÉ DES SCIENCES

Rabat



N° d'ordre 2698

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Nom et Prénom : **ZENASNI Laila**

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie-Pharmacologie

Titre : Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne.

Soutenue le 15/02/2014

Devant le jury

Président

Mr. AM ZAZI Saaïd

PES à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Rabat (UM5a/FSR).

Examineurs

Mme. ALAOUI Katim

PES à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V - Souissi, Rabat (UM5s/FMPR).

Mr. AL FAIZ Chaouki

Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Rabat.

Mr. BAKRI Youssef

PH à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Rabat (UM5a/FSR).

Mr. BENJOUAD Abdelaziz

PES à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Rabat (UM5a/FSR).

Mr. IL IDRISSE Abdelkader

PES à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Rabat (UM5a/FSR).

Mr. GHANMI Mohamed

Docteur Chercheur au Centre de Recherche Forestière, Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification (HCEFLCD), Rabat.

AVANT PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Biochimie-Immunologie, Unité de Formation et de Recherche Biochimie-Immunologie à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V Agdal, sous la direction de Monsieur **BENJOUAD Abdelaziz** et le Laboratoire Plantes Aromatiques et Médicinales, Unité de recherche, d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques sous la co-direction de Monsieur **AL FAIZ Chaouki**.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur **BENJOUAD Abdelaziz**, actuellement Vice Président à la Recherche et Développement, Université Internationale de Rabat. Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail, de m'avoir guidée et suivie pas à pas la réalisation de cette étude et d'avoir consacré une partie de votre temps à sa correction malgré vos lourdes responsabilités.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le **Dr. AL FAIZ Chaouki**, Directeur de recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat (INRA), qui a beaucoup cru en mes compétences et a accepté de me co-encadrer pour une partie de ce travail avec spontanéité, malgré son programme trop chargé et ses responsabilités. Ma thèse n'aurait pas abouti sans la collaboration avec le Laboratoire Plantes Aromatiques et Médicinales, Unité de recherche, d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques que vous dirigez.

Qu'il me soit permis de remercier vivement Monsieur le **Pr. AMZAZI Saaïd**, Professeur de l'enseignement supérieur (UM5a/FSR) et Doyen de la Faculté des Sciences de Rabat. Vous avez eu la gentillesse de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je tiens à vous faire part de ma respectueuse gratitude.

J'aimerais également remercier **Monsieur le Pr BAKRI Youssef**, Professeur habilité à la Faculté des Sciences de Rabat (UM5a/FSR), pour m'avoir honoré de sa présence en acceptant d'être rapporteur et examinateur de ce travail. Vous avez accepté de prendre de votre temps pour juger cette thèse. C'est une grande joie de vous compter parmi les membres de jury.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Monsieur **le Dr. GHANMI Mohamed**, Docteur Chercheur au Centre National de la Recherche Forestière, Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification (HCEFLCD), pour m'avoir honoré de sa présence en acceptant d'être rapporteur et examinateur de ce travail. Vous avez accepté de

prendre de votre temps pour juger cette thèse. C'est une grande joie de vous compter parmi les membres du jury.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait Madame le Professeur **ALAOUI Katim**, Professeur de l'Enseignement supérieur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat (UM5s/FMPR), Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie et DG de la Fondation Mohammed VI pour la recherche et la sauvegarde de l'arganier. Je vous adresse également mes chaleureux remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury. Votre expertise et votre contribution à l'évaluation et l'amélioration de ce manuscrit me réconfortent beaucoup.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur **II IDRISSE Abdelkader**, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat (UM5a/FSR), pour avoir très aimablement accepté d'être examinateur de cette thèse. Votre collaboration et votre apport scientifique m'ont beaucoup aidée à la réalisation de ma thèse.

C'est une grande joie de vous compter tous membres du jury dans ma soutenance. Je ne saurais jamais exprimer mes sincères remerciements à vous tous d'avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail, malgré vos occupations et vos programmes chargés.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à **Madame le Pr. El AOUD Rajae**, ex-directrice de l'Institut National d'Hygiène (INH) à Rabat et **Madame le Dr. HANCALI Amina** de m'avoir accueillie au Département de Bactériologie Médical de l'INH.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur le **Pr. IBN TATOU Mohamed** de l'Institut Scientifique de Rabat, Département de Biologie pour l'identification botanique des différentes espèces. Merci pour vos qualités humaines qui m'ont toujours impressionnée.

Je remercie profondément Madame le **Dr. BRAHIMI-HORN M. C.** (CNRS UMR6543 Nice, France) pour sa lecture critique de l'article Zenasni et al. 2008.

Remerciements

الحمد لله والشكر لله عدد خلقك ورضا نفسك وزنة عرشك ومداد كلماتك

Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.

Au terme de ce doctorat, j'adresse toute mon estime à chaque personne qui a contribué de près ou de loin à sa réalisation. Ainsi j'adresse mes sincères remerciements:

A Monsieur le Professeur BENJOUA Abdelaziz, Directeur de ma thèse et ex-directeur du laboratoire de Biochimie-Immunologie à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V Agdal, qui m'a accueillie dans le laboratoire et assuré mon encadrement idoine pour la réalisation de ma thèse. Merci pour vos conseils éclairés et les encouragements que vous n'avez cessé de me prodiguer tout au long de ce travail et votre disponibilité permanente, Je vous suis très reconnaissante pour les efforts que vous déployés pour l'aboutissement de ma thèse.

A Monsieur le Dr. AL FAIZ Chaouki Directeur de recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat (INRA), pour m'avoir fait confiance, pour son suivi perpétuel au fil des années et sa disponibilité permanente. Votre détermination au quotidien nous prouve que tout point de vue mérite attention. Merci pour votre aide précieuse dans mes recherches, pour vos conseils et suggestions et l'atmosphère de travail que vous m'avez assurée. Je lui suis très reconnaissante pour tous les efforts qu'il a déployés pour mener à bien une grande partie de cette thèse. Qu'il soit assuré de toute mon estime et ma profonde gratitude.

Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail sans citer les noms, en particulier toute l'équipe du Laboratoire Plantes Aromatiques et Médicinales, Unité de recherche, d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques, Centre Régional de la Recherche Agronomique, Institut Nationale de Recherche Agronomique, Rabat, pour leur accueils à chaque fois chaleureux et amical. Un grand merci surtout à Madame **BAKHY Khadija** chercheur à INRA, Rabat.

Mes remerciements vont également aux personnels du Département Bactériologie Médicale de l'Institut National d'Hygiène à Rabat, surtout à **Monsieur le Dr. CHAROF Réda** Chef du service et à Mesdames : **Dr. HANCALI Amina**, **Dr. BELLAJI Bahija** et **Dr. HASSANI Saâdia** (médecins biologistes), pour leur aide, leur encouragement et leur contribution.

Je remercie également Madame le **Dr. BRAHIMI-HOM M. C.** (CNRS UMR6543 Nice, France) pour sa lecture critique de l'article Zenasni et al. 2008.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame l'ingénieur **GABOUN Fatima** du Centre Régional de la Recherche Agronomique de l'Institut National de Recherche Agronomique, Rabat, pour sa contribution dans l'élaboration des différentes analyses statistiques. Merci pour votre aide capitale et vos qualités humaines.

Je remercie également Monsieur l'ingénieur **MAATI Abdallah** de l'Académie Régionale de l'Education et Formation chaouia-ourdigha pour sa contribution dans l'élaboration d'une partie d'analyses statistiques.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur **LAOUNA Mohamed** Directeur de l'Académie Régionale de l'Education et Formation chaouia-ourdigha, à Monsieur **ZAKI Mohamed** Ex-directeur de l'AREF chaouia-ourdigha et à Monsieur **HLIMI Charaf eddine** chef du Centre Régional de Documentation, d'Animation et de Production Pédagogique à l'AREF chaouia-ourdigha, de m'avoir facilitée mes déplacements de Settat à Rabat pour finaliser les dernières mises au point de cette thèse.

Je remercie vivement Madame et Messieurs le **Dr. BOULBAROUD Samira**, **Haji Yassine**, **TILOULI Charaf** et **Dr. HAHARE Hicham** de l'AREF chaouia-ourdigha pour leur aide précieuse.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues du Laboratoire de Biochimie-Immunologie dans l'Unité de Formation et de Recherche biochimie-immunologie et le laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et Bio-organique, à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V Agdal, et ceux du Centre Régional de Documentation, d'Animation et de Production Pédagogique au sein de l'AREF chaouia-ourdigha et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin, je ne veux pas laisser cette occasion sans avoir à remercier mes parents, mes frères et sœurs, mon mari, mes beaux parents, mes beaux frères et mes belles sœurs, mes neveux et mes nièces, la famille Zenasni, Bensaid, Snaiki, Charfaoui, Tarmidi de leur soutien et amour.

DEDICACES

*Louange à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.
On dit « les mots s'envolent, seuls les écrits restent » c'est pour cela que je vous écris ces petits mots.*

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde :

À la mémoire de mes grands-parents qui m'ont toujours comblée d'amour et bénédiction, que dieu les accueillent dans son paradis.

À mes très chers parents, Sans qui je ne serai pas là

Qui m'ont permise de poursuivre mes études dans les meilleures conditions,

Qui m'ont donnée le défaut ou la qualité d'être acharnée au travail,

Qui m'ont appris que la vie est un défi à vivre joyeusement et à ne jamais baisser les bras quelque soit les obstacles, ils me disent toujours : «Quand on veut, on peut».

Vous êtes ma lumière, tout simplement merci pour votre esprit attentif, pour l'amour, l'écoute et le soutien que je trouve toujours auprès de vous.

À mes chers frères Safi et Fouad,

À mes chères Sœurs et leurs maris,

À mon cher époux Jaafar,

À mes chers beaux-parents,

Je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon égard. Les paroles m'échappent, tout simplement un grand merci pour votre grand amour, votre patience, vos encouragements et vos services. Merci pour la chaleur humaine que vous m'apportez au quotidien.

À mes adorables nièces et mes neveux qui me font oublier tous mes soucis avec leurs douces paroles et leur charmant sourire enfantin. Merci pour votre amour sans limite.

À mes beaux frères et mes belles sœurs,

À toute la Famille Zenasni, Bensaid, Snaïki, Echarfaoui et Tarmidi. Merci pour vos conseils, votre soutien, vos encouragements et surtout vos bénédictions et votre amour.

À tous mes professeurs,

Spéciale dédicace à toutes mes amies.

À toutes celles et ceux qui m'ont aidée et soutenue.

SOMMAIRE

Sommaire.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Acronyme.....	iv
Introduction.....	1
 PREMIER CHAPITRE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	 4
I- Le Maroc et sa richesse végétale :	5
I-1- L'originalité de la flore marocaine :.....	5
I-2- l'endémisme végétal:.....	6
 II- Données bibliographiques sur les plantes étudiées:	 7
II-1- Monographie de <i>Thymus satureioides</i> Coss. (Thym-sarriette du Maroc):	8
II-1-1- Généralité sur le genre <i>Thymus</i> :	8
II-1-2- Position systématique de <i>Thymus satureioides</i> Coss.:	10
II-1-3- Présentation et description de <i>Thymus satureioides</i> Coss.:	10
II-2- Monographie d' <i>Origanum compactum</i> Benth (Origan à inflorescence compacte):..	11
II-2-1- Généralité sur le genre <i>Origanum</i> :	11
II-2-2- Position systématique d' <i>Origanum compactum</i> Benth:	13
II-2-3- Présentation et description d' <i>Origanum compactum</i> Benth:	13
II-3- Monographie des quatre espèces du genre <i>Nepeta</i> :	15
II-3-1- Généralité sur le genre <i>Nepeta</i> :	15
II-3-2- Position systématique du genre <i>Nepeta</i> :	16
II-3-3- Présentation et description:	16
II-3-3-a- <i>Nepeta atlantica</i> Ball:	16
II-3-3-b- <i>Nepeta catari</i> L.:	17
II-3-3-c- <i>Nepeta tuberosa</i> L.:	19
II-3-3-d- <i>Nepeta granatensis</i> Boiss.:	20
 III- Les huiles essentielles :	 21
III-1- Définition:	21
III-2- Fonction biologique des HE:	22
III-3- Localisation des huiles essentielles au niveau de la plante:	22
III-4- Les facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles:	24
III-4-1- Facteurs de variabilité d'ordre naturel:	24
III-4-1-1- Facteurs Intrinsèques: <i>les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité</i> :	25
III-4-1-1-a- <i>Chémotypes Génétique</i> :	25
III-4-1-1-b- <i>Selon l'organe</i> :	25

III-4-1-1-c- Au cours du cycle végétatif:	25
III-4-1-2-Facteurs Extrinsèques : le sol, le climat, l'environnement:	26
III-4-2-Facteurs d'origine technologique:	26
III-5- Les activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles:	27
III-5-1-Activités biologiques:	27
III-5-2-Activités pharmacologiques:	28
III-5-3-La toxicité des huiles essentielles:	30
III-5-4-Activité antimicrobienne des huiles essentielles:	30
III-6- Mode d'action des huiles essentielles:	32
III-7- Composition chimique des huiles essentielles:	36
III-7-1- Terpènes:	37
III-7-2- Composés aromatiques:	39
III-7-3- Composés d'origines diverses:	39
III-8- Classification des composés terpéniques chez les plantes:	41
III-8-1- Définition:	41
III-8-2- Classification des composés terpéniques:	42
III-8-2-1- Les Monoterpènes:	42
III-8-2-2- Les sesquiterpènes:	44
III-8-3- La biosynthèse des terpènes:.....	46
III-9-Les procédés d'extraction des huiles essentielles:	46
III-9-1-Distillation:	46
III-9-1-1-L'hydrodistillation (<i>water distillation</i>):	47
III-9-1-2-La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (<i>steam distillation</i>):..	48
III-9-1-3-L'hydrodiffusion:	49
III-9-2- Expression à froid (expression des épicarpes de citrus):	50
III-9-3- Extraction par micro-ondes:	50
DEUXIEME CHAPITRE : MATERILES ET METHODES.....	52
I-Matériel:	53
I-1- Les plantes sélectionnées:	53
I-2- Les souches testées:	54
II- Méthodes:	55
II-1-Les huiles essentielles:	55
II-2- Analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM):.....	56
II-3-Matériel bactérien:	57
II-3-1- <i>Staphylococcus aureus</i> :	59
II-3-2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	61
II-3-3- <i>Escherichia coli</i> :	63
II-3-4- <i>Salmonella enteritidis</i> :	65

II-4- Détermination de l'activité antibactérienne des HE (l'effet bactériostatique):	66
II-4-1- Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI):	66
II-4-2- Détermination de Concentration Minimale inhibitrice (CMI):	67
TROISIEME CHAPITRE : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	71
I-Etude de la variabilité de la composition chimique de <i>Thymus</i>	
<i>satureioides</i> Coss de la vallée de l'Agoundis:	72
I-1-Variation du rendement des HE et de la Productivité en biomasse de	
<i>T.satureioides</i> Coss en fonction des sites de la vallée l'Agoundis:	74
I-2- Etude de la Composition chimique des HE de <i>T. satireioides</i> Coss.....	77
II- Etude de la variabilité de la composition chimique d'<i>Origanum</i>	
<i>compactum</i> Benth:	83
III- Etude de la variabilité chimique des HE de 4 espèces du genre <i>Nepeta</i>	90
et évaluation de leur propriété antibactérienne:	
III-1- Etude de la Composition chimique des HE de quatre espèces du genre <i>Nepeta</i> :....	90
III-2- Analyse de l'activité antibactérienne des HE de quatre espèces du genre <i>Nepeta</i> :	92
Conclusion générale:	102
Perspectives :	106
Références bibliographiques:	108
Annexes:	136
Résumé:	154
Abstract:	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Thymus satureioides</i> Coss.	10
Figure 2: Aire de distribution du genre <i>Origanum</i>	12
Figure 3: <i>Origanum compactum</i> Benth.	14
Figure 4: <i>Nepeta atlantica</i> Ball.	17
Figure 5: <i>Nepeta cataria</i> L.	18
Figure 6: <i>Nepeta tuberosa</i> L.	19
Figure 7: <i>Nepeta granatensis</i> Boiss.	20
Figure 8: Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques	23
Figure 9: Mode d'action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.	33
Figure 10: Observation en microscopie électronique à transmission des bactéries de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Figure 11: Micrographies électroniques à balayage de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figure 12: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles	40
Figure 13: Structure chimique de l'isoprène (I) et diphosphate d'isopentényle (II).....	41
Figure 14: Certaines molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques et bicycliques.	43
Figure 15: Squelette iridoïde.	44
Figure 16: Schémas des principales formes de squelettes carbonés des sesquiterpènes.	45
Figure 17: quatre molécules représentatives des 4 principales familles de sesquiterpènes monocycliques.	45
Figure 18: Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle.	48
Figure 19 : Entraînement à la vapeur d'eau.	49
Figure 20 : L'hydrodiffusion.	50
Figure 21: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.	51
Figure 22: Séchage des plantes à l'ombre dans un endroit aéré.	55
Figure 23: Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.	55
Figure 24: Extraction de l'huile essentielle par d'entraînement à la vapeur d'eau.	56
Figure 25: Procédure d'identification par l'API 20 E.	58
Figure 26: Exemple d'identification par Api 20E achevée.	58
Figure 27: <i>Staphylococcus aureus</i> en culture et en coloration Gram.	60
Figure 28: Exemples infections cutanées dues à <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figure 29: Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63

Figure 30: Infection de l'œil due à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Figure 31: <i>E. coli</i> en coloration de Gram et avec Grossissement.	64
Figure 32: Culture de <i>Salmonella enteritidis</i> sur gélose Salmonella-Shigella (S.S.).....	66
Figure 33: Détermination de la CMI par la technique de microdillution.	70
Figure 34: Répartition des stations d'échantillonnage de <i>Thymus satureioides</i> de la vallée de l'Agoundis.	72
Figure 35 : Estimation Moyenne de la biomasse et du rendement en HE de 32 échantillons de <i>T. satureioides</i> Coss. de la vallée de l'Agoundis.	75
Figure 36 : Variation de la biomasse et du rendement en huile essentielle en fonction de l'altitude chez <i>T. satureioides</i> Coss.	76
Figure 37 : Dendrogramme de la composition des 29 huiles essentielles de <i>T. satureioides</i>	79
Figure 38: La moyenne de la composition de la classe 1 (borneol/ carvacrol).	80
Figure 39 : La moyenne de la composition de la classe 2 (bornéol/camphène/ carvacrol).	81
Figure 40: La moyenne de la composition de la classe 3 (bornéol/camphène/ α -pinène).	81
Figure 41: Répartition des composés majoritaires dans l'HE de 29 échantillons de <i>T. satureioides</i> Coss de de l'Agoundis.	82
Figure 42: Répartition en % des principaux composés d'huile essentielle de neuf échantillons d' <i>O. compactum</i> Benth.	85
Figure 43: Représentation de la moyenne des principaux composés dans HE d' <i>O. compactum</i>	86
Figure 44: Dendrogramme de la composition des 9 huiles essentielles d' <i>Origanum compactum</i> Benth.	87
Figure 45: Répartition en % des principaux composés des 3 chémotypes d' <i>Origanum compactum</i>	88
Figure 46: Comparaison du pouvoir antibactérien de quatre HE du genre <i>Nepeta</i>	94
Figure 47: Analyse de la variance de logc _{mi} par l'huile essentielle.	95
Figure 48: Analyse de la variance de logc _{mi} selon les souches testées.	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Distribution des différentes familles de la flore vasculaire du Maroc en fonction du nombre d'espèces.	6
Tableau 2: Variation de la composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum gratissimum</i> en fonction de l'heure de la récolte.	26
Tableau 3: Différents types de molécules rencontrées dans l'huile essentielle.....	38
Tableau 4: Sites de collecte et productivité en biomasse et HE chez le <i>Thymus satureioides</i> . de la vallée de l'Agoundis.	73
Tableau 5: La moyenne du rendement d'huile essentielle et la biomasse par région dans la vallée de l'Agoundis.	75
Tableau 6: Répartition en % des composés identifiés dans 29 échantillons d'huiles essentielles de <i>Thymus satureioides</i> Coss. de la vallée de l'Agoundis.	78
Tableau 7: La composition moyenne des constituants identifiés en % dans les HE de 9 échantillons d' <i>Origanum compactum</i> Benth.	84
Tableau 8: Composition chimique en (%) des Huiles essentielle de quatre espèces du genre <i>Nepeta</i>	91
Tableau 9: La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles des espèces <i>Nepeta</i> contre différentes bactéries testées.	93
Tableau 10: récapitulatif de l'analyse statistique de la CMI.	95
Tableau 11: Classification du pouvoir antibactérien des HE du genre <i>Nepeta</i> (Test de Student).	96
Tableau 12: Classification de la sensibilité des souches aux HE du genre <i>Nepeta</i> (Test de Student).	98

ACRONYMS

HE: huile essentielle.

O. compactum : *Origanum compactum* Benth.

T. satureioides: *Thymus satureioides* Coss.

N. atlantica : *Nepeta atlantica* Ball.

N. tuberosa: *Nepeta tuberosa* L.

N. granatensis: *Nepeta granatensis* Boiss.

N. cataria : *Nepeta cataria* L.

O.R.L : Oto-Rhino-Laryngologie.

E. coli: *Escherichia coli*.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

S. enteritidis: *Salmonella enteritidis*.

B. cereus : *Bacillus cereus*.

ATCC : American Type Culture Collection.

CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

Rdt : Rendement.

FPP: farnésyle diphosphate.

GPP : géranyl diphosphate.

MTT : 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide.

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique.

ATP : adénosine-5'-triphosphate.

CADEFA : Coopérative de l'Agoundis pour le développement forestier et agricole.

B / Ca: bornéol / carvacrol.

B / C / Ca: bornéol / camphène / carvacrol.

B / C / P: bornéol / camphène / α -pinène.

S.S. : gélose *Salmonella-Shigella*.

BHI : Brain Heart Infusion « infusion cœur-cerveille ».

MHA : Muller Hinton Agar.

MRSA : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

AFNOR : Association Française de Normalisation.



INTRODUCTION



L'Homme s'est toujours soigné par les plantes de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. Déjà 4000 ans avant J.-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens.

La Médecine arabe a contribué à l'essor de la médecine traditionnelle par les travaux de Abou Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le "*Canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le *Traité des Simples* ou *Recueil des remèdes simples et des aliments* : *Kitab al-Djami li-mufradat al-adwiya wa'l-adhdhiya* : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales, dont plus de 300 sont des apports arabes à la pharmacologie, tandis que les autres sont des éléments déjà connus et tirés essentiellement des œuvres grecques.

Beaucoup de remèdes phytothérapiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs et se sont transmis de génération en génération. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2002) estime qu'en Afrique et en Chine jusqu'à 80 % et 40% respectivement de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins de santé. En même temps, dans de nombreux pays développés, le pourcentage de population ayant utilisé la médecine traditionnelle au moins une fois se chiffre à 48 en Australie, 70 au Canada, 42 aux États-Unis, 38 en Belgique et 75 en France. Ainsi les dépenses en médecine traditionnelle; souvent appelée médecine «complémentaire», «alternative» ou « non conventionnelle »; sont non seulement considérables mais en hausse rapide. Aux États-Unis, le total des débours consacrés à la médecine traditionnelle en 1997 est estimé à 2 700 millions de \$US. En Australie, au Canada et au Royaume-Uni, les dépenses annuelles sont estimées à 80 millions de \$US, 2 400 millions de \$US et 2 300 millions de \$US respectivement.

Le développement de la médecine moderne s'est accompagné par la détermination des composés actifs, cela a commencé au début du 19^{ème} siècle par l'isolement de la morphine à partir du pavot à opium (*Papaver somniferum*), suivi par l'isolement de la cocaïne, la codéine, la digitoxine et la quinine dont certains d'entre eux sont utilisés jusqu'à présent. On peut citer encore, L'artémisinine qui a été isolée par les chercheurs chinois en 1972 à partir d'*Artemisia annua* L. qui s'avère très efficace pour lutter contre la malaria qui provoque des millions de morts par année. La plante d'*Artemisia annua* L. a été utilisée en médecine

traditionnelle chinoise comme un remède pour les frissons et fièvre depuis plus de 2000 ans. Ainsi, du fait de ses propriétés thérapeutiques potentielles, la plante a été adoptée par plusieurs pays d'Europe et aux Etats – Unis.

Actuellement les plantes aromatiques et les huiles essentielles possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales : antibactériennes, anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antitoxiques, anti-tumoral, insecticides, insectifuges, tonifiantes, stimulantes, et calmantes, etc.. , ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux. Le recours à la médecine traditionnelle, alternative ou complémentaire est due à diverses raisons comme par exemple : le coût relativement faible des plantes médicinales par rapport aux médicaments conventionnels, la disponibilité de ces plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées, la résistance aux médicaments, la méfiance envers les produits de synthèse et leurs effets secondaires indésirables, l'envie de consommer « bio » et ces effets bénéfiques sur la santé, l'existence de maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace, la confirmation en laboratoire et en clinique de l'innocuité et de l'efficacité d'un nombre de plus en plus important de plantes médicinales, et l'échange culturel avec des cultures étrangères, notamment d' autres systèmes de médecine.

Au Maroc la flore vasculaire endémique compte plus de 800 espèces et sous-espèces, ce qui représente près de 20%. Ces taxons endémiques sont répartis sur plus de 52 familles et plus de 230 genres. Il est facile de prévoir que le droguier marocain sera marqué par une forte empreinte territoriale et un taux de particularité élevé. D'où la nécessité de valoriser ces plantes endémiques en les étudiant scientifiquement et en les labélisant, ce qui peut servir de levier à un nouvel essor économique durable dans le pays. Ainsi l'explication scientifique de la médication par les plantes surtout endémiques devient une nécessité surtout au sein de la société marocaine. Ces plantes endémiques peuvent être un vaste réservoir de substances actives qu'elles arborent, Ce qui peut conduire à la découverte de nouveaux agents antimicrobiens ou molécules d'intérêts scientifiques.

Cependant, la difficulté majeure reste l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques, la caractérisation de leur cible biologique, l'évaluation de leur innocuité et la compréhension

des mécanismes moléculaires par lesquels elles agissent. D'où l'intérêt des études de criblage des plantes médicinales dans une perspective d'identification de nouvelles drogues. Il est important de souligner que la maîtrise de la chaîne d'extraction, de criblage et d'évaluation de l'activité *in vitro* et *in vivo* de ces plantes et de leurs dérivés pourrait conduire à l'isolement de nouvelles molécules thérapeutiques et/ou à la reconnaissance de la valeur thérapeutique des plantes utilisées traditionnellement en médecine alternative.

Dans ce contexte, Six espèces ont été sélectionnées pour faire l'objet de cette étude, dont *Thymus satureioides* Coss (endémique du Maroc), *Origanum compactum* Benth (endémique du Maroc et de la Péninsule Ibérique), *Nepeta atlantica* Ball. (endémique du Maroc), *Nepeta tuberosa* L., *Nepeta cataria* L. et *Nepeta granatensis* Boiss.

D'après nos recherches sur ces plantes, il n'existe pas assez de travaux sur leurs huiles essentielles, leurs productivités en HE et biomasse et leurs activités antibactériennes.

Dans un premier temps et dans le cadre de la gestion durable et la valorisation des plantes aromatiques et médicinales à l'échelle de la Vallée de l'Agoundis, nous avons mené une étude qui est une première de son genre dans cette vallée; sur la Productivité en biomasse et en huile essentielle et la caractérisation chimique de 29 huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss. L'évaluation de la productivité nous permet d'avoir une idée sur l'état des lieux de ses peuplements afin d'initier un programme d'exploitation durable avec les exploitants de *Thymus satureioides* surtout dans la vallée d'Agoundis qui constitue notre zone d'étude pour cette espèce.

En outre, le deuxième volet a concerné l'étude préliminaire de la variabilité chimique des huiles essentielles de *Origanum compactum* Benth collectées de 9 sites différents du Maroc.

La troisième partie a été consacrée à l'analyse de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des HE de quatre espèces du genre *Nepeta* : *N. tuberosa*, *N. cataria*, *Nepeta granatensis* et *N. atlantica* qui est une endémique Marocaine (à notre connaissance, aucun travail n'existe sur les propriétés antibactériennes de cette dernière).



Chapitre 1 : Etude bibliographique



I- Le Maroc et sa richesse végétale :

Le climat méditerranéen au Maroc comprend deux nuances définies par deux facteurs climatiques principaux : Les précipitations et les températures. Ce sont eux qui déterminent en grande partie la répartition de la flore. Cinq zones bioclimatiques peuvent être distinguées: le saharien, l'aride, le semi-aride, le subhumide et l'humide. Le bioclimat de haute montagne d'Emberger n'est plus considéré aujourd'hui comme variante froide des bioclimats semi-arides et subhumides (Bellekhdar. 1997).

- ✓ **Le bioclimat saharien :** Il couvre plus de 50% du territoire, c'est-à-dire toutes les régions situées au sud d'une ligne allant du Figuig à la vallée du Dra.
- ✓ **Le bioclimat aride :** Il s'étend sur le Haouz de Marrakech, la région d'Agadir, les hauts plateaux de l'oriental.
- ✓ **Le bioclimat semi-aride :** Il couvre la plus grande partie des plaines atlantiques situées entre Rabat et Agadir, le littoral méditerranéen (régions d'Hoceima, Nador, Saidia) et presque tous les piémonts des chaînes montagneuses sur des bandes plus ou moins larges.
- ✓ **Les bioclimats subhumides et humides:** Situés au niveau des zones montagneuses, ce sont par excellence les domaines forestiers du Maroc.
- ✓ **Le bioclimat de haute montagne :** Il se distingue par les formations d'espèces arborescentes adapté au grand froid sec comme le genévrier thurifère (*Juniperus thurifera*) et un couvert buissonnant fait de divers xérophytes épineux.

I-1- L'originalité de la flore marocaine:

La flore marocaine est composée de près de 4200 espèces et sous espèces appartenant à la quasi-totalité des grandes familles botaniques connues (130 familles et 940 genres représentés). Ce chiffre élevé traduit bien la richesse de la flore marocaine et sa diversité.

Au total, d'après Emberger (1971), la composition générique de la flore marocaine est à dominance méditerranéenne (30% des genres) mais avec un nombre élevé de genres cosmopolites (30%), un nombre assez grand de genres Nordiques (22%), une teinte africaine (5%) et un endémisme de souche méditerranéenne relativement important (5% des genres) d'où l'originalité de la flore marocaine.

Tableau 1 : Distribution des différentes familles de la flore vasculaire du Maroc en fonction du nombre d'espèces (Encyclopédie du Maroc 1986-1989).

Famille de flore vasculaire	Nombres d'espèces	Pourcentage (%)
Astéracées	601	14.3
Fabacées	471	11.2
Poacées	351	8.4
Brassicacées	240	5.8
Caryophyllacées	236	5.6
Lamiacées	226	5.4
Apiacées	174	4.1
Scrofulariacées	147	3.5
Liliacées	103	2.5
Autres familles	1649	39.2

I-2- l'endémisme végétal:

Au Maroc la flore vasculaire endémique compte plus de 800 espèces et sous-espèces ce qui représente près de 20%. Si nous tenons compte également des espèces à endémisme moins strict (espèces endémiques baético-rifaines, maroco-canariennes ou maroco-algériennes), le taux d'endémicité devient relativement très élevé. Ce sont les massifs du Rif et de l'Atlas, le Grand Atlas en particulier, qui hébergent la grande majorité des espèces endémiques, ces taxons endémiques sont répartis sur plus de 52 familles (Benabid 2000).

Les familles qui comportent le plus d'espèces endémiques sont par ordre d'importance décroissant :

- Les Asteraceae : plus de 140 espèces,
- Les Lamiaceae : plus de 90 espèces,
- Les Fabaceae : plus de 65 espèces,
- Les Caryophyllaceae : plus de 40 espèces,
- Les Scrophulariaceae : plus de 40 espèces,
- Les Brassicaceae : plus de 35 espèces,
- Les Apiaceae: plus de 33 espèces.

Il est facile de prévoir que le droguier marocain sera marqué par une forte empreinte territoriale et un taux de particularité élevé.

Diverses explications ont été avancées concernant cet endémisme important (Bellekhdar. 1997):

- **Explication géographique** qui fait appel à la structure orographique du pays et aux divers obstacles qui s'opposent à la dissémination des espèces : montagnes élevées, déserts et océans ;
- **Explication paléogéographique** qui se fonde sur l'existence au cours de l'évolution géologique régionale d'obstacles, disparus depuis, qui se seraient opposés comme précédemment à la dissémination des espèces (anciennes chaînes montagneuses ou anciennes mers) ;
- **Explication paléoclimatique** : les bouleversements climatiques que la région a connu, en particulier au quaternaire, pourraient aider à comprendre la particularité florale de certains sites et la survivance des espèces relictues.
- **Explication génétique** qui tente de rapporter l'originalité de certaines espèces, sous espèces ou variétés endémique à des phénomènes d'hybridation et d'alloployploïdie ou plus généralement à des modifications du patrimoine génétique.

Tous ces facteurs, combinés ou non, ont favorisé l'éclosion au Maroc de plusieurs foyers d'endémisme dont les plus importants sont situés dans le Souss, les Ida ou Tanane, le pays Zaïane, le bassin fermé de la Moulouya et les hauts sommets montagneux (Bellekhdar. 1997).

II. Données bibliographiques sur les plantes étudiées :

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux. L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabes, chinoises, égyptiennes, hindous, grecques, romaines (Anonyme 1974 ; N'Guessan et al. 2009). Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (Muthu et al. 2006 ; Lev 2006).

L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches la plus fiable pour la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi le maprouneacin (*Maprounea africana*) utilisé comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artémisinine

(*Artemisia annua*) utilisé comme composé *antipaludique* efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découverts à partir de plantes et sont directement employés (Ajibesin et al. 2008).

Le Maroc est l'un des pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicinale et un savoir-faire traditionnel à base des plantes médicinales (Scherrer et al. 2005). La richesse de la flore marocaine et sa diversité, ainsi que l'endémisme important qui la caractérise (soit 800 espèces, sous espèces et variétés, ce qui représente près de 20% de la flore vasculaire (Benabid 2000), donne à la droguerie marocaine une empreinte territoriale et un particularisme élevé spécialement en plantes médicinales.

En effet, dans l'art culinaire marocain, on accorde une grande importance aux plantes aromatiques : le thym, l'origan, la menthe, le romarin, ainsi que l'armoise sont largement utilisés dans la conservation et l'aromatisation des aliments. Dans le milieu rural on utilise du thym ainsi que l'origan pour la conservation du beurre fondu «smen » (Bellakhdar 1997).

Dans la région du Rif les graines d'origan, macérées dans l'huile d'olive, sont utilisées pour traiter les gastralgies, les dysenteries, les furonculoses et les algies dentaires (Bellakhdar 1997).

Dans la littérature, les huiles essentielles de thym, origan, romarin, sauge, sont riches en composés phénoliques comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Ces composés possèdent un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* (Schmidt et al. 2012 ; Esmaeili et al. 2012; Sienkiewicz et al. 2011 ; Fabian et al. 2006; Pauli 2001; Sivropoulou et al. 1996).

II-1- Monographie de *Thymus satureioides* Coss. (Thym-sarriette du Maroc) :

II-1-1- Généralité sur le genre *Thymus* :

Le nom *Thymus* vient probablement du latin "thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "thymos" qui signifie "courage" ou "force". La région méditerranéenne peut être décrite comme le centre de ce genre (Stahl-Biskup et Saez 2002).

Le nombre d'espèces dans ce genre est encore discutable, il regroupe entre 250 et 350 espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvages (Morales 2002; Lawrence et Tucker 2002 ;

Napoli et *al.* 2010). Il représente un taxon polymorphe, à la fois chimiquement et morphologiquement (Morales 2002; Saez et Stahl-Biskup 2002; Marin et *al.* 2005). Selon Jalas (1971), *Thymus* est divisé en huit sections: *Micantes*, *mastichina*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *serpyllum* et *Hyphodromi*.

Le thym est une épice importante dans la cuisine à domicile ainsi que dans les industries alimentaires et de l'arôme. En plus c'est une plante médicinale largement utilisée, avec une ancienne tradition qui remonte aux Egyptiens, qui l'utilisaient dans les onguents pour l'embaumement, puis les Grecs et les Romains qui l'utilisaient à des fins thérapeutiques (Barros et *al.* 2010 ; Napoli et *al.* 2010).

En médecine traditionnelle, les feuilles et les parties florales des espèces *Thymus* sont largement utilisées comme thé tonique, antiseptique, antitussif, expectorant et carminative, ainsi que pour le traitement des rhumes (Ghasemi 2009; Rasooli et Mirmostafa 2002).

Il a été rapporté que le thym possède de nombreuses activités biologiques, antispasmodiques, antimicrobiennes, antioxydantes, antiplaquettaires, analgésiques et anti-inflammatoires (El Bouzidi et *al.* 2013 ; Jamali et *al.* 2012 ; Dandlen et *al.* 2010; Soliman et Badeaa 2002 ; Marino et *al.* 1999 ;Okazaki et *al.* 2002; Faleiro et *al.* 2003; Dob et *al.* 2006; Hazzit et *al.* 2009 ; Meister et *al.* 1999; Grosso et *al.* 2010; Tepe et *al.* 2005 ; Elhabazi et *al.* 2008 ; Ismaili et *al.* 2004; Ismaili et *al.* 2002 ; Miura et *al.* 2002 ; Van Den Broucke et Lemli 1983).

Au Maroc le genre *Thymus* est l'une des herbes les plus populaires utilisées dans la médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés médicinales. Il est largement répandu dans plusieurs régions au Maroc et utilisé à l'état frais ou sec comme plantes culinaires. Cette disponibilité et le coût relativement faible sont un atout précieux. Il est subdivisé en cinq sections: *Micantes*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *Serpyllum* et *Hyphodromi* (Tahiri et *al.* 1998), qui sont représentés par 15 espèces dont 7 endémiques, ce qui fait un taux d'endémisme de 46.6% dans ce genre (Fennane et *al.* 2007). Dans notre étude nous nous sommes intéressés particulièrement à *Thymus satureioides* Coss.

II-1-2- Position systématique de *Thymus satureioides* Coss.:

Règne	Plantae
Sous -règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus satureioides</i> Coss.

II-1-3- Présentation et description de *Thymus satureioides* Coss.:

Le *Thymus satureioides* Coss. (figure 1) : C'est une espèce endémique du Maroc (Bellakhdar 1997 ; Benabid 2000). Elle est connue sous les noms vernaculaires suivants : en Tamazight « Azukni », « izukni », « tazuknit » ; en arabe « Zaitra » et en Français « Thym-sarriette du Maroc ».

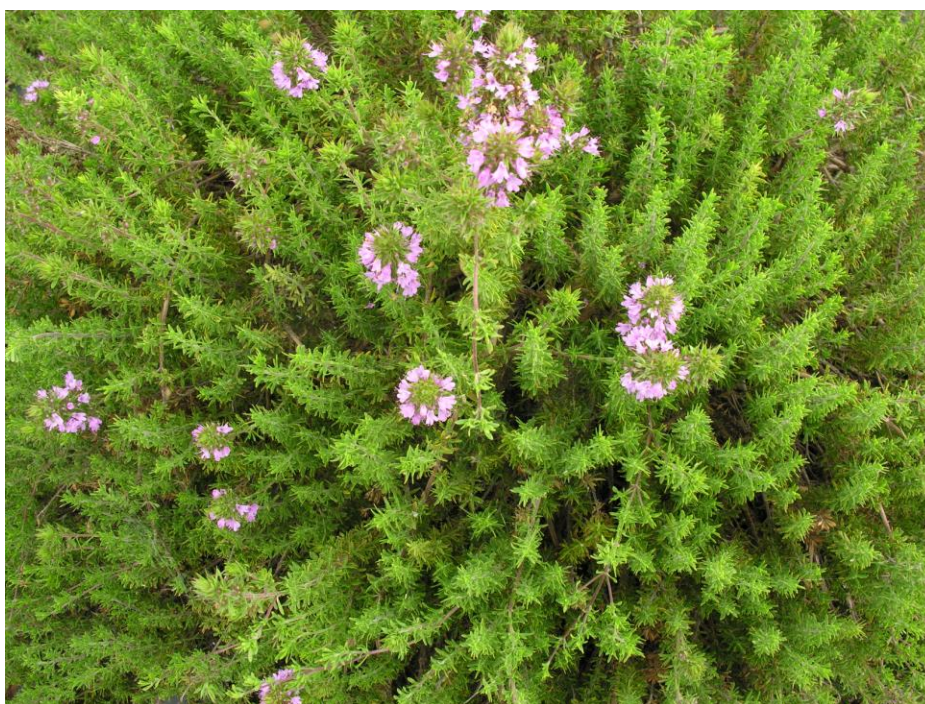


Figure 1: *Thymus satureioides* Coss.

Le *Thymus satureioides* Coss. c'est un arbrisseau érigé, pouvant atteindre 60 cm, très rameux, aux feuilles spatulées, inflorescences en glomérules lâches, à la corolle rose ou rose très pâle. Il est rencontré dans les clairières des forêts, broussailles, matorrals des basses et moyennes montagnes jusqu'à vers 2200m, sur substrats calcaires siliceux et sols rocaillieux ou plus au moins terreux mais bien drainés (Benabid 2000). Il peuple les Haut-Atlas et Anti-Atlas, sous des bioclimats Arides et Subhumides à variantes chaudes et fraîches et au niveau des étages de végétations Infra-méditerranéen et Mésoméditerranéen (Benabid 2000 ; EL Rhaffari 2008).

✓ l'usage traditionnel :

Au Maroc le *Thymus satureioides* Coss. s'emploie en décoction contre la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme (Bellakhdar et al. 1991), les infections gastro-intestinales, les maladies hépatiques, les coliques, les toux, les infections de la gorge et de la bouche, les gripes, les rhumes, le coryza, les refroidissements. Il est réputé tonique et antiseptique. On le mâche aussi contre les aphtes et les gingivites. Les feuilles séchées sont fumées en cigarettes contre le rhume et la grippe (Bellakhdar 1997). Il est aussi utilisé comme condiment et pour la conservation du smen (beurre fondu). Le miel butiné sur ce thym (spécialité de la région de Marrakech) est très recherché par les Marocains car il est réputé posséder de puissantes vertus thérapeutiques (celle du thym) (Bellakhdar 1997).

✓ Propriétés pharmacologiques :

Dans la littérature, il a été rapporté que le *Thymus satureioides* Coss. présente des propriétés analgésiques (Elhabazi et al. 2008), anti-inflammatoires (Ismaili et al. 2004), anti-oxydantes (Ichrak et al. 2011 ; Ismaili et al. 2004) et antimicrobiennes (Ichrak et al. 2011 ; Lattaoui et al. 1993; Lattaoui et Tantaoui-Elaraki 1994).

II-2- Monographie d'*Origanum compactum* Benth (Origan à inflorescence compacte) :

II-2-1- Généralité sur le genre *Origanum* :

L'*Origanum* vient de 2 mots grecs, "*oros*" qui veut dire montagne et "*ganos*" qui signifie éclat; ce mot signifierait "ornement des montagnes".

Le genre *Origanum* L. (Famille des Labiées) comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisé par une diversité morphologique et chimique importante (Kokkini 1996 ; Kintzios 2002). Le genre *Origanum* est largement présent dans les îles Canaries et les Açores, dans l'Europe du Nord et jusqu'à l'Est de l'Asie. On peut le rencontrer aussi en culture à Cuba ou dans l'île de la Réunion, mais la région méditerranéenne représente son aire de distribution la plus importante (figure 2).



- Limite de distribution

Figure 2 : Aire de distribution du genre *Origanum* (IETSWAART 1980).

La plupart de ces espèces sont originaires du bassin méditerranéen. Environ 75% se trouvent dans l'Est méditerranéen et seulement quelques espèces se produisent dans la partie occidentale de la Méditerranée (Kokkini 1996; Skoula et al. 1999 ; Baser 2002). Ce genre contient des plantes aromatiques et médicinales, ce sont de petits arbustes ou des herbes pérennes avec plusieurs tiges, feuilles ascendantes ou dressées, subsessiles ou pétiolées et des fleurs verticillées regroupées en épis denses ou en vrac, qui sont disposés dans une inflorescence paniculée ou corymbiforme (Kokkini 1996; Baser 2002).

Les espèces d'origan sont d'une grande importance économique comme une épice. Ils sont également utilisés en médecine traditionnelle pour traiter les troubles de santé. Cependant, des études ont montré l'intérêt des plantes de ce genre en raison de leur effet antimicrobien (Sözmen et al. 2012 ; Gómez-Sánchez et al. 2011; Sivropoulou et al. 1996 ; Muller et al. 1995 ; Biondi et al. 1993 ; Aureli et al. 1992), cytotoxique (El Babili et al. 2011 ; Sivropoulou et al. 1996), insecticide (Traboulsi et al. 2002), nématocide (Oka et al. 2000), antioxydant (El Babili et al. 2011 ; Lagouri et al. 1993; Nakıboglu et al. 2007; Ozkan et al.

2007; Gortzi et al. 2007 ; Tepe et al. 2004; Gouladis et al. 2003), hypoglycémiant (Lemhadri et al. 2004) et antithrombine (Goun et al. 2002).

Depuis quelques années, l'incorporation d'huiles essentielles d'origan riches en carvacrol dans les additifs alimentaires pour animaux, suscite un grand intérêt (Mheen 2006). Leurs propriétés permettent d'inhiber des bactéries indésirables (*Salmonella*, *Clostridium*, etc.) dans le conduit gastro-intestinal et de réduire le risque de diarrhée, améliorant ainsi significativement la santé et la croissance des animaux (Gunter et Bossow 1998).

Au Maroc le genre *Origanum* est représenté par 5 espèces dont 3 endémiques (Benabid 2000). Nous nous sommes intéressés dans cette étude à *Origanum compactum* Benth.

II-2-2- Position systématique d' *Origanum compactum* Benth:

Règne	Plantae
Sous -règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>Origanum compactum</i> Benth.

II-2-3- Présentation et description d'*Origanum compactum* Benth:

L'*Origanum compactum* Benth (figure 3), plante endémique du Maroc et de l'Espagne méridionale (Jahandiez et Maire 1932). Elle est commune dans le Nord et le Centre du Pays. Les noms vernaculaires sont « za'tar tawlari » et « za'tar », ce dialectal est porté par d'autres origans du Maroc et divers thymys (Bellakhdar 1997). Il est considéré par les Marocains comme le vrai za'tar, c'est le plus recherché.



Figure 3: *Origanum compactum* Benth.

C'est une plante vivace, en général pubescente, tige pubescente couverte de poils longs, feuilles caulinaires ovales-ovoïdes, velues, inflorescences en épis denses et courts, très pourprés, bractées florales ovales-lancéolées, rigides, coriaces, fleurs grandes, calice à 5 dents triangulaires et subégales, à marges ciliolées (Benadid 2000).

Il est rencontré dans les forêts, broussailles et matorrals, sur des sols bien drainés, sous des bioclimats Semi-arides et Subhumides à variantes chaudes et fraîches et au niveau des étages de végétations Thermo-méditerranéen et Méso-méditerranéen (Benabid 2000). Il est réparti dans Moyen Atlas, le Maroc Atlantique Moyen, Maroc Atlantique Nord et le Rif (Fennane et *al.* 2007).

✓ l'usage traditionnel :

Partout dans le Maroc, cet origan est considéré comme une panacée. Il est largement utilisé en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. On l'emploie surtout, en infusions ou en décoction dans le traitement des dysenteries, des colites, des affections gastro-intestinales, de l'acidité gastrique et des affections broncho-pulmonaires, contre les rhumes, les grippes, les affections oto-rhino-laryngée (O.R.L.) et les bronchites. On l'administre aussi

sous forme de fumigations. On l'utilise en gargarismes contre les affections de la bouche (aphtes et gingivites) (Bellakhdar 1997; Lahsissene et al. 2009). Dans la région de Zaër, la tige feuillée, en infusion ou en décoction, est utilisée aussi comme hypoglycémiant (Lahsissene et al. 2009). Enfin, il est employé comme tonique, aphrodisiaque et stimulant de l'appétit (Bellakhdar 1997). C'est aussi un condiment culinaire courant utilisé aussi comme conservateur pour le smen (beurre fondu).

✓ Propriétés pharmacologiques :

Dans la littérature, il a été rapporté que l'*Origanum compactum* Benth est doté d'activités antibactériennes (Bouhdid et al. 2009; Sfeir et al. 2013); antifongiques (Bouchra et al. 2003); Antioxydantes, anti malarieuses (El Babili et al. 2011), antiprolifératives contre les cellules cancéreuses du sein (El Babili et al. 2011; Chaouki et al. 2010) et molluscicides (Hmamouchi et al. 2000).

II-3- Monographie des quatre espèces du genre *Nepeta* :

II-3-1- Généralité sur le genre *Nepeta*:

Nepeta L. (Gouzeia), c'est un genre de plantes herbacées ou pérennes appartenant à la Tribu des Stachyoideae-nepetaea, famille des Lamiaceae (lamiacées ou labiées) et comprend environ 250 espèces. Ces plantes sont réparties en général au centre et au sud de l'Europe, l'Asie, le Moyen Orient, l'Afrique du Nord et dans les montagnes d'Afrique Tropicale (Ghannadi et al. 2003; Nostro et al. 2001; Gkinis et al. 2003; Zenasni et al. 2008).

Les espèces du genre *Nepeta* L. sont utilisées en médecine traditionnelle, par plusieurs populations à travers le monde, comme diurétique, sudorifique, vulnéraire, antitussif, antispasmodique, antiasthmatique, fébrifuge, emménagogue, carminatif, tonique et sédative (Zomorodian et al. 2012; Adiguzel et al. 2009; Ghannadi et al. 2003; Nostro et al. 2001; Tyler 1994; Volk et Stodola 1983). Ce sont des plantes qui facilitent la digestion, calment les toux rebelles et décongestionnent les bronches. Fraîches, elles soulagent les névralgies dentaires (Volk et Stodola 1983). Les parties utilisées sont les feuilles, les sommités fleuries, racines et une partie de la tige préparée en décoction.

Des études menées sur le genre *Nepeta* L. ont démontré des effets fongicides (Saxena et Mathela 1996; Srifi et al. 2013; Nestorović et al. 2010), antibactériens (Zomorodian et al.

2012 ; Zenasni et al. 2008, Nestorović et al. 2010 ; Bourrel et al. 2000), analgésiques (Aydin et al. 1998 ; Boudida et al. 2004 ; 2008) immunomodulatrices (Akbay et al. 2002) et insectifuges (Gkinis et al. 2003 ; Peterson et Ems-Wilson 2003 ; Zhu et al. 2009). Ces activités sont attribuées au nepetalactone, composé majoritaire de la majorité des huiles essentielles du genre *Nepeta* L.

Au Maroc, la plante *Nepeta* L. compte 10 espèces dont 4 endémiques (Benabid 2000) :

Nepeta atlantica Ball. ; *Nepeta Barbara* Maire ; *Nepeta hispanica* boiss-ssp : statice Maire et *Nepeta stachyoides* Batt.

L'espèce *Nepeta* L. la plus utilisée en médecine traditionnelle Marocaine, est *Nepeta apulaei* Jcr., au nom vernaculaire *qestân* ou *qestâl*. Cette espèce se rencontre fréquemment dans la région de Rabat-Zaër où elle est utilisée fraîche et hachée comme vulnéraire, en cataplasmes (Bellakhdar 1997).

II-3-2- Position systématique du genre *Nepeta*:

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Nepeta</i>

II-3-3- Présentation et description :

II-3-3-a- *Nepeta atlantica* Ball.:

Nepeta atlantica Ball. (Figure 4) est une espèce endémique du Maroc. Elle pousse dans les clairières rocailleuses des forêts, pâturages rocaillieux, éboulis, graviers des rivières des basses et moyennes montagnes calcaires et siliceuses à des altitudes 1000-2800m. La période de floraison se situe entre juin-août (Jahandiez et Maire 1934). On la trouve dans l'Anti Atlas, le Haut Atlas et le Moyen Atlas, sous des bioclimats Semi-aride froid et Subhumide (Fennane et Ibn Tatou 1998, Fennane et al. 2007).

✓ **l'usage traditionnel :**

Dans le Haut Atlas, cette plante est connue sous le nom de Tayrart et elle est utilisée par la population de la région en cas de douleurs de rhumatisme et contre les maux de tête (Anonyme 2002).

✓ **Propriétés pharmacologiques :**

Des études ont rapporté que cette espèce présente des propriétés antibactériennes (Zenasni et *al.* 2008), antifongiques (Srifi et *al.* 2013), analgésiques (Boudida et *al.* 2004) et cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses humaine et animale (Merghoub 2004). L'étude de sa toxicité aigue par voie intrapéritonéale témoigne d'une faible toxicité (Boudida et *al.* 2004 ; 2008)



Figure 4: *Nepeta atlantica* Ball.

II-3-3-b- *Nepeta catari* L.:

Nepeta catari L. est une herbe vivace, odorante, dont la tige haute peut atteindre 1 mètre. Dressée, rameuse, elle porte des feuilles molles, assez longuement pétioles, en forme de cœur ou ovales, dentelées, d'un beau vert frais dessus, plus pale dessous (Figure 5). Très répandue en Europe et en Amérique du Nord, déjà connue à l'époque de la Rome Antique, elle pousse dans les rocailles et sur les bords des chemins, dans les zones ensoleillées ou moyennement ombragées (Simon et *al.* 1984).

✓ **l'usage traditionnel :**

Les feuilles et les fleurs de *N. Cataria* sont utilisées dans la préparation des sauces, des soupes et du fromage (Zomorodian et al. 2012). Dans la médecine traditionnelle, cette plante est utilisée comme antispasmodique, carminative, stimulant, tonifiant, sédatif, et pour le traitement des troubles gastro-intestinaux et respiratoires, comme les coliques, la diarrhée, la toux, l'asthme et la bronchite (Zomorodian et al. 2012; Baser et al. 2000).

✓ **Propriétés pharmacologiques :**

Il a été rapporté que les HE de *N. cataria* ont un effet antibactérien (Zomorodian et al. 2012 ; Adiguzel et al. 2009 ; Zenasni et al. 2008 ; Nostro et al. 2001), antifongique (Zomorodian et al. 2012 ; Adiguzel et al. 2009 ; Srifi et al. 2013), insecticide (Birkett et al. 2011; Peterson et al. 2002), et antiprolifératif in vitro vis-à-vis des lignées cellulaire cancéreuses humaines et animales (Merghoub 2004), antispasmodique et myorelaxant (Gilani et al. 2009).



Figure 5: *Nepeta cataria* L.

II-3-3-c- *Nepeta tuberosa* L.:

Nepeta tuberosa L. (Figure 6): Cette plante pousse dans les clairières fraîches des forêts, prairies un peu humides des basses montagnes calcaires et silicieuses, de 800 à 2000m d'altitude. La période de floraison se situe entre Mai et Juin de chaque année. Au Maroc on trouve la ssp. *Reticulata* (Desf.) Marie. (Fennane et Ibn Tatou 1998; Tyler 1994) en Haut Atlas (Akka-n-Ouyyad), Moyen Atlas (dayat Âoua ; dayat Chiker), Littoral de la Méditerranée et Rif, sous des Bioclimats Semi aride froid, Subhumide et Humide (Fennane et al. 2007). L'aire géographique de cette plante s'étend sur le Maroc, l'Algérie et l'Espagne.

✓ Propriétés pharmacologiques :

Des travaux ont rapporté que cette plante est dotée d'activités antifongiques (Srifi et al. 2013), antibactériennes (Zenasni et al. 2008), analgésiques (Boudida et al. 2004 ; 2008) et antiprolifératives in vitro vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses humaines et animales (Merghoub 2004), ainsi que d'une faible toxicité (Boudida et al. 2004 ; 2008).



Figure 6: *Nepeta tuberosa* L.

II-3-3-d- *Nepeta granatensis* Boiss.:

Nepeta granatensis Boiss. (Figure 7) : Elle pousse dans les forêts et clairières, prairies humides des basses et moyennes montagnes calcaires et silicieuses, à 1400-2800m d'altitude. Sa période de floraison entre juin-juillet (Jahandiez et Maire 1934). On la trouve sur les montagnes de Haut Atlas et Moyen Atlas sous des Bioclimats Semi aride froid, Subhumide et Humide (Fennane et *al.* 2007). L'aire géographique de cette plante s'étend sur le Maroc et l'Espagne méridionale.

✓ Propriétés pharmacologiques :

Des études ont montré un faible pouvoir antibactérien, antifongique et antiprolifératif de cette plante comparativement à *N. atlantica*, *N. cataria* et *N. tuberosa* (Zenasni et *al.* 2008 ; Srifi et *al.* 2013 ; Merghoub 2004).



Figure 7: *Nepeta granatensis* Boiss.

III- Les huiles essentielles :

III-1- Définition:

De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. Pour la 8^{ème} édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (Bruneton 1993).

Cependant, l'organisme de normalisation AFNOR (2000) (Association Française de Normalisation) a donné une définition qui prend en compte le mode d'obtention des huiles essentielles: c'est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation à sec. Cette définition est cependant restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes (Duquenois 1968). Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes) (Peyron et Naves 1977).

Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles (Durvelle 1983 ; Garnero 1996), ils sont généralement présents à de très faible concentration dans les plantes à parfum. En effet elles sont liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, rarement colorées et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage. Elles sont peu polaires, et il convient de les conserver à l'abri de la lumière (Durvelle 1983). Les huiles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées.

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (Anton et Lobstein 2005).

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

III-2- Fonction biologique des HE:

Les plantes assurent leur défense par les structures physiques (épines, aiguilles, etc) ou chimiques (substances toxiques ou repoussantes). Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante demeure le plus souvent obscur (Rai *et al.* 2003 ; Bruneton 1999).

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du "rôle" des huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparents " utiles " ont été décrits: Réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Ormeno *et al.* 2007; Thompson *et al.* 2003; Porter 2001; Vokou *et al.* 1984; Pelletier *et al.* 1976; Dabbah *et al.* 1970). Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaïche 1979).

III-3- Localisation des huiles essentielles au niveau de la plante:

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, des rhizomes, fruits et des graines. La synthèse et l'accumulation sont

généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (Figure 8), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae. Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes : c'est le cas des rhizomes de fougère mâle par exemple. Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (Anton et Lobstein 2005 ; Bruneton 1993). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (Oussala et *al.* 2006 ; Fahn 1979; Fahn 1988).

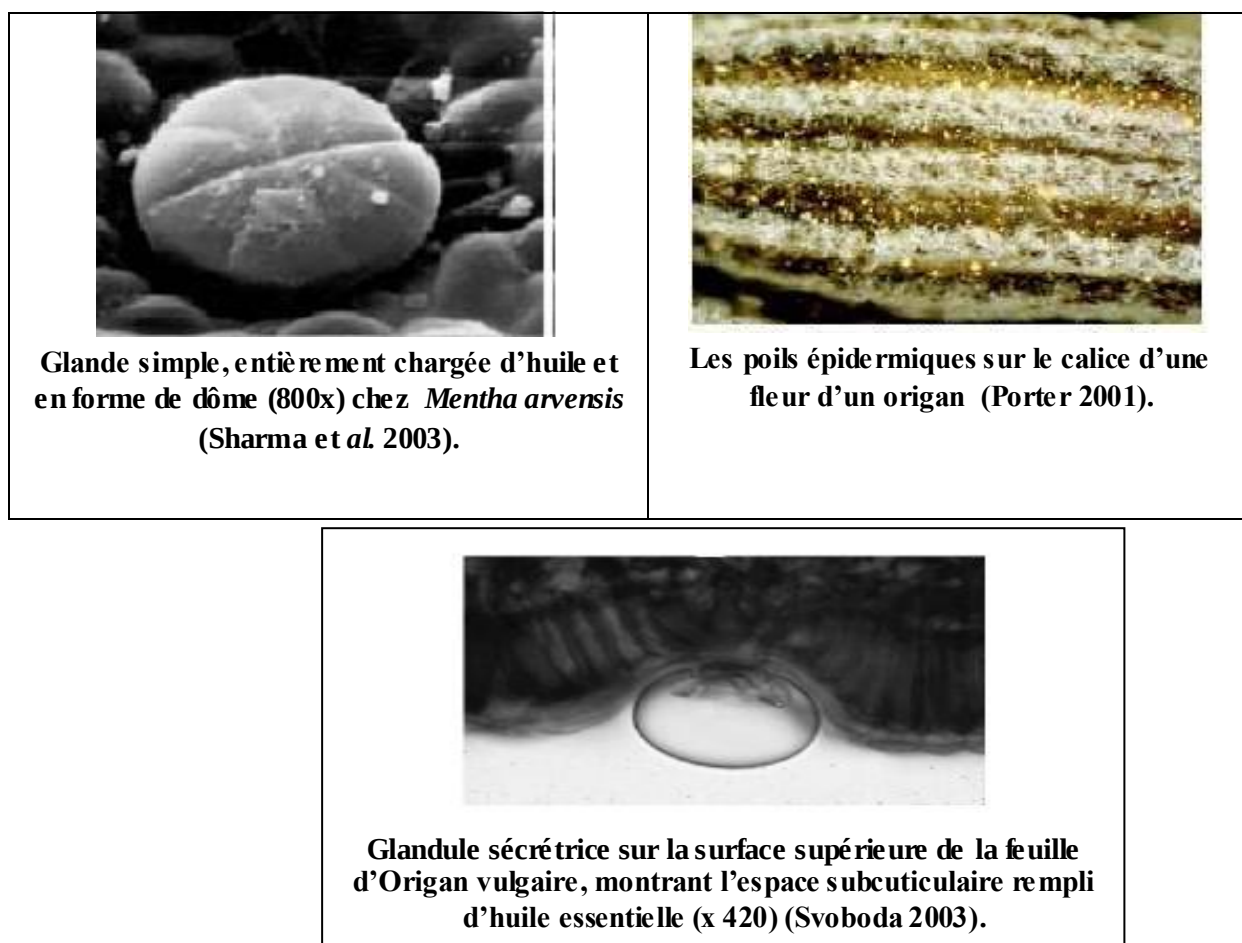


Figure 8: Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes végétaux: (Oussala et *al.* 2006 ; Anton et Lobstein 2005 ; Bruneton 1999).

- ✓ les fleurs bien sûr, exemples : origan, oranger, rose, lavande, le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang).
- ✓ les feuilles très souvent, exemples : citronnelle, eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin.
- ✓ les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore).
- ✓ les fruits, exemples : fenouil, anis, badiane, épicarpes des Citrus ;
- ✓ les graines. carvi, noix de muscade.
- ✓ le bois exemple : bois de rose, santal.
- ✓ l'écorce exemple cannellier.

Certaines familles sont particulièrement riches en huiles essentielles : Conifère, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères, Composées, Labiées (Sauvage 1974 ; Boulos 1983). Au sein d'une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes. Leur composition peut varier d'une partie de la plante à l'autre (Paris et Hurabielle 1981).

III-4-Les facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles:

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions: Le génotype, l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température et durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes (Svoboda et Hampson 1999; Smallfield 2001; Oussala et *al.* 2006 ; Fellah et *al.* 2006).

III-4-1-Facteurs de variabilité d'ordre naturel:

Les facteurs d'origine naturelle peuvent être intrinsèques, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèques liés aux conditions de croissance et de développement de la plante (Morin et Richard 1985).

III-4-1-1- Facteurs Intrinsèques: les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité :

III-4-1-1-a- Chémotypes Génétique :

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est sa biosynthèse et donc son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents (polymorphisme chimique).

Les chémotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques, on compte pour *Thymus vulgaris*, espèce morphologiquement homogène, sept chémotypes différents (Bruneton 1993 ; Thompson et al. 2003), dont les essences sont à dominance géraniol, linalol, γ -terpinéol, carvacrol, thymol, trans-thuyanol, terpin-1-ène-4-ol ou myrcénol. Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces exemple : La fenchone, terpène, proche du camphre, s'accumule dans l'huile essentielle de fenouil amer, alors que le fenouil doux offre deux chémotypes différents : l'un à anéthole, l'autre à estragole, sans pour autant que des caractères morphologiques différenciés puissent être décelés (Wichtl et Anton 1999). Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables, (Franchomme et Penoël 1990).

III-4-1-1-b- Selon l'organe :

Le potentiel et la composition de l'huile essentielle dépend de l'organe. Par exemple les parties fleuries de la sauge, ont une huile essentielle plus riche en certains terpènes que les feuilles (Perry et al. 1999).

III-4-1-1-c- Au cours du cycle végétatif :

Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons, sont nombreuses (Assad et al. 1997; Lopes et al. 1997 ; Anton et Lobstein 2005). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants (Lahlou 2004). A titre d'exemple, il a été démontré que, la composition de l'huile essentielle de feuilles d'*Ocimum gratissimum*, varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Tableau 2) (Vasconcelos et al. 1999). Le profil chimique de l'huile essentielle de menthe, par exemple, peut être différent au cours de la journée (Wichtl et Anton 1999).

Tableau 2 : Variation de la composition de l'huile essentielle d'*Origanum gratissimum* en fonction de l'heure de la récolte (Vasconcelos et al. 1999).

Constituants	Heure de récolte										
	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00
β -Pinène	3,7	-	-	-	-	-	-	2,0	-	2,7	1,3
Myrcène	1,6	-	1,0	-	-	-	-	-	-	0,8	-
1,8-Cinéole	52,1	32,4	27,4	7,1	-	2,5	-	60,7	32,5	75,5	22,5
Linalol	1,5	-	7,9	-	-	1,4	-	-	-	1,0	-
4-Terpinéol	0,6	-	2,3	-	-	2,5	-	-	-	-	-
α -Terpinéol	1,1	-	1,8	-	-	1,8	-	-	-	-	-
Eugénol	14,0	32,4	29,0	90,6	98,0	91,9	80,3	27,5	67,0	11,4	39,5
β -Élémène	0,4	-	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Caryophyllène	4,4	-	1,3	-	-	-	7,9	2,9	-	-	11,6
β -Maallène	4,8	-	12,2	-	-	-	11,5	2,4	-	-	13,4

III-4-1-2- Facteurs Extrinsèques : le sol, le climat, l'environnement :

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la pluviométrie et les conditions édaphiques (composition du sol), représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique de l'huile essentielle (Angioni *et al.* 2006; Sokmen 2004 ; Loziene et Venskutonis 2005 ; Bruneton 1999 ; Garnéro 1991).

Selon Fluck (Fluck 1963) les facteurs écologiques prépondérants sont le climat et le sol. Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne (Bruneton 1999). Les *Citrus* ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (Bruneton 1999). Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en huile essentielle sous l'effet de fertilisants (Alvarez-Castellanos *et al.* 2003).

Pour la même espèce, le même génotype et le même stade de développement, les facteurs extrinsèques peuvent engendrer des modifications quantitatives et qualitatives importantes pour les huiles essentielles. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux (Bakkali *et al.* 2008; Dunford et Vazquez 2005).

III-4-2-Facteurs d'origine technologique:

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux, depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle (Garnero 1985).

Le mode de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques. Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation, sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction (Morin et Richard 1985).

D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Morin et Richard 1985).

III-5- Les activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles:

Les effets bénéfiques des composés volatils des huiles essentielles sont utilisés depuis fort longtemps par les anciennes civilisations pour soigner les pathologies courantes. Aujourd'hui, après avoir été délaissées, un temps soit peu par la médecine, le potentiel thérapeutique des huiles essentielles et de leurs constituants volatils est reconsidéré et les études qui leurs sont consacrées abondent dans la littérature scientifique.

III-5-1-Activités biologiques:

L'origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisées comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches et l'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* (Pauli 2001; Fabian *et al.* 2006). D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes: certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellal,

néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (γ -terpinène, p-cymène). Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatizants naturels. De ce fait, beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation (Burt 2004).

Les huiles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums (Smallfield 2001). La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et bien d'autres (Kalemba et Kunicka 2003 ; Pérez-Alfonso et al. 2012).

III-5-2-Activités pharmacologiques:

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En aromathérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (Pellecuer et al. 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et Chaumont 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et Leger 1989).

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Maruyama et al. 2005). Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Caldefie-Chézet et al. 2006 ; Koh et al. 2002; Caldefie-Chézet et al. 2004) et de son composé principal, l' α -terpinéol (Hart et al. 2000). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple : l'huile essentielle de géranium (Maruyama et al. 2005) ainsi que le linalol et son acétate (Peana et al. 2002) ont montré une activité anti-inflammatoire sur des oedèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires.

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (Mihailovic-Stanojevic et al. 2013 ; Edris 2007 ; Karioti et al. 2006). Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure

phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (Braga et al. 2006). L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéol, le géraniol/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et l' α -terpinolène (Edris 2007).

Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau et al. 2006). L'huile essentielle d'ail, par exemple, est une bonne source de composés sulfurés (Pyun et al. 2006) reconnus pour leur effet préventif contre le cancer (Milner 2001; Milner 2006). Un autre exemple est la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines huiles essentielles, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathione S-transférase chez la souris (Ahmad et al. 1997) et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(a)pyrène au niveau des poumons de la souris (Zheng et al. 1992). Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain (Lee et al. 2005).

L'activité anticancéreuse du d-limonène, le composé principal des huiles essentielles de *Citrus*, a été prouvée à plusieurs reprises, en particulier au niveau du cancer de l'estomac et du foie (Uedo et al. 1999).

Certaines études ont mis en évidence l'activité cytotoxique d'huiles essentielles dans leur ensemble. En voici quelques exemples: l'huile essentielle de *Pinus wallichiana* (Yousuf Dar et al. 2012), *Comptonia peregrina* (Sylvestre et al. 2007), *Myrica gale* (Sylvestre et al. 2005), *Crotons flavens* (Sylvestre et al. 2006), *Melissa officinalis* (De Sousa et al. 2004), *Malaleuca alemyfolia* (Calcabrini et al. 2004), et *Artemisia annua* (Li et al. 2004).

Le nérolidol, un sesquiterpène actif de la plante de l'Amazon *Viola surinamensis* possède une activité antimalaria prouvée par les études de Lopes et al. 1999, dont l'huile essentielle cause l'inhibition à 100% du développement de l'agent infectieux, cette activité est liée à l'inhibition de la biosynthèse des glycoprotéines.

Avec l'émergence de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les huiles essentielles antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses. Beaucoup de groupes de recherche ont étudié, par exemple, l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca alemyfolia* contre la souche *Staphylococcus aureus*, résistante à la méthicilline («methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus» ou MRSA) (Dryden *et al.* 2004 ; Chan *et al.* 1998 ; Carson *et al.* 1995). Cette huile, dont le composé majoritaire est le terpinèn-4-ol, a montré de très bons résultats *in vitro* contre la prolifération de MRSA. Toutefois, son efficacité en milieu clinique demeure contestée (Flaxman 2005).

III-5-3-La toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde (Smith *et al.* 2000) ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines (Naganuma *et al.* 1985). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. Les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Franchomme et Pénnoël 1990).

III-5-4-Activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Les vertus antimicrobiennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles (Hala *et al.* 2000) et des applications sans bases scientifiques précises. La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle 1955). On note aussi l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (Beylier-Maurel 1976). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt 2004).

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HE des plantes aromatiques (Schmidt *et al.* 2012 ; Sienkiewicz *et al.* 2011 ; Tohidpour *et al.* 2010 ; Fisher et Phillips, 2009 ; Gutierrez *et al.* 2008 ; Cox *et al.* 2000 ; Dorman et Deans 2000 ; Flamini *et al.* 1999 ; Marino *et al.* 1999).

In vitro, l'effet microbicide de certaines HE a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (Valnet *et al.* 1978). De plus, Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka 2003). Plusieurs travaux montrent

que les HE et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Sienkiewicz et al. 2011 ; Schmidt et al. 2012; Xianfei et al. 2007 ; Zenasni et al. 2008 ; Karaman et al. 2001 ; Lis-Balchin et al. 2001 ; Lis-Balchin et al. 2000 ; Perez et al. 1999 ; Sow et al. 1995 ; Carson et Riley 1995). L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable (Tantaoui-Elaraki et al. 1993).

Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à l'action des huiles essentielles et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan et al. 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et al. 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman et Deans 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (May et al. 2000 ; Tohidpour et al. 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* (Shin et Kim 2005).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives (Rota et al. 2008; Agnihotri et al. 2003; Bourrel 1993). Son composé majoritaire, le carvacrol (No. CAS 499-75-2), possède également une forte activité antimicrobienne (Caccionni et al. 1998). D'après les travaux de Sivropoulou et al. 1996, et Hudaib et al. 2002, les huiles de menthe et d'origan présentent des activités antibactériennes remarquables contre les souches à Gram⁺ et à Gram⁻.

L'activité antifongique et antibactérienne des HE et de leurs constituants est décrite par plusieurs études (Schmidt et al. 2012; Sienkiewicz et al. 2011 ; Espina et al. 2011 ; Fisher et Phillips 2009 ; Rota et al. 2008; Gutierrez et al. 2008.; Xianfei et al. 2007; Shin et Kim 2005 ; Inyoue et al. 2001; Sivropoulou et al. 1996 ; Kim et al. 1995; Juven et al. 1994; Conner 1993; Lagouri et al.1993 ; El Naghy et al. 1992)

Ultee et coll. (Ultee et *al.* 2000b ; Ultee et *al.* 1998) qui ont montré l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments.

Shin et Kim 2005 ont montré que les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus*.

Une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle (Siddiqui et *al.* 1996).

L'huile de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil) et celle d'eucalyptus d'origine australienne ont été testées sur le virus de l'herpès simplex dans des cultures cellulaires (Schnitzler et *al.* 2001).

Le carvacrol, thymol possède une activité antibactérienne et une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes (Schwämmle et *al.* 2001), également l'huile essentielle de la *Menthe pouliot* dont le composé majoritaire est la R (+) Pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Pénicillium* et *Mucor* (Belghazi et *al.* 2002).

III-6- Mode d'action des huiles essentielles:

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalembe et Kunicka 2003 ; Burt 2004). Il est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE qui est largement diversifié (Cox et *al.* 2000 ; Harkenthal et *al.* 1999; Kandil et *al.* 1994; De Buochberg et *al.* 1976). Il est fort probable que l'activité antimicrobienne des HE, résulte d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Burt 2004 ; Carson et *al.* 2002, Skandamis et *al.* 2001) (figure 9).

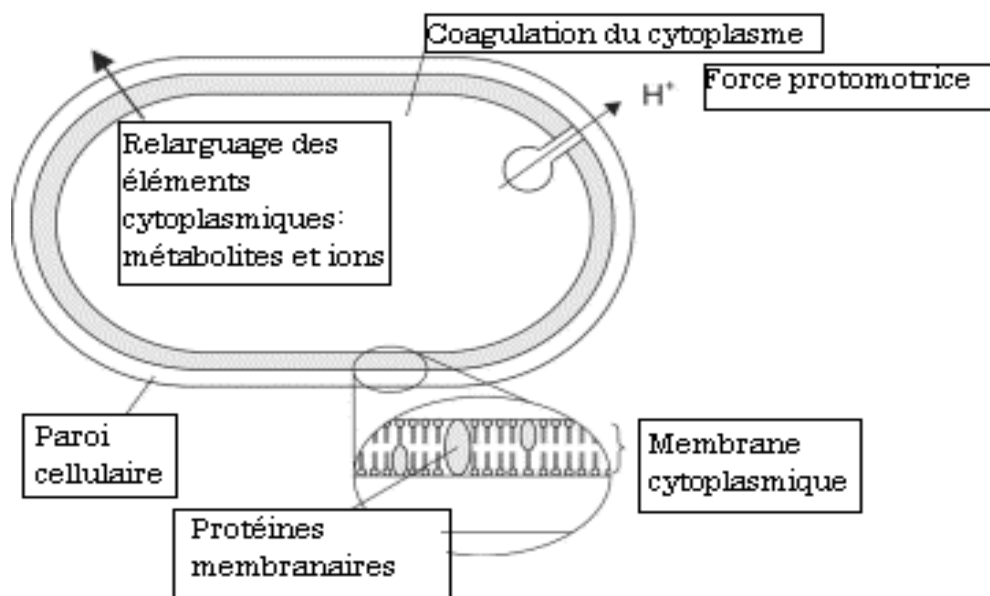


Figure 9 : Mode d'action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt 2004).

Dégradation de la paroi cellulaire (Thoroski et al. 1989; Helander et al. 1998), Endommagement de la membrane cytoplasmique (Knobloch et al. 1989; Sikkema et al. 1994; Oosterhaven et al. 1995; Ultee et al. 2000a, 2002), Endommagement des protéines membranaires (Juven et al. 1994; Ultee et al. 1999); Relarguage du contenu cellulaire (Oosterhaven et al. 1995; Gustafson et al. 1998; Helander et al. 1998; Cox et al. 2000; Lambert et al. 2001); Coagulation du cytoplasme (Gustafson et al. 1998) et de l'épuisement de la force motrice de proton (Ultee et Smid 2001; Ultee et al. 1999).

La propriété hydrophobe qui caractérise les molécules présentes dans les huiles essentielles, permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al. 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions, de composés intracellulaires et l'inhibition des enzymes membranaires intégrées (Souza et al. 2013 ; Trombetta et al. 2005 ; Carson et al. 2002 ; Ultee et al. 2002 ; Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001, Skandamis et al. 2001). Dans le cas où les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie ou si la perte de matériel est trop importante, cela entraîne la mort cellulaire (Burt 2004).

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antimicrobienne des HE ou de leurs constituants ont été décrites dans la littérature.

Des observations en microscopie électronique à transmission réalisées par Rasooli et al. 2006 sur des bactéries de *Listeria monocytogenes*, exposées à des huiles essentielles de *Thymus xporlock*, ont mis en évidence une diminution de la taille des bactéries, moyen probablement

employé pour survivre, (figure 10 b), une altération de la paroi bactérienne (figure 10 b, c et d), une aggrégation du cytoplasme (figure 10 c) et un rapprochement des cellules (figure 10 b et figure 10 c).

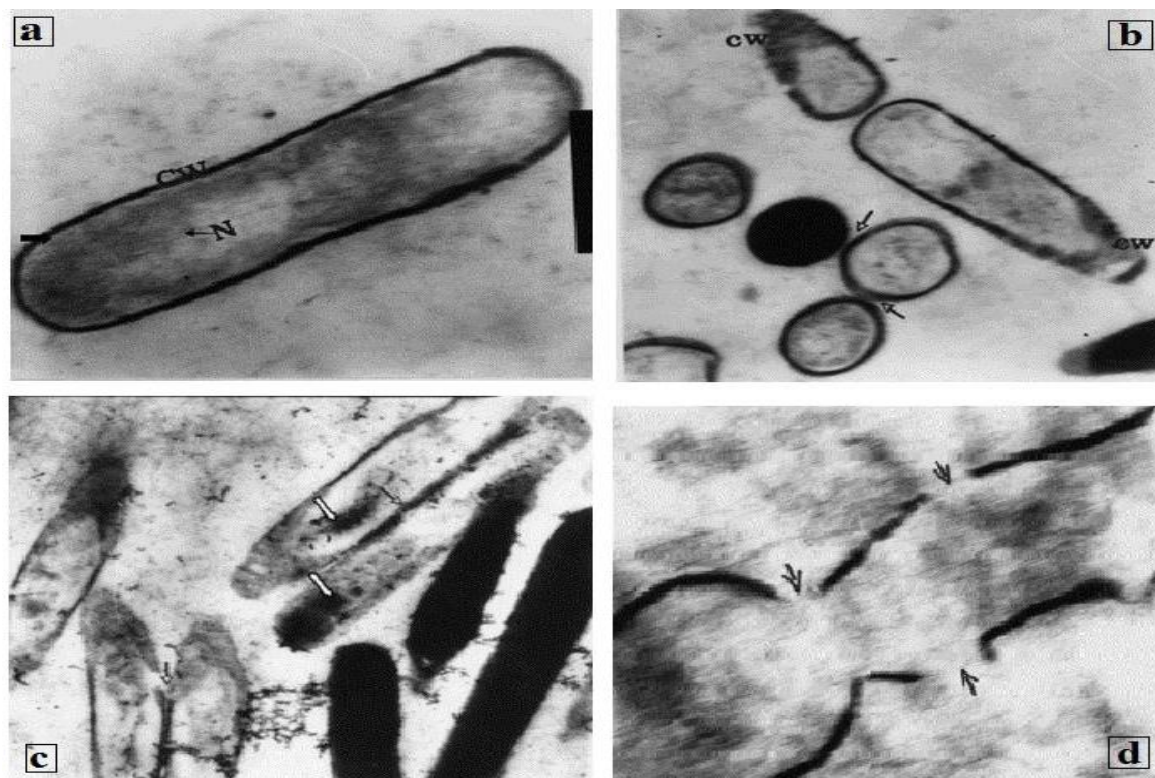


Figure 10: Observation en microscopie électronique à transmission des bactéries de *Listeria monocytogenes* (Rasooli et al. 2006).

- (a): microphotographie électronique ($\times 50\,000$) de *L. monocytogenes* (contrôle) avec N: chromosome, CW: paroi cellulaire.
- (b): microphotographie électronique ($\times 80\,000$) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de *Thymus xporlock* (dilution 1/16). Les cellules présentent une diminution de la taille (probablement pour la survie). La paroi cellulaire (CW) subit des changements dégénératifs. Les cellules se rapprochent les unes des autres (flèches).
- (c): microphotographie électronique ($\times 30\,000$) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de *Thymus xporlock* (dilution 1/8), le cytoplasme a perdu sa distribution montrant même une agglutination de matériel cytoplasmique (flèches blanches). Les cellules se rapprochent les unes des autres (petites flèches noires).
- (d): microphotographie électronique ($\times 80\,000$) de *L. monocytogenes* exposée à l'huile essentielle de *Thymus xporlock* (dilution 1/8). La cellule présente de graves endommagements de la paroi et organites cellulaires.

L'influence du carvacrol et du thymol sur des souches de *Staphylococcus aureus* a été étudiée par Souza et al. 2013. Ils ont conclu que les concentrations sublétales du carvacrol et du thymol (0,3 et 0,15 $\mu\text{L/mL}$) inhibent l'activité enzymatique de la coagulase et la lipase, entraînent une suppression totale de la production d'entérotoxine et une diminution de la tolérance au sel. Une perte d'ions potassium et de matériel absorbant à 260 nm a eu lieu immédiatement après l'addition de 0,6 $\mu\text{L/mL}$ de carvacrol et 1,2 $\mu\text{L/mL}$ de thymol. Des

observations au microscope électronique à balayage ont montré des déformations cellulaires de *S. aureus*. Le largage du matériel cellulaire et l'altération de la surface cellulaire suggèrent un endommagement de la membrane cytoplasmique cellulaire, ce qui entraîne une perturbation de la sécrétion de protéines et pourrait être responsable des propriétés anti-staphylocoques du carvacrol et du thymol (Souza et al. 2013).

Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *Bacillus cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire. Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (Ultee et al. 2002, Ultee et al. 1999). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus*. Deux hypothèses ont été présentées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule n'est plus possible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (Ultee et Smid 2001).

Le cinnamaldéhyde, principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*), est très actif contre de nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* sp). Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill et Holley 2004 et 2006).

Kwon et al. 2003 ont effectué des observations en microscopie électronique à balayage sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Les *B. cereus* traitées avec le cinnamaldéhyde apparaissent plus allongées et ont une forme filamenteuse (figure 11b) que les cellules non traitées (figure 11a), le cinnamaldéhyde empêche la formation complète de septum de division et entraîne une modification de la morphologie cellulaire. Chez *S. aureus*, il n'y a aucune modification de la morphologie cellulaire (figure 11c et d) mais un relargage des protéines cytoplasmiques, qui se traduit par une forte diminution de la densité cellulaire.

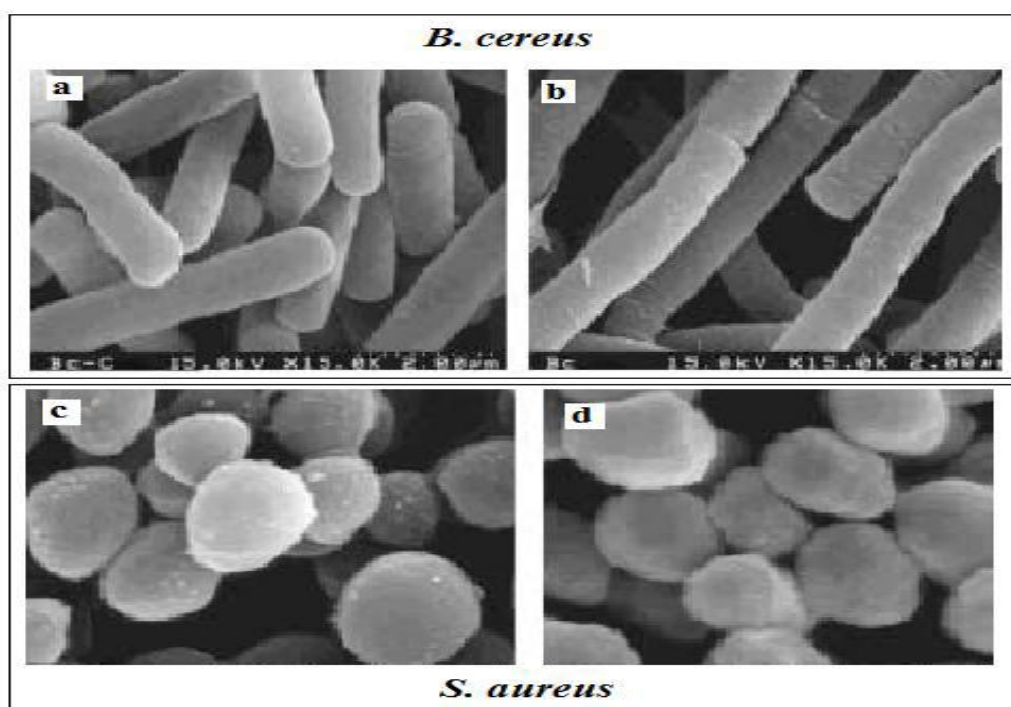


Figure 11 : Micrographies électroniques à balayage de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Kwon *et al.* 2003).

(a et c) : témoins, (b et d) : traitement au cinnamaldéhyde

Le mode d'action des HE dépend aussi du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Zomorodian *et al.* 2012 ; Burt 2004). Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman et Deans 2000).

III-7- Composition chimique des huiles essentielles:

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et éminemment variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les composés terpéniques et les

composés aromatiques dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bakkali et *al.* 2008 ; Bruneton 1999; Teisseire 1991).

III-7-1- Terpènes:

Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les huiles essentielles. Bien que les hydrocarbures terpéniques aient des structures très diverses, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore isoprène. On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe: les monoterpènes (C₁₀), les sesquiterpènes (C₁₅), les diterpènes (C₂₀), les triterpènes, (C₃₀) et les tétraterpènes (C₄₀). Les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils, c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono et les sesquiterpènes (Bruneton 1999) (Tableau 3).

Exceptionnellement, quelques diterpènes (C₂₀H₃₂) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Bakkali et *al.* 2008 ; Vila et *al.* 2008 ; Lahlou 2004 ; Richter 1993). La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, β -vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' α -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc. (Tableau 3).

Tableau 3 : Différents types de molécules rencontrées dans l'huile essentielle (Loupy 2006).

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹)
<i>Monoterpènes</i>			
Limonène	C ₁₀ H ₁₆	175.4	< 10 ⁻³
Pinène	C ₁₀ H ₁₆	157.9	< 10 ⁻³
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	164	< 10 ⁻³
Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	167	< 10 ⁻³
γ-Terpinène	C ₁₀ H ₁₆	183	< 10 ⁻³
para-Cymène	C ₁₀ H ₁₆	173.9	< 10 ⁻³
<i>Sesquiterpènes</i>			
β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	268.4	< 10 ⁻³
α-Santalene	C ₁₅ H ₂₄	247.46	< 10 ⁻³
α-Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	270.7	< 10 ⁻³
β-Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	266	< 10 ⁻³
<i>Diterpène</i>			
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	335.5	< 10 ⁻³
<i>Alcools</i>			
Géranol	C ₁₀ H ₁₇ OH	229.5	0.67
Linalool	C ₁₀ H ₁₇ OH	198.5	0.67
<i>Aldéhydes</i>			
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	210.9	2.61
Cuminic aldéhyde	C ₁₀ H ₁₂ O	254.6	0.26
<i>Ketones</i>			
Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	207.4	0.92
Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	230.5	1.60
<i>Phénols</i>			
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	233	0.85
Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	255	2.52
<i>Acétates</i>			
Neryl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	274.5	0.71
Linalyl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	220	0.57
<i>Oxydes</i>			
1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	174.8	5.8 x 10 ⁻³
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	198.5	0.67

III-7-2- Composés aromatiques :

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Ces composés aromatiques empruntent une voie biosynthétique différente de celle des terpènes (Bakkali et *al.* 2008) et ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles.

Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. (Bakkali et *al.* 2008 ; Bruneton 1999; Teisseire 1991).

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Bakkali et *al.* 2008) (Figure 12).

III-7-3- Composés d'origines diverses :

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanaol, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linolénique) (Bruneton 1999).

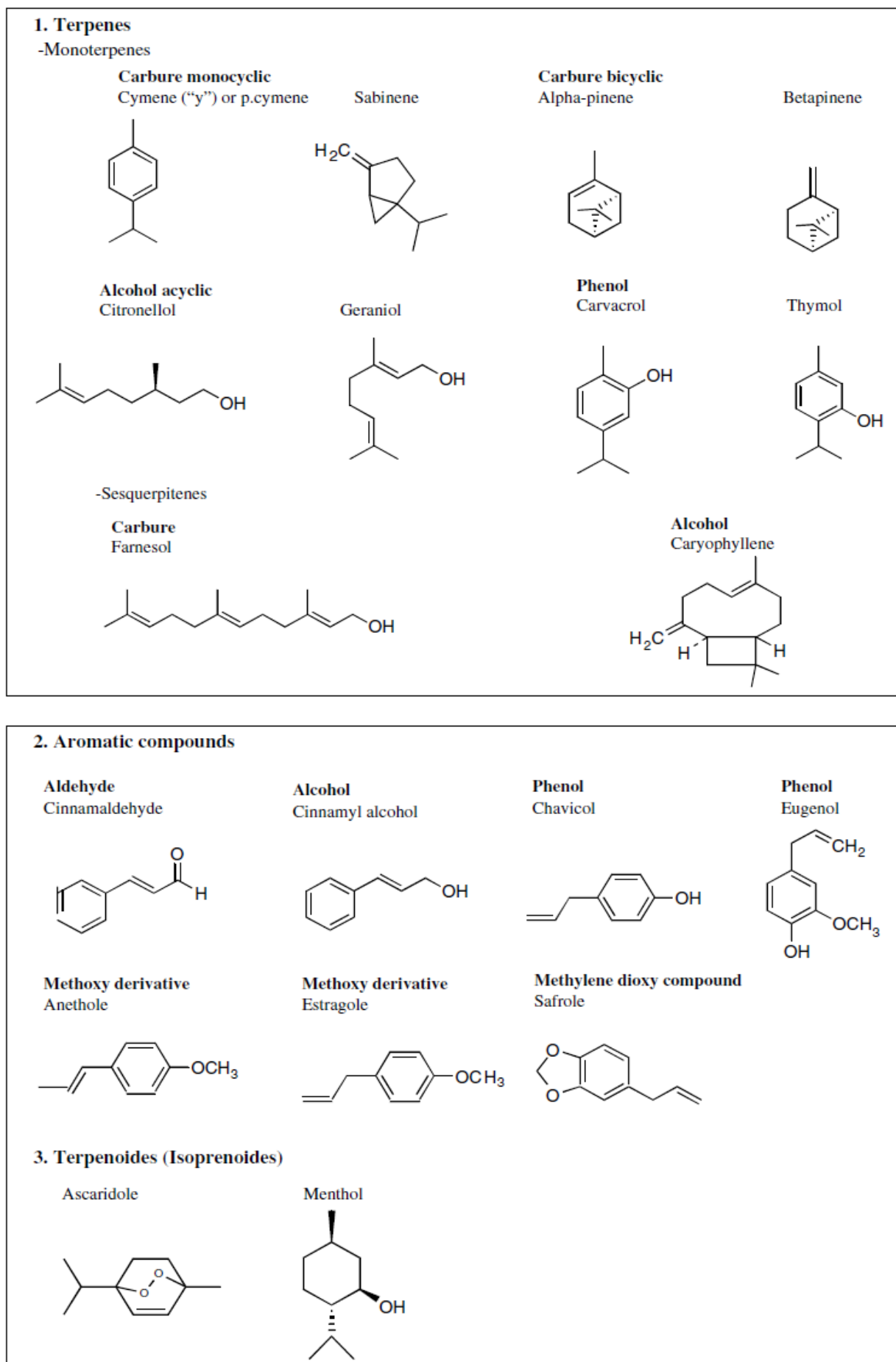


Figure 12: Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.
(Bakkali et al. 2008).

III-8- Classification des composés terpéniques chez les plantes:

III-8-1- Définition:

Vers le milieu du XIX^{ème} siècle, les travaux sur l'essence de térébenthine sont à l'origine du terme "terpènes". Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. On les trouve fréquemment dans les huiles volatiles des plantes, nommées huiles essentielles car elles renferment la "*Quinta essentia*", la fragrance de la plante (Lamarti et *al.* 1994). On peut en rencontrer encore, chez les animaux, les phéromones et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes et dans les organismes marins (Bruneton 1993).

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone de formule (C_5H_8) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène (I) (Figure 13) est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et *al.* 1958 et Bloch et *al.* 1959. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (II), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également.

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.).

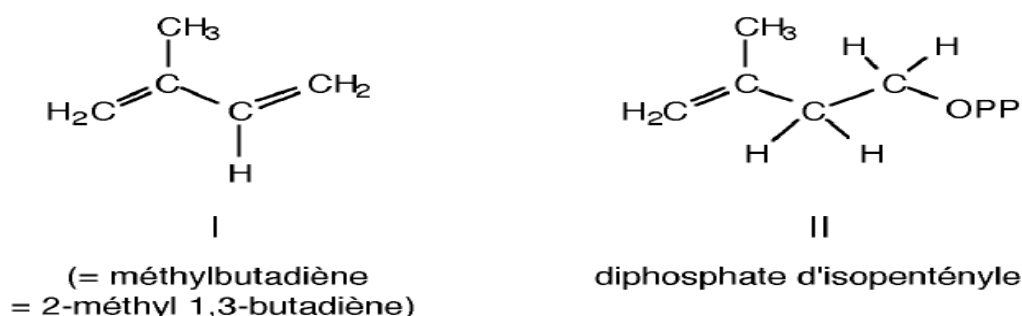


Figure 13 : Structure chimique de l'isoprène (I) et diphosphate d'isopentényle (II)

III-8-2- Classification des composés terpéniques:

La classification des terpènes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène, ils sont subdivisés en : Hémiterpènes (C₅), monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), sesterpènes (C₂₅), triterpènes (C₃₀), tetraterpènes (C₄₀) et polyterpènes (C_{5H₈})_n. Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires avec les flavonoïdes et les alcaloïdes.

III-8-2-1- Les monoterpènes :

Les monoterpènes (C₅H_x)₂ sont une classe de terpènes à 10 atomes de carbone, ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles. Ils existent sous la forme des hydrocarbures simples (limonène, myrcène..), d'aldéhydes (géraniol, néral, citronellal, citral), d'alcools (géraniol, nerol, citronellol, citrol, linalol,..) et d'acides (acide linalique, acide géranique) voire d'esters (acétate de linalyle..).

Les monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acycliques), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (Figure C-4). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen et *al.* 1977).

➤ Les monoterpènes acycliques : (Figure C-4)

Le géranyl pyrophosphate (GPP), est le précurseur de cette catégorie de monoterpènes. Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal.

➤ Les monoterpènes monocycliques : (Figure C-4)

Ces composés sont formés à partir du néryl pyrophosphate (NPP) ou du géranyl pyrophosphate (GPP) (Croteau et Kartp 1977). Les composés aromatiques sont les plus importants dans cette catégorie, comme le p-cymène et ses dérivés hydroxyles qui se trouvent associés avec le α -terpinène (Poulose et Croteau 1978). On distingue 4 groupes dans cette catégorie:

- 1- Les hydrocarbures en C₁₀H₁₆ contenant deux doubles liaisons: D-limonène et les phellandrènes sont les représentants les plus connus de cette famille.
- 2- Les hydrocarbures en C₁₀H₁₈ contenant une double liaison: les terpinéols sont les plus fréquents dans cette famille.

3- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{20}$: Les menthanes (hydrocarbures saturés) n'existent pas à l'état naturel, mais on trouve leurs dérivés alcool et cétone correspondants: le menthol et la menthone.

4- Les hydrocarbures en $C_{10}H_{20}$ contenant un oxyde: Dans cette famille, le cinéole ou l'eucalyptol sont très abondants.

➤ **Les monoterpènes bicycliques : (Figure 14)**

Ces composés se trouvent dans un grand nombre d'huiles essentielles, surtout celles issues des conifères. La plupart de ces monoterpènes font partie des familles pinane, bornane ou thujane, tandis que les familles fenchane et carane sont moins représentées. Les monoterpènes majeurs issus du pinane sont l' α -pinène et le β -pinène qui sont largement distribués dans les plantes (Croteau et Karp 1977). Le bornéol, l'isobornéol et le camphre sont les terpènes les plus importants dans la famille bornane. Les terpènes les plus communs de thujane sont les cétones thujone et isothujone, les alcools et les hydrocarbures associés. Le fenchone (cétone) et les alcools (α -fenchol et β -fenchol) sont des constituants majeurs de la famille fenchane. Enfin, le car-3-ene est le seul monoterpène commun de la famille carane.

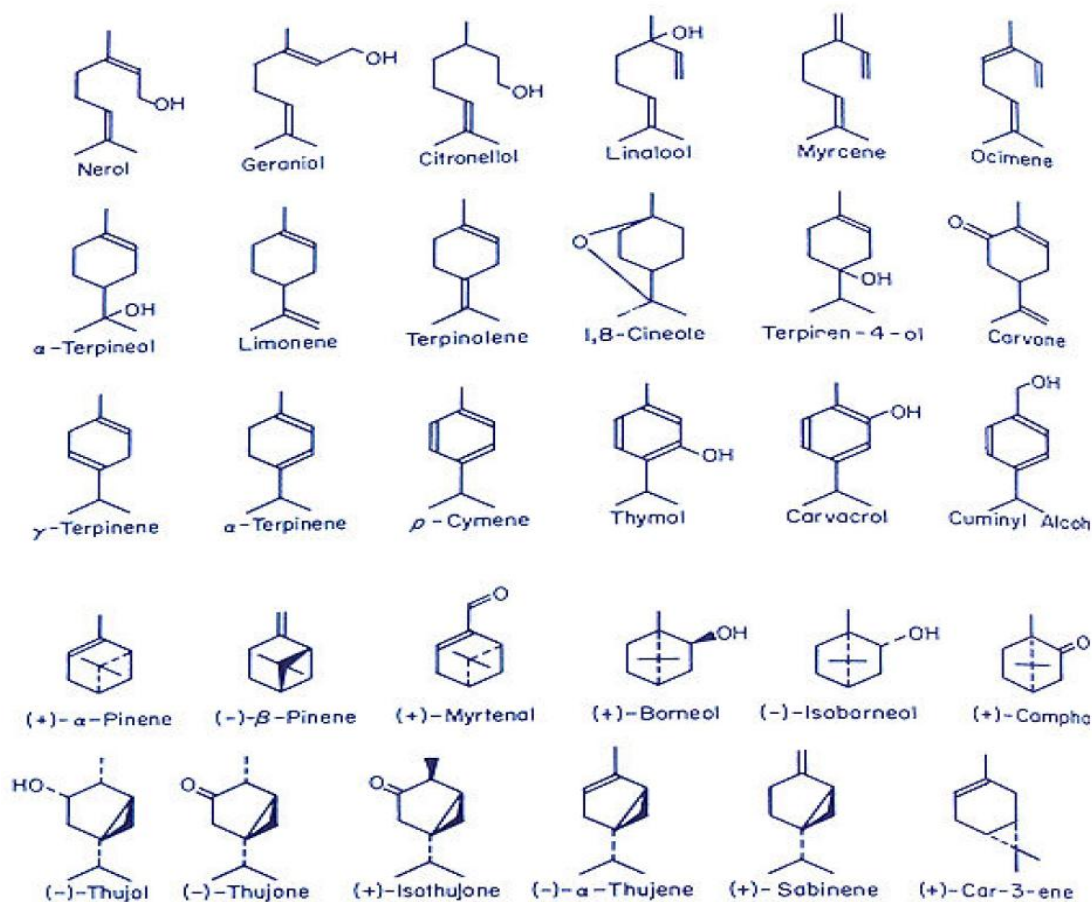


Figure 14: Certaines molécules représentatives des monoterpènes acycliques et monocycliques et bicycliques (Loomis et Croteau 1980).

Les iridoides et les pyréthrinines forment deux classes de composés tout à fait particulières des monoterpènes. Les iridoides sont des monoterpènes caractérisés par un squelette <<cyclopenta[c] pyrane >>, ou le squelette << iridane >> (Figure 15).

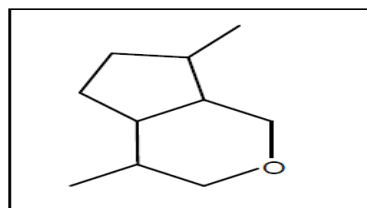


Figure 15: Squelette iridoide.

Les autres exemples des monoterpènes irréguliers issus par un couplage non classique de l'isopentényle pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate sont connus sous le nom de <<pyréthrinines>> (Padua et *al.* 1999). Les monoterpènes existent à l'état halogéné chez les algues et sont largement distribués chez les végétaux : exemples d'ordre astérales et laurales (Konig et *al.* 1990 ; Bruneton 1993).

III-8-2-2- Les sesquiterpènes:

Ce n'est qu'en 1910 que Semmler détermine la structure correcte du premier composé sesquiterpénique, le β -santène. Trois ans plus tard, en 1913 Kerschbaum établit la structure du trans-2-trans-6-farnésol, un alcool linéaire, la deuxième structure sesquiterpénique décrite avec précision (Teisseire 1991). Depuis, le nombre de composés sesquiterpéniques n'a cessé de croître.

Les sesquiterpènes sont des composés à 15 atomes de carbones constitués de trois unités isopréniques et dérivant de leur précurseur universel, le farnésyl diphosphate (FPP). Ils se divisent en plusieurs catégories structurales : acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes dont les molécules les plus caractéristiques sont présentées à la figure 16.

➤ **Les sesquiterpènes acycliques :**

Ils sont susceptibles d'être dérivés de trans, trans-farnésyl pyrophosphate (FPP) qui constitue l'analogue de la génération des monoterpènes acycliques à partir de géranyl-pyrophosphate (GPP). Généralement tous les monoterpènes acycliques ont un analogue sesquiterpène direct.

➤ **Les sesquiterpènes monocycliques :**

Les sesquiterpènes monocycliques sont divisés principalement en 4 familles: Bisabolan, Germacran, Eleman et Humulan (Figure 17). Le zingibérène est un exemple de la famille du Bisabolan, que l'on retrouve par exemple dans l'essence de Gingembre. Le periplanone, dérivé du germacrane est une phéromone sexuelle chez la blatte.

➤ **Les sesquiterpènes polycycliques :**

Parmi les sesquiterpènes polycycliques, le caryophyllène est le plus important que l'on retrouve principalement dans le poivre et certaines épices.

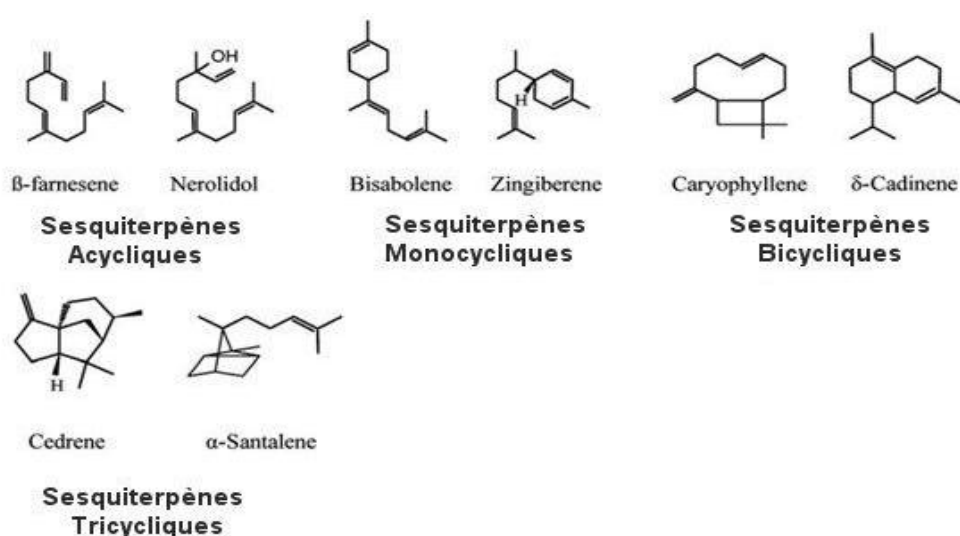


Figure 16 : Schémas des principales formes de squelettes carbonés des sesquiterpènes (modifié d'après Dudareva *et al.* 2006).

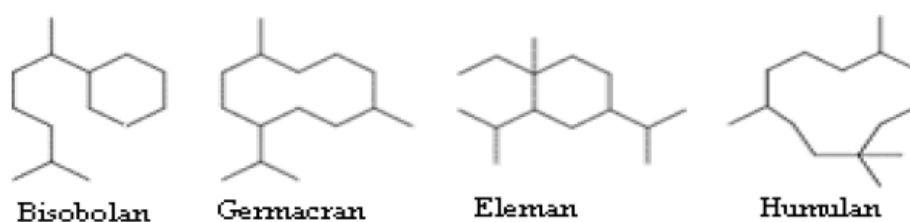


Figure 17: quatre molécules représentatives des 4 principales familles de sesquiterpènes monocycliques.

III-8-3- La biosynthèse des terpènes:

Les terpènes sont des composés qui dérivent tous d'une molécule unique à cinq atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate, ou IPP, et de son isomère le diméthylallyl diphosphate, ou DMAPP.

L'IPP et le DMAPP sont formés par deux voies biosynthétiques distinctes : la voie dite classique du mévalonate/acétate, ou voie MEV à partir de l'acetyl-CoA, qui se déroule dans le cytoplasme ou les mitochondries, et la voie dite alternative indépendante du mévalonate, ou voie MEP (2Cméthyl-D-érythritol 4-phosphate) à partir du 1-deoxyxylulose 5-phosphate qui a lieu dans les plastes.

La synthèse des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes peut être résumée en quatre étapes. La première étape est la synthèse de l'IPP et son isomérisation en DMAPP. La deuxième est la condensation de ces molécules par les prényltransférases pour donner le GPP (géranyl diphosphate), le FPP (farnésyl diphosphate) et le GGPP (géranylgéranyl diphosphate), précurseurs des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes, respectivement.

Dans une troisième étape, les prényl diphosphates subissent des réactions de cyclisation catalysées par un ensemble d'enzymes appelées terpène synthases (TPS) pour produire les squelettes de base. Enfin, dans une quatrième étape, ces squelettes sont remaniés par des enzymes de maturation des terpènes, ce qui aboutit à la formation de centaines de composés différents.

III-9-Les procédés d'extraction des huiles essentielles:

« La distillation n'est autre chose que la séparation de la matière subtile de la matière brute et de celle-ci de la matière subtile. Elle distrait ce qui est fragile et destructible de ce qui est indestructible, ce qui est matériel de l'immatériel. Elle rend spirituel ce qui est corporel et substitue la beauté à la laideur ». *Jérôme Brunschwig, médecin strasbourgeois (1450-1534).*

III-9-1-Distillation:

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points

d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par leur vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme et Pénéol 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau (Silou et *al.* 2004).

III-9-1-1-L'hydrodistillation (water distillation):

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Bruneton 1999) (Figure 18). Cette technique a été appliquée dans de nombreux travaux (Silvério et *al.* 2013; Ghasemi Pirbalouti et *al.* 2013 ; Bekhechi et *al.* 2008; Senhaji et *al.* 2006).

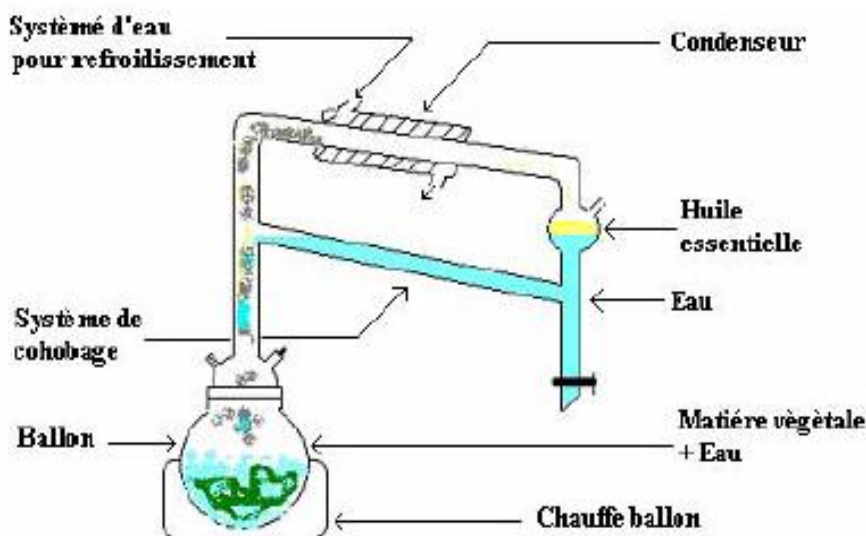


Figure 18: Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle (Bourrel 1993).

III-9-1-2-La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*steam distillation*):

L'entraînement à la vapeur est un procédé utilisé depuis plusieurs millénaires mais a été particulièrement bien défini par Avicenne vers l'an mille. Pendant plusieurs centaines d'années, il a été principalement utilisé dans l'industrie de la parfumerie à Damas et en Iran, pour être par la suite fidèlement copié par Grasse, en France. Ce procédé est susceptible, s'il est bien conduit, de fournir des produits de qualité (Viaud 1993).

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Figure 19). De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle par différence de densité. Cette méthode apporte une

amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme et Pénéol 1990). Industriellement l'entraînement à la vapeur d'eau est la plus utilisée pour l'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le but d'obtenir un bon rendement de l'essence et de réduire le temps d'extraction (Marzouk et *al.* 2006).

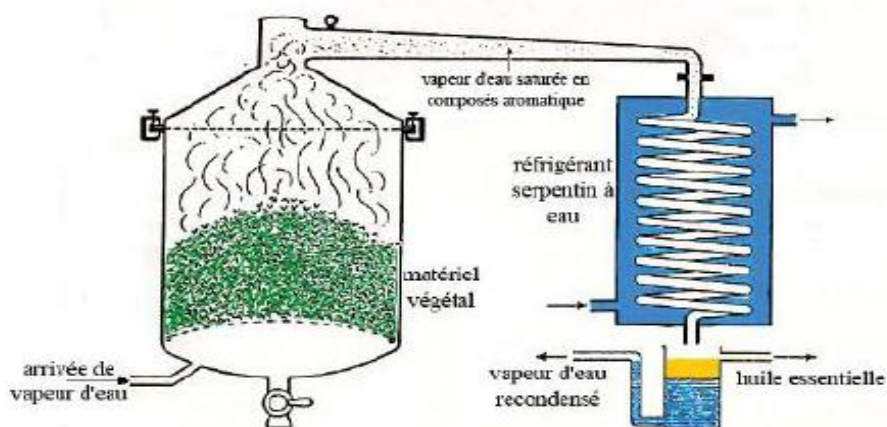


Figure 19 : Entraînement à la vapeur d'eau.

III-9-1-3-L'hydrodiffusion:

Cette technique relativement récente est particulière (Figure 20). Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*per descendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale (Meyer-Warnod 1984). Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Franchomme et Pénéol 1990 ; Richard 1992).



Figure 20 : L'hydrodiffusion.

III-9--2- Expression à froid (expression des épicarpes de citrus):

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de la méthode est très simple : les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique. Le procédé classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface de fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation (Bruneton 1999) ou par décantation (Dugo et Di Giacomo 2002; Kimball 1999). Ces essences sont des produits très fragiles en raison de leur composition terpénique et aldéhydrique (Garnéro 1991).

III-9-3- Extraction par micro-ondes:

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 21). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau

propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante (Mengel et *al.* 1993). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou et *al.* 2007; Lucchesi et *al.* 2007). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Mengel et *al.* 1993; Lucchesi et *al.* 2004). L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (Chemat et *al.* 2006 ; Flamini et *al.* 2007; Lucchesi et *al.* 2007).

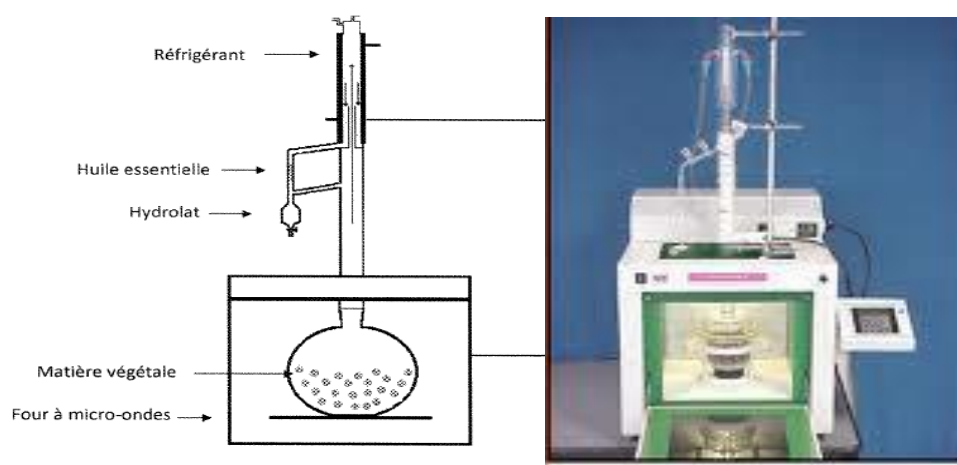


Figure 21: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi et *al.* 2007).



Chapitre 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES



I-Matériel :

I-1- Les plantes sélectionnées:

Pour la réalisation de ce travail nous avons étudié six plantes:

Thymus satureioides Coss, *Origanum compactum* Benth, *Nepeta atlantica* Ball, *Nepeta catari* L., *Nepeta tuberosa* L. et *Nepeta granatensis* Boiss. Les monographies concernant ces plantes sont mentionnées dans la partie bibliographique.

Les espèces choisies ont été collectées pendant la période de floraison des régions connues.

* Concernant *T. satureioides* Coss, les parties aériennes de 32 échantillons ont été recueillies de 7 stations de la vallée Agoundis (Maroc), mentionnées ci-dessous. Les coordonnées géographiques (altitude, latitude et longitude) de chaque échantillon ont été enregistrées en utilisant un système de positionnement global (GPS). La confirmation de l'identification de cette espèce a été faite par le botaniste BenTatout M. de l'Institut Scientifique à Rabat, Département de biologie. Des spécimens de cette plante sont conservés dans l'herbier de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Rabat) et celui de l'Institut Scientifique de Rabat sous le numéro d'index RAB76330.

En parallèle une étude de la productivité en biomasse et en huile essentielle a été effectuée.

La biomasse a été estimée en utilisant la méthode des carrés. Elle consiste à prélever sur une unité d'espace (de 2 à 16 m²) le nombre, le stade végétatif, la vigueur des plants selon un itinéraire représentatif de l'état général du site à explorer. Plus le peuplement est dense plus la surface des carrés est réduite. La biomasse a été déterminée par la pesée directe de toutes les plantes présentes à l'intérieur du carré après avoir été coupées à 10cm du niveau du sol.

* Concernant *Origanum compactum*, neuf échantillons ont été récoltés sur 9 sites différents au Maroc (mentionnés ci-dessous). De même la confirmation de l'identification de cette espèce a été effectuée à l'Institut Scientifique à Rabat.

Les procédures de collecte, de séchage et d'extraction de *T. satureioides* Coss et *O. compactum* Benth ont été réalisées au Laboratoire Plantes Aromatiques et Médicinales, unité de recherche d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques, Centre Régional de la Recherche Agronomique de l'Institut National de Recherche Agronomique, Rabat.

Espèces	Nombre d'échantillons	Provenance
<i>Thymus satureoides</i> Coss.	32	7 stations (Taghbart ; Makhzen ; Makhzen to Ounain ; Wijddane ; Majjou; Tnada n'Ism ; Tijghicht) de la vallée de l'Agoundis à des altitudes qui varient de 1300 à 2182m (voir la partie résultats et discussion)
<i>Origanum compactum</i> Benth.	9	OC1 : site Ben Karich; OC2 : site Souk tiftelt OC3 : site Merchouch; OC4 : site Owazane OC5 : site Taounat; OC6 : site Khenifra OC7 : site Zraïb; OC8 : site Ben Ider OC9 : site Mssabih.

* Concernant *Nepeta* : *N. atlantica* Ball , *N. catari* L., *N. tuberosa* L. et *N.*

granatensis Boiss. Elles proviennent des régions suivantes :

N. cataria: collectée de la région de Kenitra.

N. granatensis et *N. tuberosa* : collectées de la région d'Ifrane.

N. atlantica : collectée de la région de Boumia-Tounfit.

Les huiles essentielles dans ces plantes nous ont été fournies par le Laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et Bio-organique, Faculté des Sciences, Rabat, Maroc.

I-2- Les souches testées:

Les six souches bactériennes choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections (génito-urinaires, intestinale, nosocomiale, de la peau etc.). Ces souches ont été fournies par l'Institut National d'Hygiène (Rabat). Elles comprennent des isolats cliniques (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*), et des souches ATCC (*American Type Culture Collection*) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

II- Méthodes :

II-1-Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles de *Thymus satureoides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth. ont été extraites des parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) des plantes sèches par hydrodistillation dans un appareil de type Clavenger. L'extraction a été réalisée au Laboratoire Plantes Aromatiques et Médicinales Unité de recherche, d'amélioration des plantes, conservation et valorisation des ressources phytogénétiques, Centre Régional de la Recherche Agronomique de l'Institut Nationale de Recherche Agronomique, Rabat (Figure 22 et 23).

Chaque échantillon d'huile essentielle a été étiqueté et fourni au Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) à Rabat pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Les spectres fournis par l'analyse ont été ensuite interprétés pour en définir la composition et identifier les composés majoritaires de chaque échantillon. Au total une quarantaine d'échantillons ont été analysés.



Figure 22 : Séchage des plantes à l'ombre dans un endroit aéré.

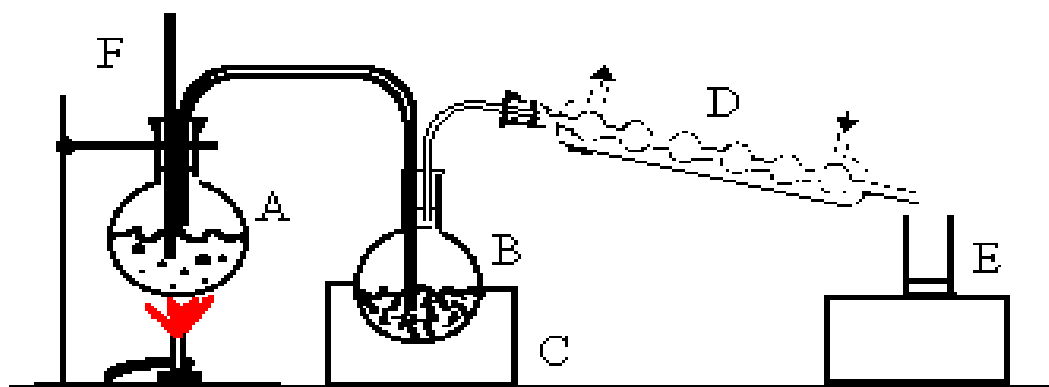
(Laboratoire des PAM de l'INRA Rabat)



Figure 23: Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

(Laboratoire des PAM de l'INRA Rabat)

Pour les échantillons de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis*, l'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau (Figure 24) au sein du laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et bio-organique, Faculté des Sciences, Rabat, Maroc.



A : Ballon eau + quelques grains de pierre ponce.

B : Ballon d'entraînement contenant la matière végétale + eau.

C : Chauffe-ballon.

D : Réfrigérant à eau.

E : Becher pour la récupération de distillat.

F : Tube de sûreté

Figure 24: Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.

Calcul de rendement :

Le rendement de l'HE est le rapport du poids de l'HE extraite et le poids de la matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = (P_h / P_{mv}) \times 100$$

R : Rendement en HE en % ;

P_h : Poids de l'HE en gramme ;

P_{mv} : Poids de la matière végétale en gramme.

II-2- Analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) :

L'analyse CPG/SM d'huiles essentielles a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type ULTRA TRACE GC équipé d'une colonne capillaire VB5 (5% phényl ; 95% methylpolysiloxane) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm épaisseur du film thickness), directement couplée à un spectromètre de masse à impact électronique (Polaris Q ; EI 70 eV). La température de l'injecteur et du détecteur est fixée à 250 ° C et 300 ° C, respectivement. La température du four a été programmée à partir de 60 ° C à 200 ° C à raison d'une montée de

2°C/min, puis de 200 ° C à 300 ° C à raison de 20 ° C / min. Le gaz vecteur est l'Hélium avec un débit 1ml/min. L'appareil est équipé d'un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse.

L'identification des constituants de chaque HE a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse et des temps de rétention avec ceux des bases de données Wiley-NIST 7^{ème} édition.

II-3-Matériel bactérien:

Les souches sujettes de cette étude proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie de l'Institut National d'Hygiène (Rabat). Le choix des souches à tester s'est basé sur le caractère pathogénique, sur les études déjà réalisées et sur leur disponibilité au laboratoire. Pour étudier ces souches nous avons effectué:

- Une re-identification des souches par les différentes techniques standardisées, utilisées au laboratoire de microbiologie de l'Institut National d'Hygiène (Rabat) (coloration gram, galerie biochimique classique, système API 20E et antibiogramme).

- Une conservation des différentes souches à 4C° dans la gélose stockée et à -20°C dans le BHI glycérolé (20%).

L'API 20 E (Appareils et Procédés d'identification) est un système standardisé pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs, non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Son principe est le suivant : la galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les tests. L'utilisation de substrat par la bactérie se traduit par un changement de couleur du milieu ou par apparition de couleur après addition de réactif. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Figure 25). Des exemples d'identification de souche bactérienne Figure 26.

- Ensemencement de la galerie API 20 E

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles



- Lecture de la galerie API 20 E

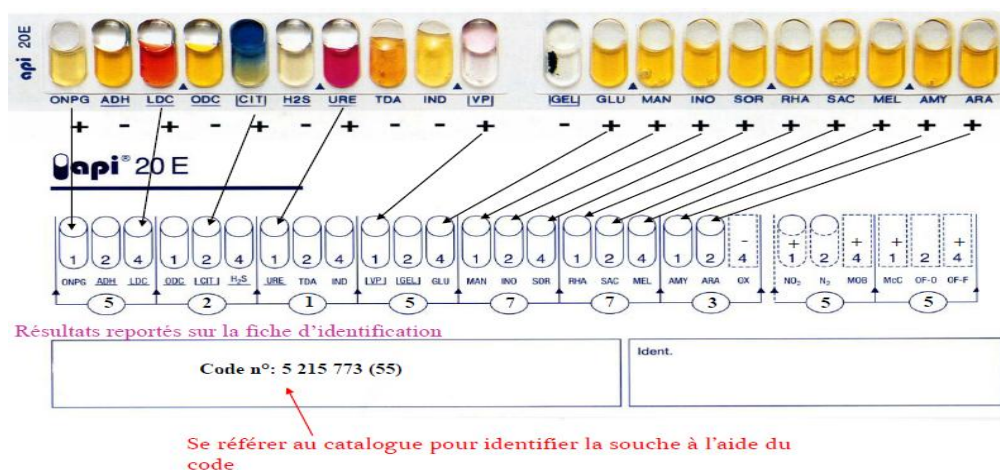


Figure 25 : Procédure d'identification par l'API 20 E.



(a) *Pseudomonas aeruginosa*



(b) *Escherichia coli*

Figure 26: Exemple d'identification par Api 20E achevée.

Les bactéries utilisées dans ce travail pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sont :

- Des souches de référence ATCC : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Des isolats cliniques : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*.

Ces souches font parties de trois familles bactériennes différentes : les *Staphylococcaceae*, les *Pseudomonadaceae* et les *Enterobacteriaceae*.

II-3-1- *Staphylococcus aureus* :

- **Classification**

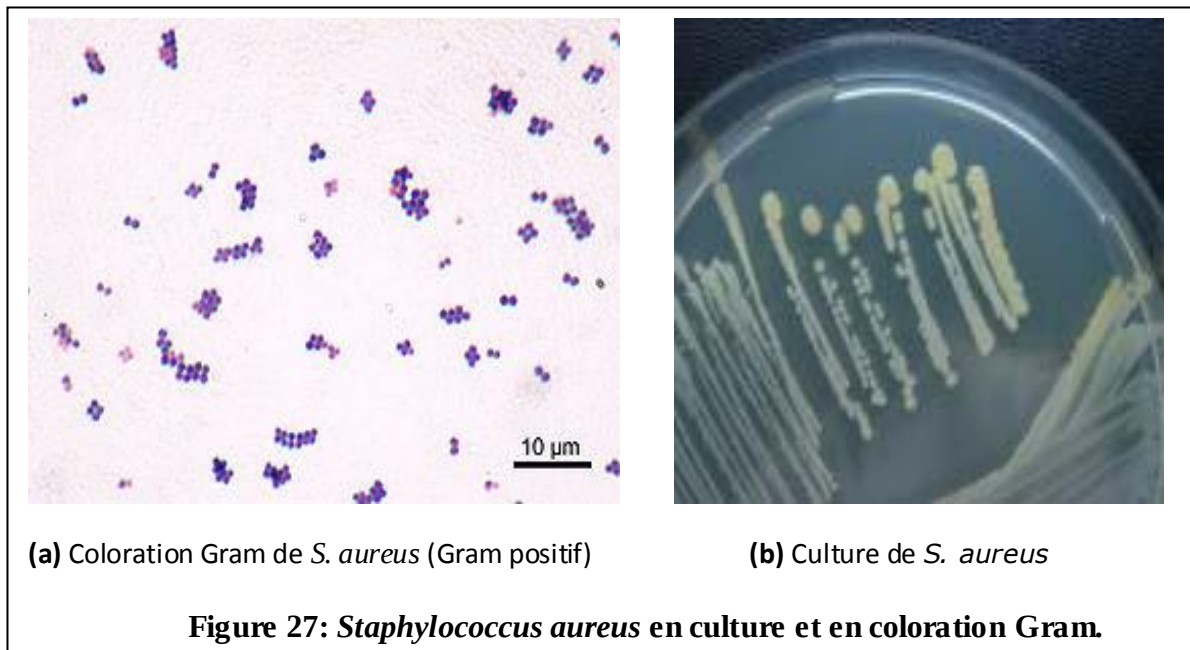
Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

- **Généralités**

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos). Ce sont des bactéries Gram positifs.

Staphylococcus aureus (plus communément appelé staphylocoque doré) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin). Cependant il peut également être isolé, par paires ou en très courte chaîne (Figure 27(a)). Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom staphylocoque doré (Liu 2005).

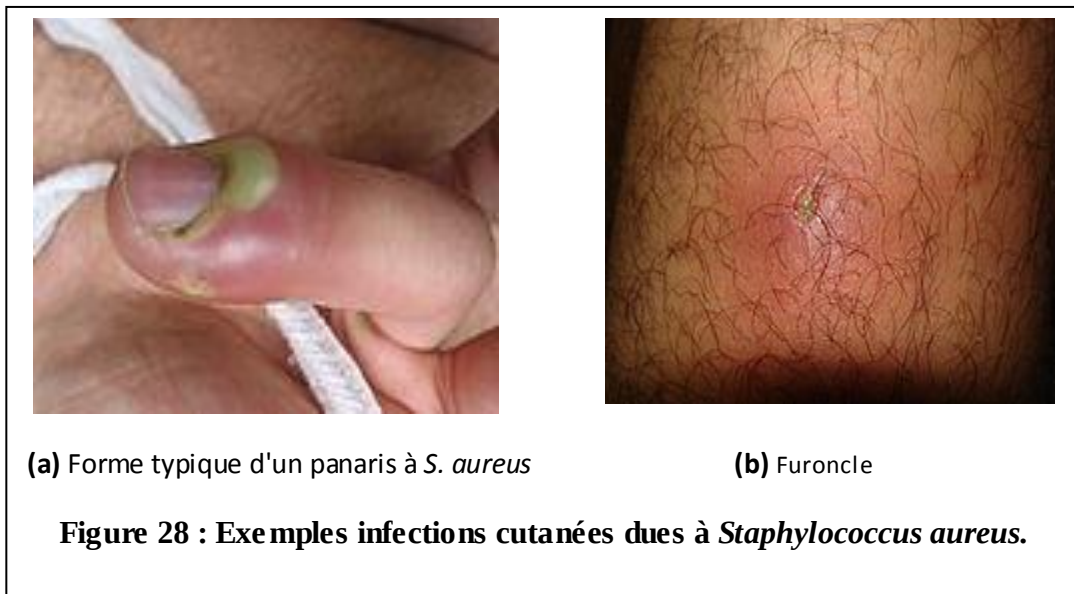
Les *S. aureus* forment en aérobiose des colonies crémeuses, pigmentées (typiquement jaune d'or) et opaques (**Figure 27(b)**).



Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Chez l'homme, le *S. aureus* est retrouvé au niveau des fosses nasales et de la gorge. Il est également retrouvé en faible quantité dans le tube digestif et souvent au niveau du périnée. On le retrouve aussi au niveau des aisselles. A partir du rhinopharynx, la bactérie est disséminée sur la peau du visage et des mains par aérosols. Cette espèce *S. aureus* est commensale de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste dans certains emplacements ou dans certaines circonstances. C'est un germe très important aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales.

Les infections à *S. aureus* les plus fréquentes sont les infections cutané-muqueuses telles que les furoncles, panaris (Figure 28), folliculites, impétigo, anthrax ou les sinusites et les otites. Il s'agit le plus souvent d'auto-infestations. Ces infections se compliquent parfois par extension loco-régionale de l'infection, ou par diffusion hématogène de la bactérie. *S. aureus* peut alors être responsable de septicémies, d'endocardites, de pneumopathie, d'ostéomyélites, d'arthrites, de méningites ou d'infection urinaire.

Les infections cutanées de *S. aureus* s'accompagnent d'une production abondante et localisée de pus résultant de la destruction des cellules phagocytaires et des cellules environnantes (Figure 28). Cette bactérie possède aussi de nombreuses résistances aux antibiotiques qui varient selon les souches.



Certaines souches multirésistantes sont devenues très problématiques ; parmi celles-ci on distinguera :

- le SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- le SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

Le milieu hospitalier est l'endroit idéal pour cette sélection non désirée et *S. aureus* est responsable de nombreuses infections nosocomiales.

II-3-2- *Pseudomonas aeruginosa*:

- Classification

Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

- **Généralités**

Les *Pseudomonadaceae* sont des bactéries Gram négatifs en forme de bâtonnets, mobiles par cils polaires, Ils poussent sur milieu ordinaire en aérobiose, dégagent une odeur aromatique caractéristique.

Les *Pseudomonas* vivent dans l'eau, le sol humide et sur les végétations. Ils peuvent être saprophytes. Ce sont des germes commensaux du tube digestif humain et de certains animaux.

Pseudomonas aeruginosa, ce mot grec est composé de *pseudo*, 'simili' ou 'imitation' et *monas*, 'unité', employé dans les débuts de la microbiologie pour désigner les « germes ». *Aeruginosa*, qui veut dire vert-de-gris en latin, réfère à un pigment que cette bactérie contient (Figure 29).

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil (Figure 30), des plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), des urines (surtout après sondages), gastro-intestinales et des poumons (par exemple après bronchoscopie), des méningites d'inoculation, des septicémies comme stade terminal d'infections graves ou complication chez des malades soumis à un traitement immunodépresseur, des leucémiques, etc. Elle induit facilement des infections systémiques chez les immunodéprimés (par une chimiothérapie ou par le sida) et chez les victimes de brûlures et de fibrose kystique (mucoviscidose).

Il s'agit en général d'un germe responsable d'infections nosocomiales, mais il se rencontre également en ambulatoire chez les patients atteints de mucoviscidose. *Pseudomonas aeruginosa* est résistant à un grand nombre d'antibiotiques.



Figure 29: Culture de *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure 30: Infection de l'œil due à *Pseudomonas aeruginosa*.

II-3-3- *Escherichia coli*:

- Classification

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

- Généralités

La famille des entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles par cils péritriches, quelquefois capsulés, aérobies - anaérobies facultatifs, attaquant le glucose par voie fermentaire.

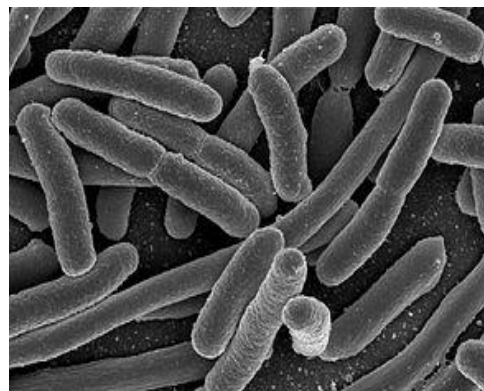
Les entérobactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles semblent plus spécifiquement adaptées à l'homme ou l'animal; certaines sont responsables d'infections humaines parfois sévères (fièvre typhoïde, dysenterie bacillaire, peste). Tandis que d'autres

groupes prolifèrent en abondance dans l'environnement (sol-eaux). Elles participent aux grands cycles de dégradation des matières organiques ou sont étroitement associées aux plantes chez lesquelles elles peuvent déterminer des altérations nuisibles dans le domaine agro-alimentaire (nécroses, dégénérescence ou ramollissement tissulaire, pourriture molle, etc). Elles sont aussi rencontrées dans les bio-industries (fermentation de fromages et produits laitiers, alcools, traitements médicaux supplétifs, industrie pharmaceutique ..).

Escherichia coli découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de nourrissons, couramment appelée "colibacille" (Figure 31). C'est une bactérie intestinale commune chez l'Homme et les animaux. Elle est recherchée comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. Certaines souches d'*E. coli* peuvent entraîner des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.



(a) Coloration Gram d'*E. coli* (bacilles à Gram négatif)



(b) Grossissement $\times 15\,000$

Figure 31 : *E. coli* en coloration de Gram et avec Grossissement.

II-3-4- *Salmonella enteritidis* :

- **Classification**

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Salmonella</i>
Espèce	<i>Salmonella enteritidis</i>

- **Généralités**

Les salmonelles sont des entérobactéries bacilles à Gram négatifs à forte contagiosité, responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïde et paratyphoïde (*S. typhi* et *S. paratyphi*).

S. enteritidis peuvent engendrer des toxi-infections alimentaires. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission.

Les vertébrés aquatiques, notamment les oiseaux et les reptiles sont d'importants vecteurs de salmonelles. Les volailles, les bovins et les ovins étant des animaux fréquemment contaminants, les salmonelles peuvent se retrouver dans les aliments, notamment les viandes, le lait, et un œuf dont la coquille est fêlée. L'homme est contaminé par voie digestive.

Généralement La gélose Salmonella-Shigella (S.S.) est utilisée pour l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* dans les prélèvements cliniques (selles) et les denrées alimentaires. Les colonies caractéristiques de *Salmonella* sont opaques, translucides ou transparentes et généralement avec un centre noir (Figure 32).

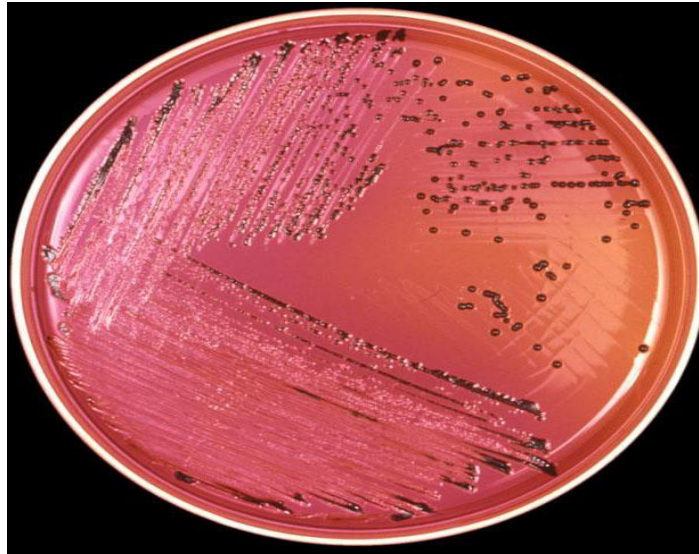


Figure 32: Culture de *Salmonella enteritidis* sur gélose Salmonella-Shigella (S.S.).

II-4- Détermination de l'activité antibactérienne des HE (l'effet bactériostatique):

II-4-1- Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique capable, *in vitro*, d'empêcher une suspension limpide de 10^5 Unités Formant Colonies par millilitre de devenir trouble après 24h d'incubation à 37°C, l'apparition de cette turbidité correspondant à une multiplication d'un facteur 10 environ de la concentration en bactéries (Levison 2004). Cette valeur est susceptible d'être influencée par des facteurs tels que le milieu, la taille de l'inoculum, la température ou le temps d'incubation, ce qui explique la nécessité de méthodes de détermination standardisées afin d'obtenir des résultats comparables (Andrews 2001).

La CMI constitue l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique, que ce soit dans des laboratoires de diagnostic pour évaluer la résistance d'un germe ou dans le cadre de recherches visant à évaluer *in vitro* l'activité d'une substance antibiotique.

Concernant les huiles essentielles ; la concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant le niveau minimum de concentration en huile essentielle qui produit une réduction de 90% de la croissance de colonies microbiennes.

II-4-2- Détermination de Concentration Minimale inhibitrice (CMI) :

❖ Huiles essentielles :

Les huiles essentielles de *Nepeta atlantica* Ball., *Nepeta tuberosa* L. subsp. *reticulata* (Desf.) Maire, *Nepeta cataria* L., *Nepeta granatensis* Boiss. proviennent du Laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et Bio-organique, Faculté des Sciences, Rabat, Maroc.

❖ Souches Bactériennes :

Au cours de cette étude, le laboratoire de microbiologie de l'Institut National d'Hygiène (Rabat) nous a fourni six souches bactériennes, qui ont été choisies pour leur pathogénicité. Les souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*), ont été obtenues à partir des prélèvements pathologiques des patients. Tandis que les souches de références : *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa* ATCC 27853) ont été fournies par l'ATCC (the American Type Culture Collection). Elles sont entretenues par repiquage sur des milieux favorables à leur croissance.

❖ Préparation de l'inoculum :

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle (jeune culture de 18 à 24 heures).

- La réactivation des souches est assurée par ensemencement de la bactérie dans le bouillon BHI (Brain Heart Infusion « infusion cœur-cerveau ») et incubation à 37°C pendant 18 à 24h dans une étuve. Un deuxième repiquage est réalisé sur un milieu gélosé Muller Hinton Agar (MHA) et incubation à 37°C pendant 18 à 24h dans l'étuve.

- La suspension bactérienne est préparée à partir de pré-culture sur le MHA :
 - Prélever à l'aide d'une anse 4 à 5 colonies bactériennes;
 - Transférer les colonies bactérienne dans 5 ml d'eau physiologique (9%) stérile ;
 - Agiter les tubes avec un agitateur électrique (Vortex) pendant 3 secondes. La densité de la suspension bactérienne doit être équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (1.5×10^8 UFC.ml⁻¹).
- La suspension bactérienne doit être distribuée dans les microplaques au cours des 15 min qui suivent sa préparation.

❖ Détermination de la Concentration Minimale inhibitrice (CMI) :

Pour déterminer la CMI des HE, on a adapté la technique de microdilution sur des microplaques à 96 puits fond U avec couvercle (Eloff 1998 ; Oumzil et *al.* 2002; Zenasni et *al.* 2008), utilisant le MTT (3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) comme indicateur de viabilité.

A l'aide d'une micropipette on distribue dans un premier temps un même volume de BMH (100 µl) dans les cupules de la microplaque, puis on ajoute dans la cupule de la deuxième colonne de la microplaque une quantité d'HE x µl et on complète avec le BMH jusqu'à un volume 200 µl dans la cupule. Bien mélanger avec la micropipette.

Dans un deuxième temps on procède à une dilution de l'HE de façon à obtenir des concentrations décroissantes selon une progression géométrique de raison 2. Pour cela on Préleve 100 µl du contenu de la cupule de la colonne 2 et on le transfère dans la cupule de la colonne 3. On procède ainsi jusqu'à la colonne 11 et on prélève alors 100 µl en excès qu'on rejette (Figure 33). Puis on ensemence toutes les cupules de la colonne 2 jusqu'à 12 de la même rangée par 25 µl de suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle et on ajuste au standard 0.5 Mac Farlan.

Dans chaque rangée de la microplaque (12 cupules fond U) on prépare 2 Témoins (cupule 1 et 12):

- Un témoin de stérilité (T) de milieu de culture qui contient uniquement le milieu de culture (100 µl de milieu Bouillon Muller Hinton « BMH »).
- Un témoin de croissance (TS) qui contient 100 µl de milieu BMH ensemencé par 25 µl d'inoculum.

Après inoculation de la microplaque, il faut la recouvrir par son couvercle et l'incuber à 37°C pendant 18h à 24 heures.

Dans tous les essais, le tween 80 est additionné au milieu de culture BMH à une concentration finale de 0.001 v/v pour augmenter la solubilité des HE.

Le Tween 80 et le Tween 20 sont utilisés comme émulsifiants des HE (Allegrini et *al.* 1973 ; Pellecuer et *al.* 1976 ; Benjilali et *al.* 1986 ; Carson et *al.* 1995).

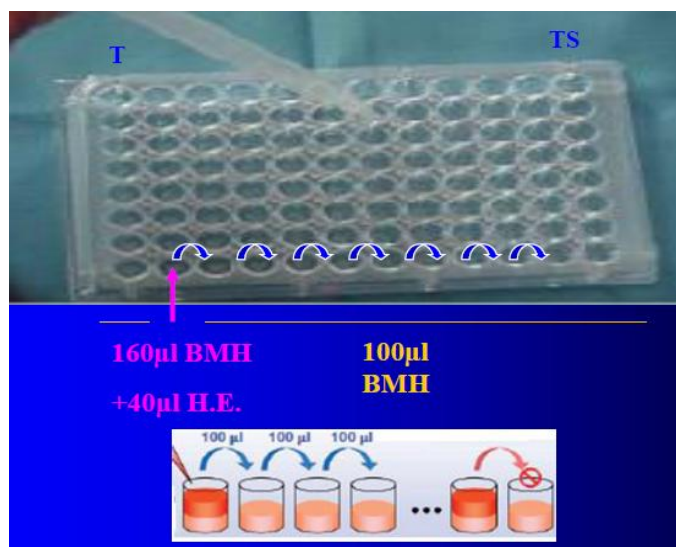
A la fin de la période d'incubation, on prépare extemporanément le MTT à une concentration de 0.2 mg/ml dans l'eau physiologique stérile, puis 40 µl de la solution de MTT est rajoutée dans chaque cupule. La plaque est réincubée à 37°C pendant 30 à 60 min. Le virage de la coloration du jaune au bleu violet indique une croissance bactérienne (Figure 33).

La CMI correspond donc à la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle on n'observe pas de croissance visible (absence de coloration bleu violet).

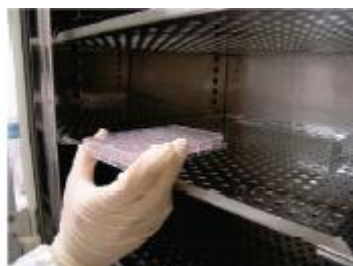
La coloration bleu violet est due à la réduction du tétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des bactéries vivantes actives. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette.

Pour la validité de la technique on a déterminé la CMI du chloramphénicol sur *E. coli* ATCC 25922 ; comme contrôle interne, la valeur obtenue est en concordance avec celle des standards NCCLS (NCCLS 1990).

- Préparation de microplaque



- Incubation



- Révélation par le MTT



Figure 33 : Détermination de la CMI par la technique de microdillution.



Chapitre 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS



I- Etude de la variabilité de la composition chimique de *Thymus satureioides* Coss de la vallée de l'Agoundis:

Dans le but d'étudier la variabilité chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss de la vallée de l'Agoundis, nous avons analysé par CPG/SM les huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de 32 échantillons de *T. satureioides* Coss. Ceux-ci ont été recueillis au stade floraison, de 7 stations de la vallée Agoundis (figure 34). Les coordonnées géographiques (altitude, latitude et longitude) de chaque échantillon ont été enregistrées en utilisant un système de positionnement global (GPS). En même temps une étude de la productivité en biomasse et en HE a été effectuée. Le tableau 4 montre les différents sites d'échantillonnages avec leurs productivités en biomasse et en HE.

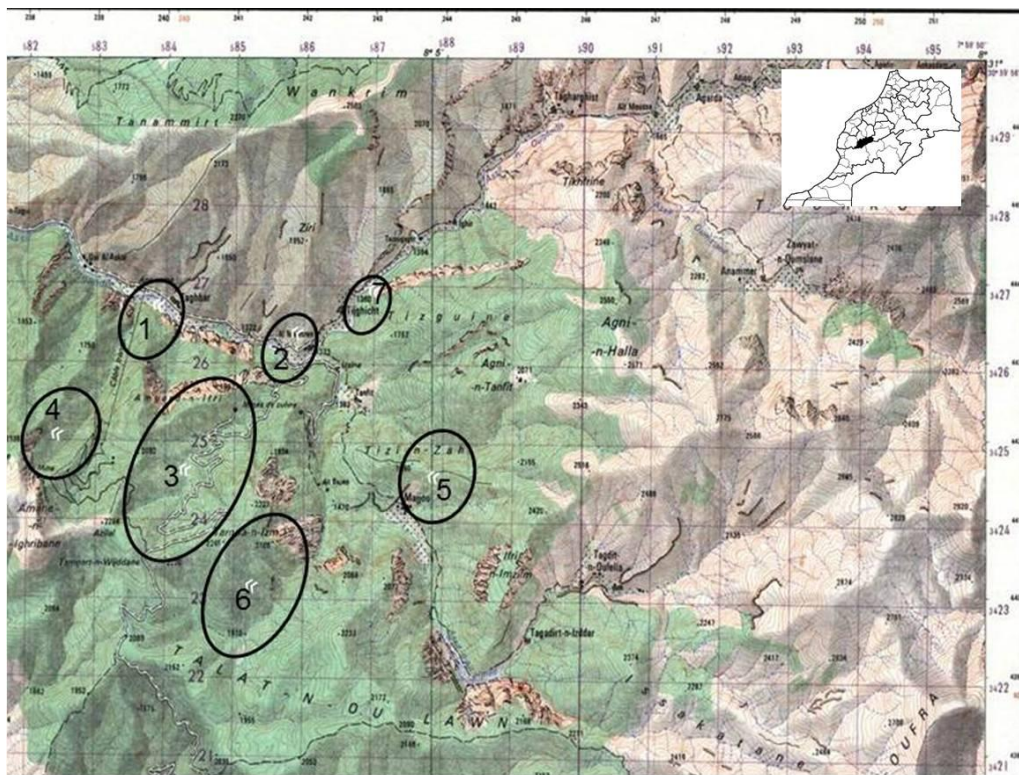


Figure 34 : Répartition des stations d'échantillonnage de *Thymus satureioides* de la vallée de l'Agoundis.

Tableau 4: Sites de collecte et productivité en biomasse et en HE chez le *Thymus satureioides* de la vallée de l'Agoundis.

Stations	Locations	Code d'échantillon	GPS data			Biomasse g/m ²	HE (%)
			Longitude	Latitude	Altitude (m)		
1	Taghbart	1	N32°59'187"	W008°09'523"	1300	-	1,24
		30	N30°58'337"	W008°07'653"	1288	487,5	0,72
		8	N30°58'724"	W008°08'141"	1289	220,5	1,05
2	makhzen	2	N30°57'766"	W008°06'003"	1542	182,4	1,02
		3	N30°57'761"	W008°06'013"	1526	61,1	1,04
		4	N30°57'646"	W008°06'494"	1577	49,6	1,59
3	Makhzen - Ounain	5	N30°57'355"	W008°07'004"	1766	202,1	0,65
		6	N30°57'288"	W008°06'955"	1839	115,4	-
		18	N30°58'798"	W008°09'568"	1457	96,3	0,48
		19	N30°58'760"	W008°09'519"	1515	50	0,98
		20	N30°58'730"	W008°09'470"	1549	55	0,67
		21	N30°58'576"	W008°09'294"	1648	50	0,44
		22	N30°58'347"	W008°09'235"	1695	110	0,78
		23	N30°58'292"	W008°09'192"	1713	120	0,2
		31	N30°58'240"	W008°09'343"	1801	25	0,9
		24	N30°58'302"	W008°09'368"	1791	42,5	0,37
		7	N30°56'389"	W008°07'526"	2181	518,4	1,47
		25	N30°58'469"	W008°09'437"	1742	100	0,66
4	Wijdane	26	N30°56'204"	W008°07'517"	2162	61,3	0,7
		27	N30°56'170"	W008°07'709"	2146	37,5	0,86
		9	N30°56'124"	W008°04'827"	1718	55,6	0,97
5	Majjou	10	N30°56'416"	W008°03'846"	1882	20	1,67
		11	N30°57'057"	W008°56'800"	1643	144,4	0,38
		14	N30°55'132"	W008°06'744"	2013	62,5	1,47
6	Tandan'izm	12	N30°57'817"	W008°05'614"	1496	-	0,85
		13	N30°56'193"	W008°07'701"	2146	62,5	1,4
		32	N30°55'373"	W008°06'031"	2097	125	-
		15	N30°56'054"	W008°07'005"	1964	250	2,29
		16	N30°56'129"	W008°06'662"	1942	225	0,9
7	Tijghicht	17	N30°58'599"	W008°05'727"	1528	125	0,81
		28	N30°58'297"	W008°05'895"	1485	-	-
8	CADEFA*	29	-	-	-	-	-
Moyenne						130,52	0,95

* CADEFA: Coopérative de l'Agoundis pour le Développement Forestier et Agricole.

I-1- Variation du rendement des HE et de la Productivité en biomasse de *T. satureioides* Coss dans de la vallée l'Agoundis:

La biomasse a été estimée par la méthode des carrés. Elle consiste à prélever sur une unité de surface le nombre, le stade végétatif, la vigueur des plants selon un itinéraire représentatif de l'état général du site à explorer. Plus le peuplement est dense plus la surface des carrés est réduite, en moyenne la surface varie entre 2m² et 16m². La biomasse a été déterminée par la pesée directe de toutes les plantes présentes à l'intérieur du carré après avoir été coupées à 10cm du niveau du sol. Un échantillon a été également prélevé pour l'évaluation quantitative et qualitative des huiles essentielles. Les rendements en huile essentielle ont été calculés par rapport à la matière sèche. La figure 35 montre l'estimation de la biomasse moyenne (g/m²) et du rendement d'HE (%) des 32 échantillons collectés de *T. satureioides* Coss dans la vallée de l'Agoundis.

La biomasse estimée en matière verte varie de 20 g/m² à 518,4 g/m² (Tableau 4). Dans les stations Taghbart, Wijdane et Tnada N'Izm, nous avons enregistré les biomasses moyennes les plus élevées, tandis que dans les régions Makhzen à Ounain et Majjou, nous avons enregistré les rendements les plus faibles en biomasse (Tableau 5).

En effet, un grand nombre de facteurs semblent influencer la production en biomasse:

- ✓ L'exposition: Etant donné que le versant Nord est plus arrosé que celui du Sud, la densité des peuplements est plus importante sur les versants Nord de la vallée ;
- ✓ La fertilité du sol;
- ✓ La pression anthropique et la proximité des peuplements de thymus aux populations locales ;
- ✓ Le caractère accidenté de certains sites rend leur accès très difficile.

Cependant Il n'existe pas de relation entre l'altitude et la production en biomasse (figure36A). Les résultats présentés montrent une variabilité en matière de production qui est faiblement corrélée avec l'altitude (coefficient de corrélation faible $R^2 = 0.0044$).

Tableau 5: La moyenne du rendement d'huile essentielle et la biomasse par région dans la vallée de l'Agoundis.

Locations	HE (%)	Biomasse (g/m ²)
Taghbart	1.00 ± 0.15	354.0 ± 133.50
Makhzen	1.03 ± 0.01	121.75 ± 60.65
Makhzen to Ounanin	0.70 ± 0.12	83.26 ± 15.55
Wijdane	0.92 ± 0.19	179.30 ± 113.80
Majjou	1.13 ± 0.29	70.63 ± 26.30
Tanda n'Izm	1.25 ± 0.28	157.50 ± 34.82

* Moyenne ± erreur standard de la moyenne (stderr).

En ce qui concerne la productivité estimée en huile essentielle, les rendements varient de 0,20 à 2,29% (tableau 4). Le plus haut rendement en huile essentielle: 2,29% a été observé dans la région de Tnada N'Izm (altitude 1964 m). Cette valeur est similaire à celle rapportée par (Jamali et *al.* 2012; El Bouzidi et *al.* 2013). La plus faible teneur en HE 0.20% a été notée dans la station 3 (tableau 4). Les rendements les plus bas se trouvent généralement dans la station 3. Tandis que des valeurs élevées ($\geq 1\%$) ont été enregistrées à différents endroits (échantillons 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 14 et 15). Dans la région Makhzen, presque tous les échantillons ont montré des rendements similaires, allant de 1,02% à 1,04%. En général, le rendement en huile essentielle dans la vallée pourrait être estimé à 1 %, excepté certaines régions (Makhzen à Ounain, tableau 5), où les plantes sont très âgées en raison des conditions difficiles pour la régénération et de la sécheresse.

D'après la figure 36B, il y'a une légère relation entre l'altitude et le rendement en HE. Mais, selon les résultats observés à différents endroits, d'autres facteurs pourraient expliquer la variabilité concernant la production d'HE, parmi lesquels les variations génétiques ou l'effet d'environnement (fertilité du sol, exposition, etc) qui ont un rôle important . Ce résultat est en contraste avec celui rapporté par Vokou et *al.* 1993 qui ont démontré l'augmentation du rendement en HE avec l'altitude. Dans notre cas, la vallée est déjà située en haute altitude.

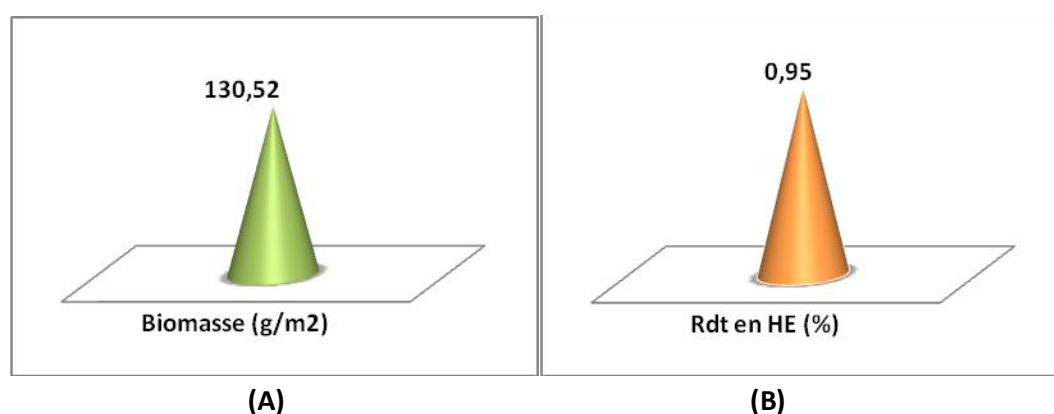
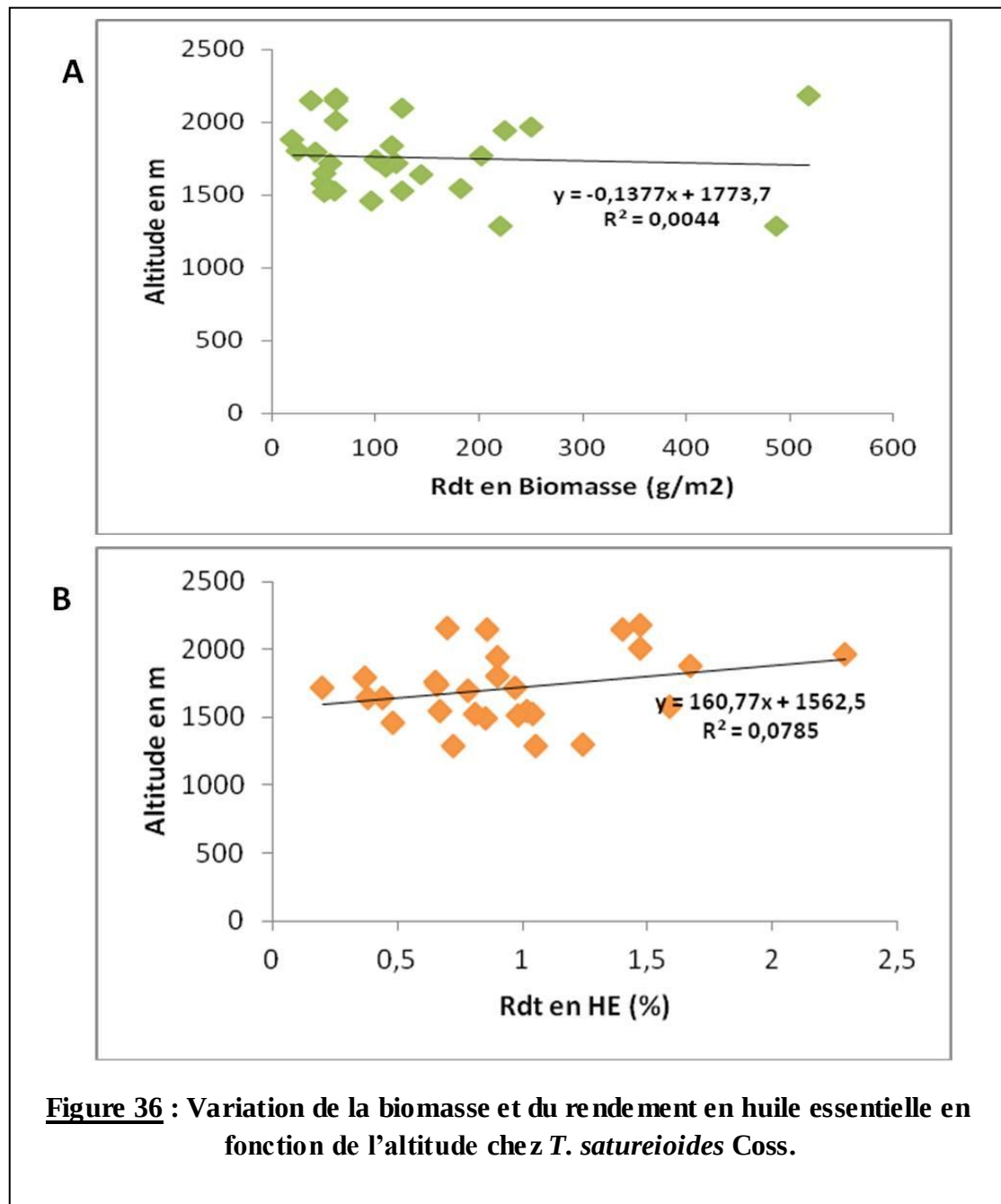


Figure 35 : Estimation Moyenne de la biomasse et du rendement en HE de 32 échantillons de *T. satureioides* Coss. de la vallée de l'Agoundis.



Durant nos visites dans la vallée, nous avons constaté que la plupart des sites que nous avons visités montrent des touffes de thym très âgées et de plus en plus essouffées par les récoltes successives et sans répit. On peut affirmer que la régénération est presque nulle et que la

majeur partie de l'exploitation du thym se fait sur de vieilles souches, très ligneuse ayant un rapport feuille/tige relativement bas.

Afin d'améliorer cette situation, quelques recommandations ont été élaborées pour la population locale organisée au sein de Coopérative de l'Agoundis pour le Développement Forestier et Agricole. (CADEFA). Ces recommandations englobent à la fois les bonnes pratiques pour une collecte durable de *T. satureioides* en particulier et des plantes aromatiques et médicinales en général. L'accent est mis sur les actions suivantes :

- Éviter la coupe du thym de la même parcelle chaque année. Cela sous-entend l'application d'une rotation bisannuelle, La parcelle en repos doit être respectée. C'est très important pour donner plus de chance à la régénération des plantes à partir de la semence ou de permettre d'augmenter le nombre de ramifications des vieilles plantes.
- Dans l'aire exploitée, les collecteurs doivent laisser quelques plantes pour la formation des graines. Ceci permet de constituer le stock en graines dans le sol. Aussi, Il est très recommandé d'éviter la coupe des jeunes plantules issues des semences caractérisées par des racines superficielles et des ramifications faibles.
- Dans la zone en repos, il est aussi recommandé d'installer des ruches des abeilles afin d'améliorer la pollinisation et de ce fait, la production des graines. Un avantage indirect peut être tiré de la production du miel du thym qui est très demandé sur le marché local et génère des revenus élevés pour la population locale.
- Enfin, il est souhaitable de mener des actions de replantation du thym dans les zones dégradées, par le semis des graines collectées à partir de plants sélectionnés dans des pépinières pendant les premières semaines d'automne.

I-2-Etude de la Composition chimique des HE de *T. satureioides* Coss.

Nous avons identifié 26 constituants représentant plus de 95% de la composition globale des HE. Dans les 29 échantillons analysés d'HE (Excepté les échantillons 30,31 et 32, en raison de manque des données d'analyse chimique), le composé majoritaire est le bornéol avec des valeurs comprises entre 22.67 et 37.47% (tableau 6), ce qui est en accord avec la plupart des auteurs (Tantaoui-Elaraki et *al.* 1993; Benjilali et *al.* 1987a, b ; Jaafari et *al.* 2007). D'autres constituants quantitativement importants accompagnent le bornéol dont le camphène (4.34-

21.01%), le carvacrol (1.76-21.21%), α -pinène (2.04-12.15%), α -terpinéol (3.13- 10.56%), 3-Carène (1.45-10.51%) et le p-cymène (2.25- 8%). Les proportions des composés : moyenne, minimale et maximale des huiles essentielles sont résumées dans le (tableau 6).

Tableau 6 : Répartition en % des composés identifiés dans les huiles essentielles de 29 échantillons de *Thymus satureioides* Coss. de la vallée de l'Agoundis.

Constituants ^{a)}	Moy ^{b)}	SD ^{c)}	Min ^{d)}	Max ^{e)}
α -Thujene	1.18	0.18	0.93	1.54
α -Pinene	7.58	2.47	2.04	12.15
Camphene	13.44	4.25	4.34	21.01
Sabine ne	1.94	0.52	1.14	3.06
β -Pinene	2.46	0.14	2.34	2.61
Myrcene	1.29	0.00	1.29	1.29
Geraniol formate	1.19	0.21	0.83	1.62
α - Terpine ne	1.37	0.19	1.18	1.63
p-Cymene	5.69	1.58	2.25	8.00
Limonene	1.55	0.51	1.03	3.59
3-Care ne	4.31	2.26	1.45	10.51
Linalool	5.78	1.28	3.89	7.91
Camphre	2.85	1.02	2.12	4.33
Borne ol	29.61	4.10	22.67	37.47
Terpine n-4-ol	2.72	0.41	1.88	3.44
α -terpineol	7.00	2.18	3.13	10.56
trans- Dihydrocarvone	1.21	0.00	1.21	1.21
cis- Dihydrocarvone	4.30	0.00	4.30	4.30
Thymol methyl ether	2.41	1.23	1.05	4.81
Isobornyl formate	4.05	0.81	3.47	4.62
acetate de bornyl	3.15	1.44	1.23	7.09
Thymol	2.84	1.37	1.14	5.31
Carvacrol	9.83	5.16	1.76	21.21
trans-Caryophyllène	3.90	1.24	2.03	7.02
oxide de caryophyllene	1.44	0.00	1.44	1.44
α -farnesene	2.22	0.00	2.22	2.22

a) Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur élution sur colonne VB-5 ; b) Moyenne: Valeur moyenne. c) SD: écart-type ; d) Min: contenu le plus bas. e) Max: le contenu le plus élevé.

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage, toutes les données ont été recueillies et analysées statistiquement en utilisant le logiciel XLSTAT, afin de déterminer la relation entre les différents échantillons de *T. satureioides* à l'aide de la composition en pourcentage de leurs huiles essentielles. La distance euclidienne a été choisie comme une

mesure de similarité entre les individus et le regroupement a été réalisé par la méthode des paires-groupes non pondérés avec la moyenne arithmétique (UPGMA=Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average). L'analyse par groupe hiérarchique ou dendrogramme résume graphiquement les similitudes et les relations des individus entre eux. Ces analyses auront pour objectif de déterminer des groupes et éventuellement de reconnaître des chémotypes.

Le dendrogramme (Figure 37) montre que les distances sont supérieures à 40, faisant ainsi apparaître 3 classes : bornéol / carvacrol (B / Ca), bornéol / camphène / carvacrol (B / C / Ca) et bornéol / camphène / α -pinène (B / C / P). Le bornéol est le composé majoritaire commun dans les trois classes. La première classe B / Ca regroupant les échantillons : 1, 5, 10, 12, 15 et 17 est caractérisée en plus du bornéol par le carvacrol (Moyenne 16%, Min 10.43 et Max-21.21%). D'autre part, le camphène et α -pinène ont présenté des proportions moins importantes que le carvacrol avec une moyenne de 8.78% pour le camphène et 5.09% pour le α -pinène (Figure 37 et 38).

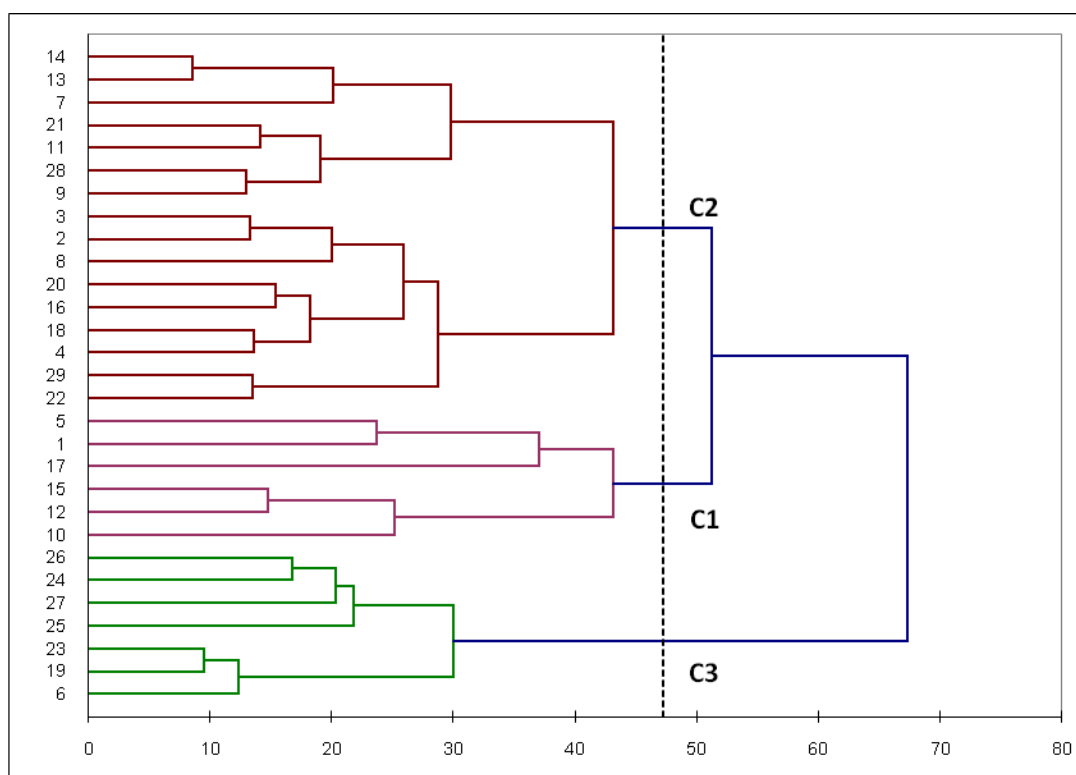


Figure 37 : Dendrogramme de la composition des 29 huiles essentielles de *T. satureioides*.

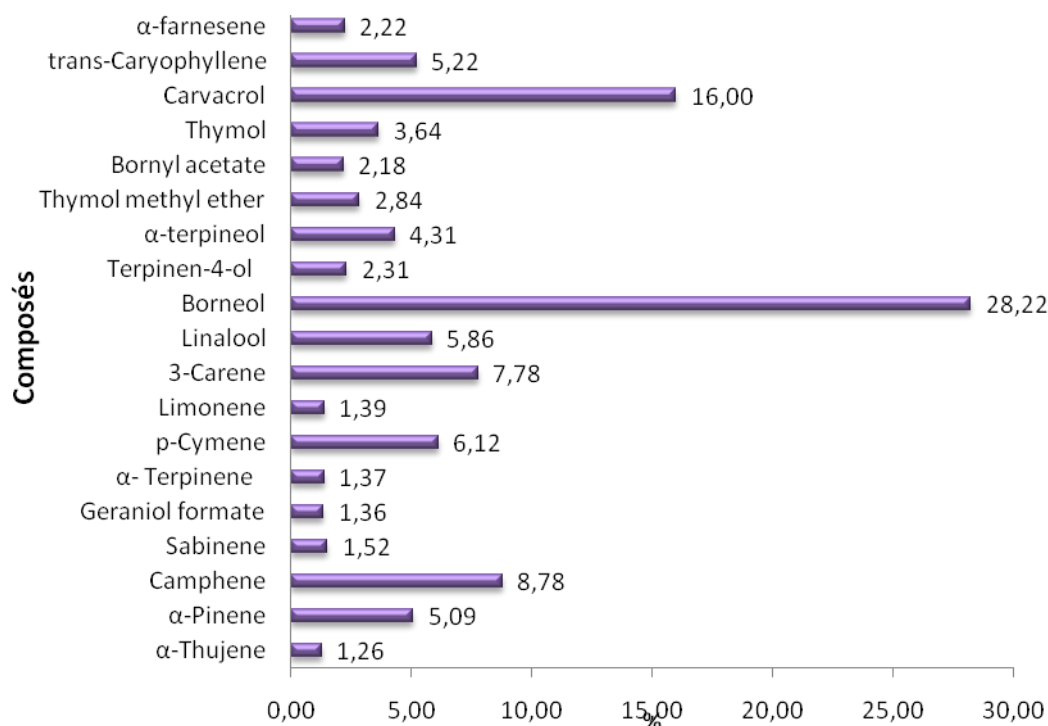


Figure 38: La moyenne de la composition de la classe 1 (bornéol/ carvacrol).

La seconde classe B / C / Ca qui rassemble les échantillons: 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 28 et 29, présente le camphène et le carvacrol comme composés principaux après le bornéol, avec des pourcentages qui varient de 9,39 à 16,21% pour le camphène et de 7,36 à 15,2 pour le carvacrol. Dans cette classe le α -pinène a présenté des faibles proportions (une moyenne de 7,15%) (Figure 39 et 37). La dernière classe B / C / P qui regroupe les échantillons : 6, 19, 23, 24, 25, 26 et 27, a été marquée par 2 composés qui accompagnent le bornéol : le camphène (10,28 à 21,01 %) et le α -pinène (5,35 à 12%) (Figure 40 et 37).

En conclusion le bornéol est le constituant prépondérant de tous les échantillons. Ce qui indique certaine homogénéité chimique dans la vallée Agoundis. Les trois classes ont montré des variations, principalement dans les teneurs en carvacrol, camphène et α -pinène.

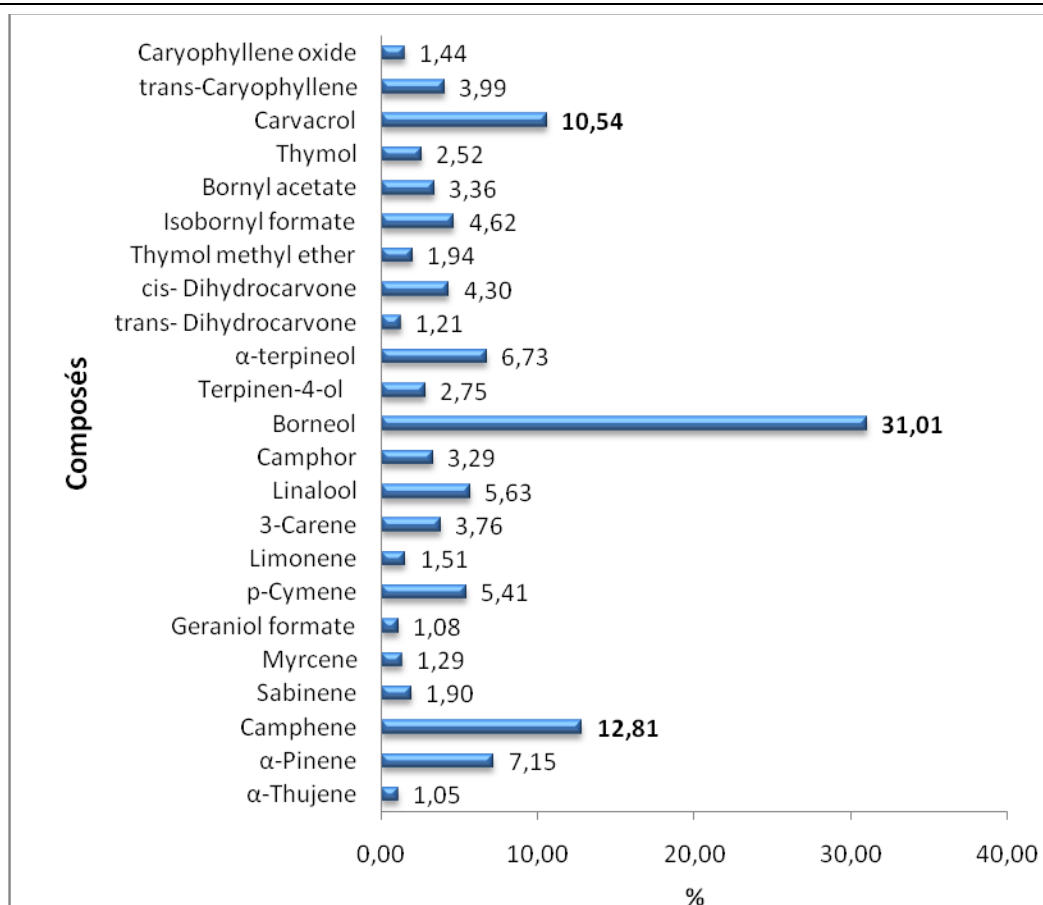


Figure 39 : La moyenne de la composition de la classe 2 (bornéol/camphène/ carvacrol).

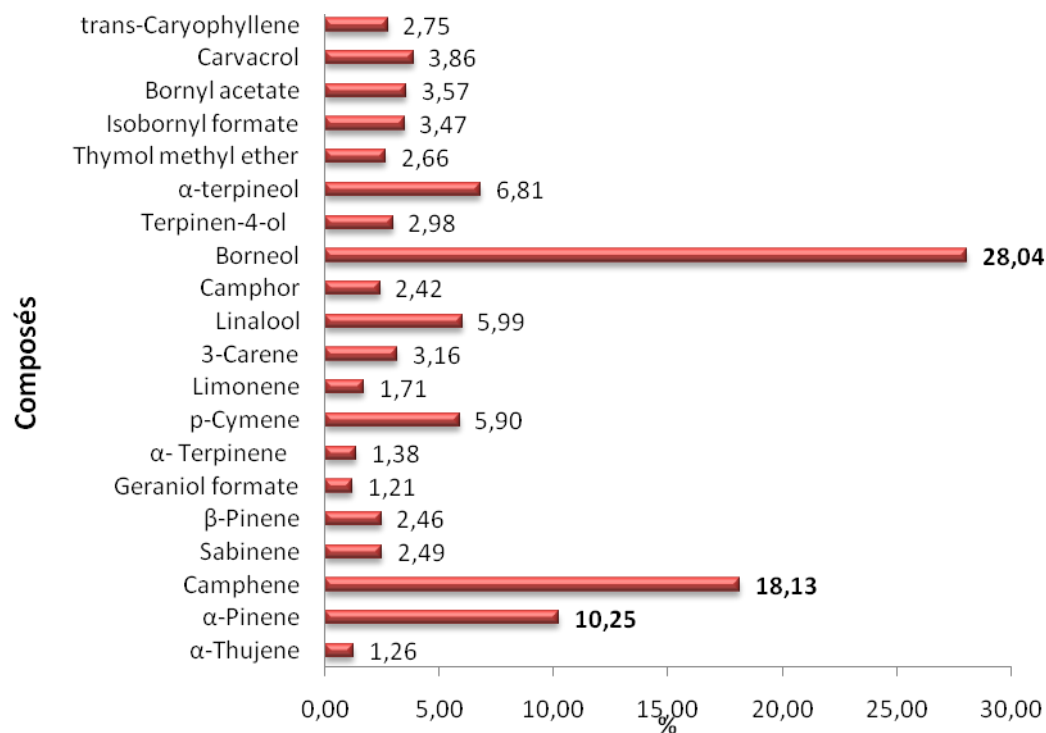


Figure 40: La moyenne de la composition de la classe 3 (bornéol /camphène/ α -pinène).

Suite aux analyses quantitatives, nous avons choisi de représenter dans la Figure 41, la moyenne des 4 constituants prédominants dans la plupart des huiles essentielles.

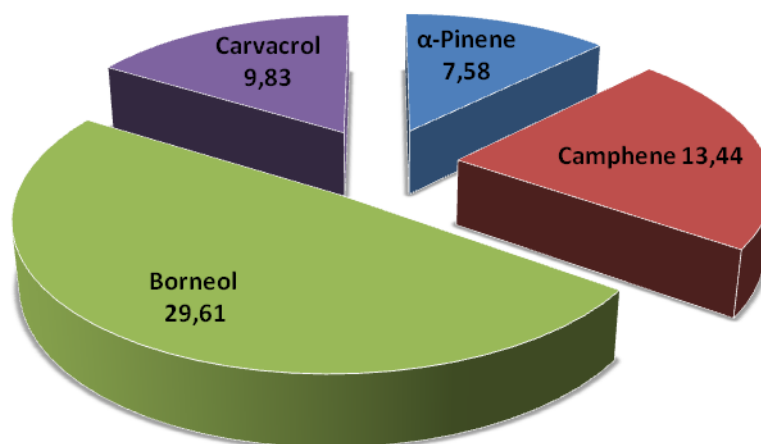


Figure 41: Répartition des composés majoritaires dans l'HE de 29 échantillons de *T. satureioides* Coss de l'Agoundis.

La présence dominante du bornéol dans tous les échantillons d'huiles essentielles confère au *Thymus satureioides* de l'Agoundis une caractéristique spécifique particulière devant être valorisée par sa propre appellation: chémotype à bornéol ou le thym à bornéol.

Des études sur des huiles essentielles contenant des constituants tel que bornéol, carvacrol, camphre, α -pinène, ont montré des activités antimicrobiennes (Su et al. 2012 ; Wu et al. 2011 ; Bakkali et al. 2008; Simic et al. 2002 ; Tabanca et al. 2001). Le α -pinène et bornéol sont capables de destruction cellulaire (Vardar-Unlu et al. 2003). En outre le Bornéol inhibe la respiration et les processus de transport d'ions. Il augmente également la perméabilité de la membrane des cellules de levure et des mitochondries isolées (Su et al. 2012 ; Andrews et al. 1980; Uribe et al. 1985). Le bornéol a montré des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antibactériennes et antiradicalaires (Horváthová et al. 2009; Juhas et al. 2008 ; Slaménová et al. 2009; Kordali et al. 2005 ; Candan et al. 2003; Tabanca et al. 2001), ce qui peut attribuer un effet antimicrobien à l'huile essentielle de *T. satureioides* dont le

bornéol est le composé majoritaire et peut justifier au moins en partie l'usage traditionnel de cette plante contre les infections gastro-intestinales, les infections de la gorge et de la bouche, les grippes..

II- Etude de la variabilité de la composition chimique d'*Origanum compactum* Benth.:

À notre connaissance, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de variabilité chimique de l'HE de d'*Origanum compactum* Benth. Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal consiste à étudier le polymorphisme chimique de l'HE de d'*Origanum compactum* Benth. du Maroc. Pour cela nous avons analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), neuf échantillons d'huiles essentielles d'*Origanum compactum* obtenus par hydrodistillation avec un appareillage de type Clévenger à partir de matériel végétal récolté sur 9 sites au Maroc (Ben Karich, Souk tift, Merchouch, Owazane, Taounat; Khenifra, Zraïb, Ben Ider et Mssabih). Ce qui a permis de mettre en évidence 26 composés sur l'ensemble des échantillons et une variation dans la composition chimique des huiles essentielles (Tableau 7). Les constituants majeurs sont : le carvacrol (67.81 à 3.39%), thymol (58.29 à 0.21%), γ -terpinène (21.88 à 10.44%) et p-cymène (27.75 à 0.42%).

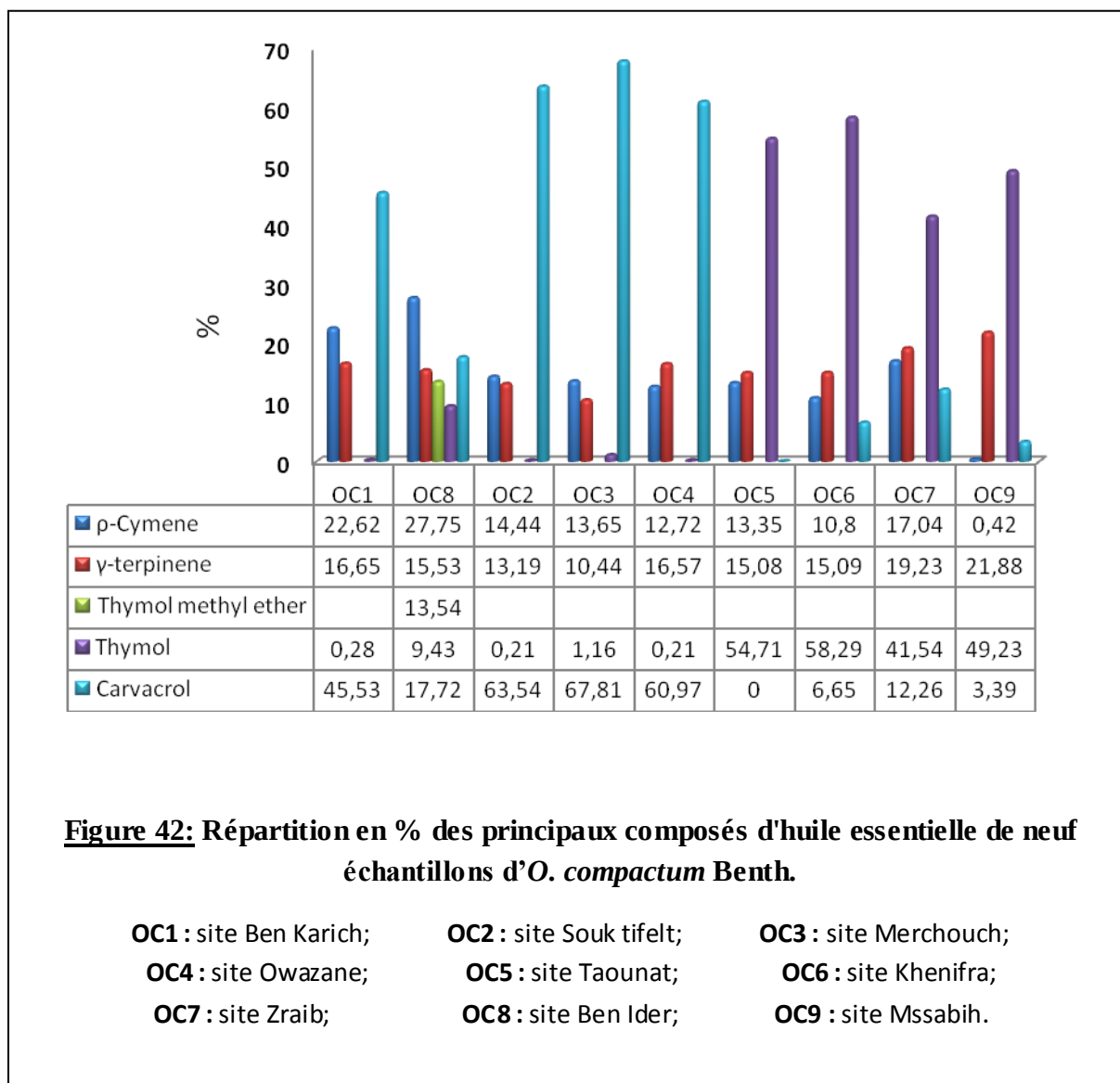
Tableau 7 : La composition moyenne des constituants identifiés en % dans les HE de 9 échantillons d'*Origanum compactum* Benth.

Constituants	Moy ^{b)}	SD ^{c)}	Min ^{d)}	Max ^{e)}
α -Thujene	0.97	0.20	0.73	1.36
α -Pinene	0.32	0.06	0.24	0.42
1-Octen-3-ol	0.26	0.12	0.16	0.51
3-Octanone	0.25	0.12	0.12	0.46
sabinene	0.54	0.34	0.11	0.84
β -Pinene	0.95	0	0.95	0.95
trans-Ocimene	0.97	0.14	0.85	1.16
α -Terpinene	1.98	0.45	1.53	2.92
p-Cymene	14.75	7.62	0.42	27.75
3- Carene	0.32	0.06	0.25	0.41
cis- Ocimene	0.37	0	0.37	0.37
γ-terpinene	15.96	3.29	10.44	21.88
trans-Sabinene hydrate	0.42	0.06	0.34	0.5
1-Terpineol	0.28	0.24	0.14	0.56
Linalyl acetate	0.55	0.13	0.29	0.78
Borneol	0.23	0.07	0.16	0.33
Terpinene-4-ol	0.24	0.02	0.22	0.27
α -Terpinenyl acetate	1.82	2.81	0.17	6.79
Cuminal	2.82	0	2.82	2.82
Thymol methyl ether	13.54	0	13.54	13.54
2-Caren-10-ol	3.88	0	3.88	3.88
Thymol	23.90	26.20	0.21	58.29
Carvacrol	34.73	27.50	3.39	67.81
β -Caryophyllene	1.79	0.62	0.82	2.57
Caryophyllene oxide	0.29	0.08	0.18	0.4
Cubenol	0.29	0	0.29	0.29

a) Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur élution sur colonne VB-5 ; b) Moyenne: Valeur moyenne. c) SD: écart-type ; d) Min: contenu le plus bas. e) Max: le contenu le plus élevé.

La grande majorité des échantillons présente une composition chimique résultant de l'association du carvacrol et/ou thymol, du γ -terpinène et p-cymène (Figure 42), en plus le carvacrol ou thymol sont les principaux constituants dans la majorité des échantillons (Figure 42 et 43). A l'exception de l'échantillon du site Ben Ider (OC8) qui est vraiment remarquable par la présence du p-cymène comme composé majoritaire (27.75%), le thymol-méthyle-éther (13.54%), le γ -terpinène (15.53%), alors que le carvacrol et le thymol, ne représentent que 17.72 et 9.43% respectivement. On note dans l'échantillon du site Zraib

(OC7) la coprésence du thymol (41.54%) et du carvacrol (12.26%), le α -terpinène et p-cymène sont présents à 19.23 et 17.04% respectivement. Dans la composition de l'échantillon provenant du site Mssabih (OC9), le p-cymène ne représente que 0.42% tandis que sa valeur varie de 27.75 à 10.8% dans les autres échantillons, alors que le α -terpinène (21.88%) présente la valeur la plus forte par rapport aux 8 autres échantillons (10.44-19.23%), le thymol (49.23%) est le constituant prédominant (Figure 42).



Suite aux analyses quantitatives, nous avons choisi d'illustrer la moyenne des 4 constituants majoritaires dans la plupart des huiles essentielles d'*O. compactum* Benth. (carvacrol, le thymol, α -terpinène et p-cymène) Figure 43.

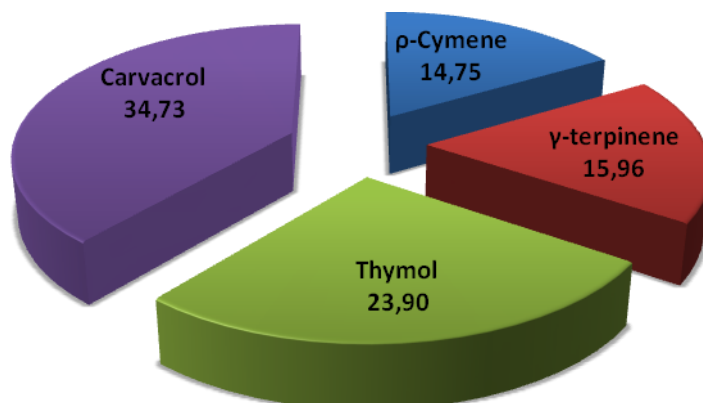


Figure 43: Représentation de la moyenne des principaux composés dans HE d' *O. compactum*.

L'analyse statistique des données a été réalisée par le logiciel SPSS version 19. Une Classification Ascendante Hiérarchique (C.A.H) a été entreprise sur les 9 échantillons étudiés afin de déterminer la relation entre les différents échantillons. Ces analyses ont pour objectif la détermination des groupes et éventuellement de reconnaître des chémotypes. Ce qui a permis d'avoir le dendrogramme (Figure 44).

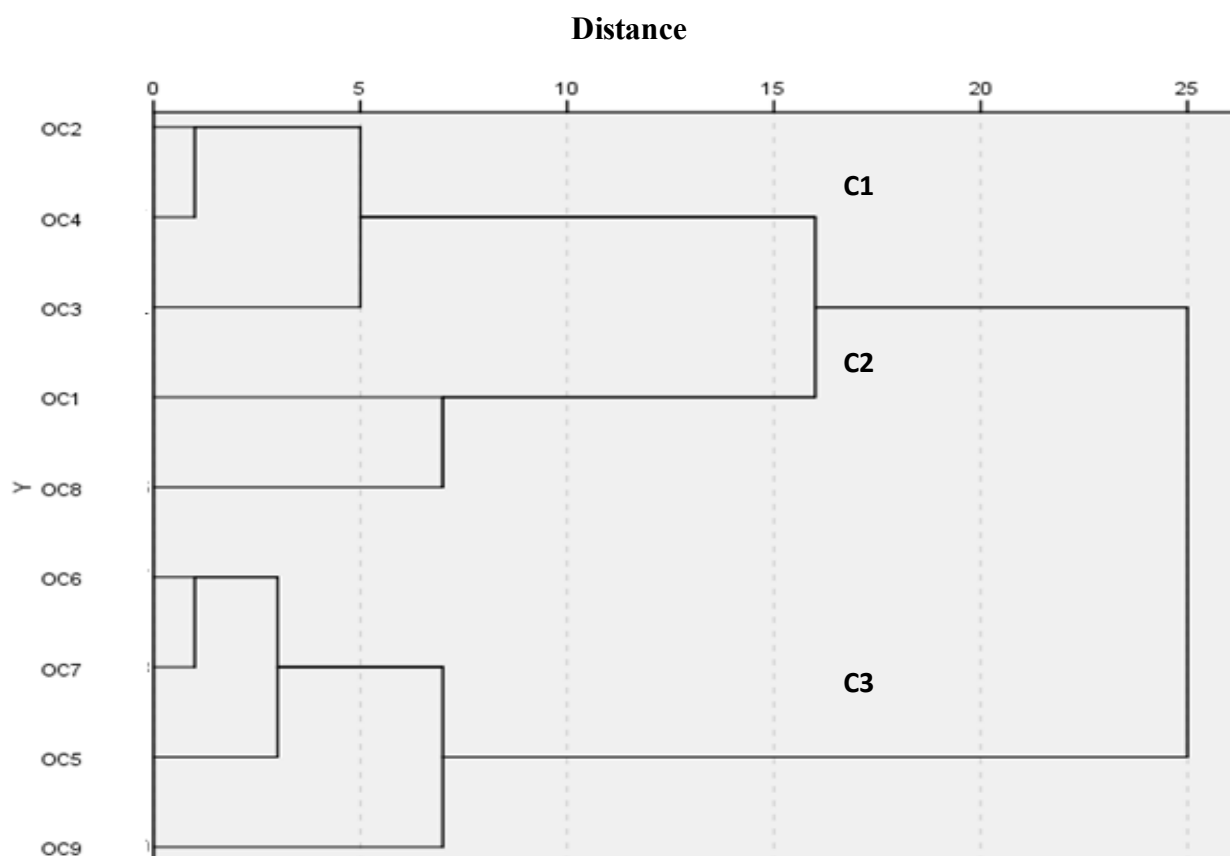


Figure 44: Dendrogramme de la composition des 9 huiles essentielles d'*Origanum compactum* Benth.

Les distances observées sur le dendrogramme (supérieures à 15) montrent la présence de 3 classes : la première regroupe les échantillons OC2, OC4 et OC3, la deuxième rassemble OC1 et OC8 et dans la 3^{ème} classe on a les échantillons OC6, OC7, OC5 et OC9 (Figure 44).

Dans l'huile essentielle de la classe 1 (C1), le carvacrol est majoritaire (Moy 64.11 %, Min 61 et Max 67.8%), accompagné de deux autres composés, le *para*-cymène (Moy 13.60 %), et le α -terpinène (Moy 13.4 %) (Figure 45). Dans la deuxième classe (C2) on note la codominance du carvacrol (31.63%) et *p*-cymène (25.19%), le α -terpinène a une teneur (16.09%). Tandis que la classe 3 est caractérisée par la présence du thymol comme composé principal (Moy 50.94 %, Min 41.5 et Max 58.3%), le α -terpinène et *para*-cymène représentent respectivement 17.82 et 10.40 %. Les huiles essentielles d'*O. compactum* présentent une hétérogénéité.

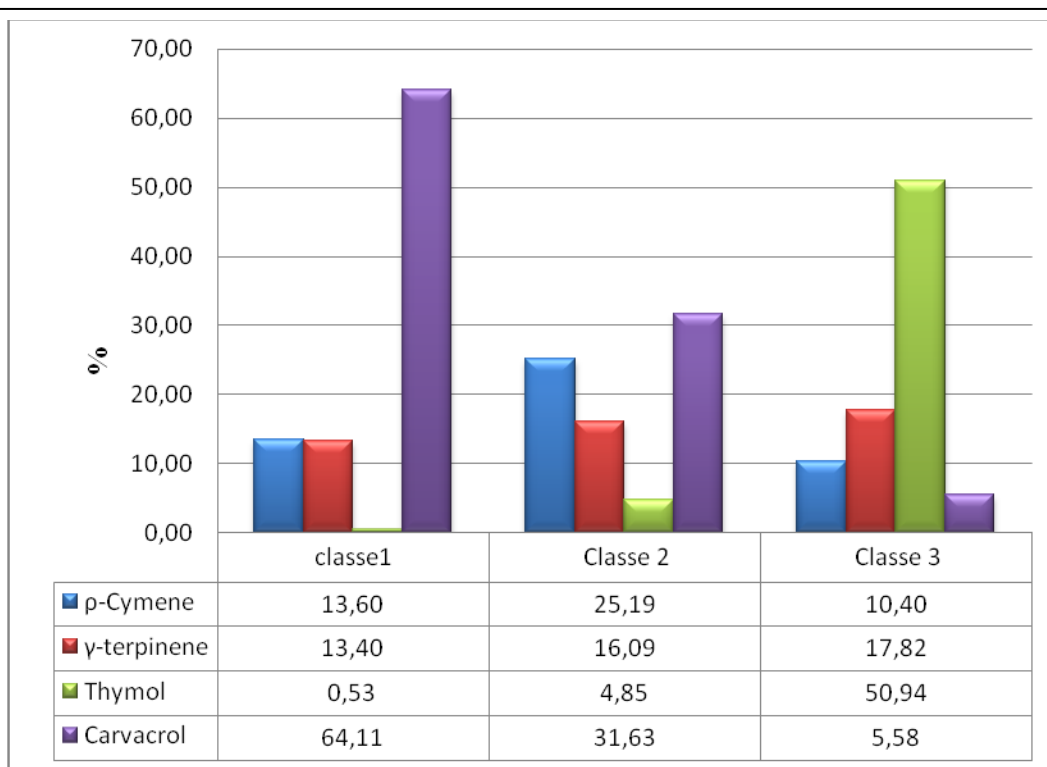


Figure 45: Répartition en % des principaux composés des 3 chémotypes d'*Origanum compactum*.

Classe 1 (C1) regroupe OC2, OC4 et OC3

Classe 2 (C2) regroupe OC1 et OC8

Classe 3 (C3) regroupe OC5, OC6, OC7 et OC9

Nos résultats fragmentaires obtenus à ce jour sur *O. compactum* permettent de supposer qu'il existe pour cette espèce, 3 chémotypes : l'un à carvacrol, l'autre à thymol et le 3^{ème} à carvacrol/p-cymène.

L'analyse des données bibliographiques montre que la composition de l'huile essentielle de certains des échantillons étudiés est voisine de celles proposées par différents auteurs, en résumé :

Benjlali et *al.* 1986 ont noté dans les échantillons de HE d'*O. compactum* des teneurs en carvacrol qui varient de 36.6 à 76.6%, de p-cymène (traces à 19.6%) et de γ-terpinène

(traces-16.65%). Nhu-Trang et al. 2006 ont quantifié des taux de carvacrol importants (59.48-60 %), de p-cymène (9.27 – 11.75%), et de α -terpinène (8.11- 0.96). Bouchra et al. 2003, ont montré des taux de composés (carvacrol 58,1%, *para*-cymène 11,4%, et α -terpinène 7,1%). L'échantillon d'*O. compactum* analysé par Charai et al. 1996, 1999, contient 49,5 % de carvacrol. On remarque que la teneur de p-cymène et de α -terpinène dans nos échantillons est supérieure à celle décrite par Benjilali et al. 1986 et Bouchra et al. 2003. Tandis que les teneurs en carvacrol sont similaires à celles observées par Benjilali et al. 1986 et Nhu-Trang et al. 2006 ; Bouchra et al. 2003 et Charai et al. 1996, 1999.

La classe d'*O. compactum* à prédominance carvacrol a été confirmée par de nombreux travaux Benjilali et al. 1986 ; Charai et al. 1996, 1999 ; Bouchra et al. 2003 et Nhu-Trang et al. 2006.

Pour l'huile essentielle de la Classe 3, le thymol est majoritaire (50.94 %), avec 3 autres composés, le *para*-cymène (10.40 %), le α -terpinène (17.82 %) et le carvacrol (5.58 %). Une seule donnée bibliographique est disponible à ce jour (INRA 2011) dans laquelle est mentionnée la dominance du thymol chez l'*O. compactum*. alors que Bakkali et al. 2005 ; Mezzoug et al. 2007 ont noté respectivement la coexistence du carvacrol (30.53-22%) et du thymol (27.5-19.36).

Les échantillons de la classe 2 présentent une composition plus originale avec du *para*-cymène et carvacrol comme composés majoritaires.

Les résultats de nos travaux sembleraient montrer qu'il existe 3 chémotypes l'un à carvacrol, l'autre à thymol et le 3^{ème} à carvacrol/p-cymène. Cette variabilité de composition reflète la variabilité génétique, ce qui pourrait laisser supposer l'existence d'autres chémotypes si on élargit la gamme d'échantillonnage.

Les données de la variabilité de composition chimique des huiles essentielles d'*Origanum compactum* Benth et leur teneur élevée surtout en carvacrol, thymol: composés qui présentent une activité antimicrobienne (Souza et al. 2013 ; Trombetta et al. 2005 ; Ultee et al. 2002 ; Ultee et al. 1999; Lambert et al. 2001), justifieraient leur usage traditionnel contre les affections gastro-intestinales, la dysenterie, les gripes, les affections O.R.L. et les bronchites ainsi que dans la conservation des aliments.

Il résulte de cette étude que la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* présente une assez grande variabilité. Cette variabilité devrait être prise en compte pour la mise en culture de cette plante à travers notamment une sélection préalable.

III- Etude de la variabilité chimique des HE de 4 espèces du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne:

Nous avons été motivés pour la conduite de cette étude par le fait que peu d'études ont concerné *Nepeta atlantica* (endémique du Maroc), *Nepeta tuberosa*, *Nepeta granatensis* et *Nepeta cataria* d'origine Marocaine. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de ces quatre espèces du genre *Nepeta*.

III-1- Etude de la Composition chimique des HE de quatre espèces du genre *Nepeta*:

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau. Les rendements obtenus en HE sont les suivants 0,96% pour *N. granatensis* ; 1,04% pour *N. atlantica* ; 1,02% pour *N. cataria* et 1,2% pour *N. tuberosa*. Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). La composition de ces HE est consignée dans le tableau 8.

Pour chacune des quatre huiles essentielles étudiées, 26 composés ont été identifiés (tableau8). L'examen des résultats de la composition d'HE de chacune des plantes *N. atlantica*, *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis* montre que chaque espèce se distingue par sa composition de point de vue qualitative et quantitative.

Tableau 8: Composition chimique en (%) des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta*.

Composés *	<i>N. atlantica</i>	<i>N. tuberosa</i>	<i>N. cataria</i>	<i>N. granatensis</i>
α - pinène	1.1	1.3	0.4	6.3
β - pinène	1.1	0.9	0.9	2.3
camphène	1.1	0.3	0.9	1.1
eucalyptol	1.1	1.2	0.5	24.0
α - phellandrène	1.1	0.6	0.2	5.8
Terpinène	1.1	0.9	4.2	0.5
sabinène	0.2	0.6	0.2	0.5
ρ -Cymène	0.3	0.9	0.2	3.8
limonène	0.2	0.5	4.1	0.3
menthone	0.2	0.4	0.2	0.7
thujone	0.1	0.4	0.4	0.6
Bornéol	0.1	0.6	0.3	0.6
Linalyle acétate	0.5	0.4	0.2	1.4
menthol	0.6	1.6	0.2	0.4
linalol	0.6	0.5	0.4	1.4
pulégone	0.4	0.9	0.2	1.6
thymol	0.8	0.6	1.3	0.9
α -terpinéol	0.6	0.5	0.3	0.5
citronellol	0.8	0.6	0.2	0.6
4 a α , 7 α , 7a β - nepetalactone	71.4	76.8	77.4	39.4
dihydronepetalactone	3.1	5.9	5.0	2.8
méthyleugénol	0.9	0.8	0.1	0.9
méthylisoeugénol	0.5	0.6	0.4	0.6
β -caryophyllène	8.2	0.7	0.2	1.5
α – curcumène	1.3	0.7	0.6	0.9
farnésol	2.5	0.8	0.9	0.5

* Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur élution d'une colonne VB-5.

- L'huile essentielle de *N. atlantica* se compose principalement du nepetalactone (le stéréo-isomères 4a- α , 7-a, 7a β - nepetalactone et le dihydronepetalactone) (74.5%), accompagné de β -caryophyllène (8.2%) et de farnésol (2.5%). Elle renferme aussi de nombreux composés terpéniques en petite quantité tels que thymol (0.8%), eucalyptol (1.1%), α – pinène (1.1%), α - phellandrène (1.1%), camphène (1.1%), Limonène (0.2%), bornéol (0.1%), pulégone (0.4%),
- L'huile essentielle de *N. tuberosa* contient 82,7% de nepetalactone (le stéréo-isomères 4a- α , 7-a, 7a β - nepetalactone et le dihydronepetalactone) et une faible quantité de

menthol (1.6%), α -pinène (1.3%), eucalyptol (1.2), thymol (0.6%), de β -caryophyllène (0.7%) et de farnésol (0.8%).

- L'huile essentielle de *N. cataria* contient 82,4% de nepetalactone. Il est accompagné de terpinène (4.2%) et de limonène (4.1%). Les autres composés terpéniques ont un taux faible α -pinène (0.4%), camphène (0.9%), Bornéol (0.3), eucalyptol (0.5), caryophyllène (0.7%) et de farnésol (0.8%).
- L'huile essentielle de *N. granatensis*, contrairement aux autres HE, présente seulement 42.2% de nepetalactone. Il faut signaler la présence significative d'eucalyptol, 24% ce qui est une particularité de cette HE, suivi du α -pinène (6.3%), du α -phellandrène (5.8%), *p*-cymène (3.8%), du β - pinène (2.3%), pulégone (1.6%), β -caryophyllène (1.5%) et Linalyle acétate (1.4%). Les autres constituants bornéol, thymol, limonène etc sont présents en faible quantité (0.3% et 1.1%).

Pour chacune des quatre huiles essentielles, le nepetalactone (le stéréo-isomères 4a-a, 7-a, 7ab- nepetalactone et le dihydronepetalactone) est majoritaire. Il représente environ 74% pour *N. atlantica*, 82% pour les deux espèces de *N. tuberosa* et *N. cataria* mais seulement 42% pour *N. granatensis*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour d'autres espèces de *Nepeta* (Zomorodian et al. 2012; Adiguzel et al. 2009, Wang et al. 2007, Ghannadi et al. 2003; Gkinis et al. 2003).

On note aussi que *N. atlantica* est caractérisée par la présence relativement élevée du β -caryophyllène (8.2%) et du farnésol (2.5%), tandis que *N. granatensis* se distingue par la présence de l'eucalyptol (24%) accompagné de α -pinène (6,3%) et α -phellandrène (5,8%). En outre, *N. cataria* présente des teneurs appréciables en terpinène (4,2%) et en limonène (4,1%).

III-2- Analyse de l'activité antibactérienne des HE de quatre espèces du genre *Nepeta*:

L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne des HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis* vis-à-vis de six souches bactériennes qui sont à l'origine de plusieurs infections (génito-urinaire, intestinale, nosocomiale, de la peau etc.).

Afin de préciser le caractère bactériostatique des quatre huiles essentielles sélectionnées, des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été effectués sur des isolats cliniques (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*), et des souches ATCC (American Type Culture Collection) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Pour cela, nous avons adapté la technique de microdilution sur des microplaques à 96 puits fond U et le test MTT (3-(4, 5 diméthylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) comme indicateur de viabilité.

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel J.M.P. Version 5.1: SAS Institute. Inc, 2003. Les différences ont été considérées significatives à $P < 0,05$.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes huiles sur les six germes étudiés ont été alors déterminées et regroupées dans le tableau 9. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart type de quatre mesures.

Tableau 9: La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles des espèces *Nepeta* contre différentes bactéries testées.

Souches bactériennes	MIC $\pm$ écart-type			
	<i>N. tuberosa</i>	<i>N. atlantica</i>	<i>N. cataria</i>	<i>N. granatensis</i>
EC1: <i>E. coli</i> ATCC 25922	6.25 $\pm$ 1.25	13.13 $\pm$ 4.25	16.25 $\pm$ 3.75	35.00 $\pm$ 15.00
EC2: <i>E. coli</i>	30.0 $\pm$ 5.77	7.96 $\pm$ 4.07	16.60 $\pm$ 3.33	70.00 $\pm$ 10.00
PA1: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	40.0 $\pm$ 0.00	22.50 $\pm$ 6.29	37.50 $\pm$ 15.47	40.00 $\pm$ 0.00
SA1: <i>S. aureus</i> ATCC 25923	4.37 $\pm$ 0.62	7.50 $\pm$ 1.44	5.00 $\pm$ 0.00	22.50 $\pm$ 6.29
SA1: <i>S. aureus</i>	23.33 $\pm$ 8.81	18.43 $\pm$ 7.92	10.00 $\pm$ 3.53	68.00 $\pm$ 12.00
SE: <i>S. enteritidis</i>	20.00 $\pm$ 0.00	20.00 $\pm$ 0.00	53.33 $\pm$ 13.33	80.00 $\pm$ 0.00

* Les données représentent les CMI ($\mu\text{L/mL}$) $\pm$ écart-type (moyens de 4 répétitions).

Le screening de l'activité antibactérienne de quatre HE de *Nepeta* montre que l'huile essentielle de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et *N. cataria* présente une activité antibactérienne contre les 6 souches de bactéries testées (CMI varie de 4.37 à 53.33 μ L/mL) (tableau 9). Alors que l'huile essentielle de *N. granatensis* possède une activité antibactérienne relativement faible (CMI varie entre 22.5 à 80 μ L/mL). Par exemple, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HE de *N. tuberosa*, *N. atlantica*, et *N. cataria* contre *S. aureus* (ATCC 25923) sont respectivement 4.37 ; 7.50 et 5.00 μ l / ml, tandis que la CMI de HE de *N. granatensis* est de 22.50 μ L/mL (tableau 9).

Les souches *S. aureus* (ATCC 25923) et *E. coli* (ATCC 25922) sont plus sensibles aux huiles essentielles de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et *N. cataria* (CMI varient de 4.37 à 16.25 μ l / ml). Pour *E. coli* et *S. aureus* la CMI varie de 7.96 à 30 μ l / ml. On peut noter que *S. enteritidis* et *P. aeruginosa* (ATCC 27853) sont moins sensibles aux HE, avec CMI inférieure à 53,33 μ l/ml (tableau 9). Le plus intéressant, c'est que l'huile essentielle de *N. granatensis*, qui est pauvre en nepetalactone, montre une activité antibactérienne relativement faible contre les souches testées (CMI varie de 22.5 à 80 μ l / ml).

Nous avons remarqué aussi que *N. atlantica* plante endémique du Maroc présente une activité antibactérienne plus prononcée contre *E. coli* et *P. aeruginosa* ATCC 27853 comparativement aux autres HE de *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis* (tableau 9 et figure 46).

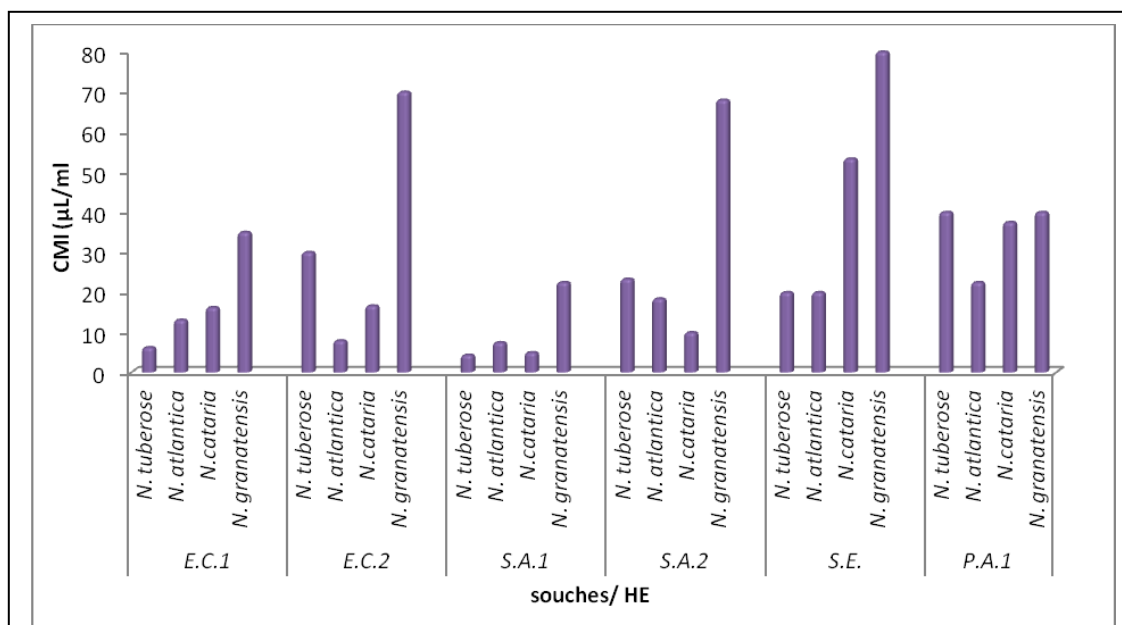


Figure 46: Comparaison du pouvoir antibactérien de quatre HE du genre *Nepeta*.

E.C.1: *Escherichia coli* ATCC 25922, E.C.2: *Escherichia coli*, S.A.1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

S.A.2: *Staphylococcus aureus*, P.A.1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, S.E.: *Salmonella enteritidis*.

L'analyse statistique a révélé une différence significative entre les HE ($p < 0.05$), et une différence hautement significative entre les souches testées et l'interaction HE*souche ($p < 0.0001$). Ce qui permet de conclure que la CMI observée est dépendante de la nature de l'huile essentielle testée, de la souche étudiée et de leur interaction (Tableau 10).

Tableau 10: récapitulatif de l'analyse statistique de la CMI.

Source	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
HE	3	3,644556	2,8914	0,0263
souche	5	38,753439	24,5956	<,0001
HE*souche	15	40,704291	6,4584	<,0001

- Concernant les huiles essentielles :

D'après le graphe obtenu de l'analyse de la variance selon la variable huile essentielle (Figure 47), nous pouvons répartir les HE en 2 groupes : Le premier regroupe les HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* et le deuxième est constitué uniquement de *N. granatensis*.

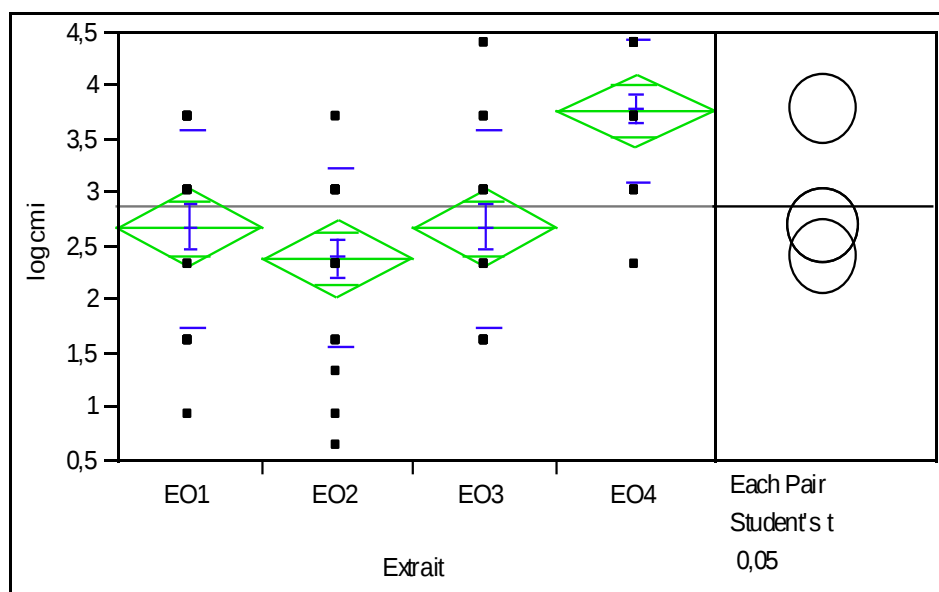


Figure 47: Analyse de la variance de logcmi par l'huile essentielle.

EO1: *Nepeta tuberosa*, EO2: *Nepeta atlantica*, EO3: *Nepeta cataria*, EO4: *Nepeta granatensis*,

Ceci est confirmé aussi par le test de Student (tableau 11). La comparaison des moyennes des CMI nous a permis aussi de classer les HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* dans le même groupe. Tandis que l'HE de *N. granatensis* constitue un deuxième groupe.

Tableau 11: Classification du pouvoir antibactérien des HE du genre *Nepeta* (Test de Student).

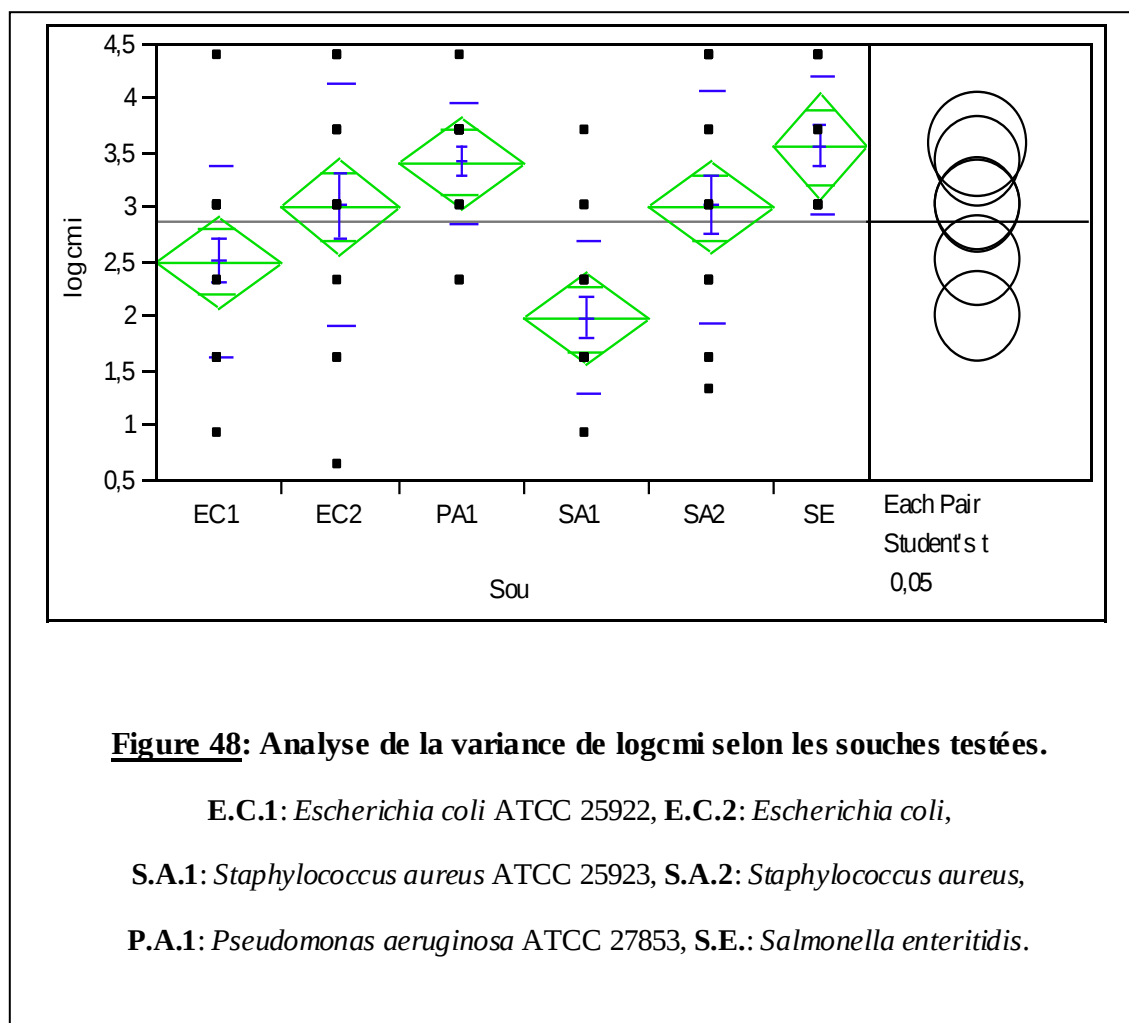
Huile essentielle	Groupe ment	Moyenne
<i>N. granatensis</i>	A	3,7755229
<i>N. tuberosa</i>	B	2,6806654
<i>N. cataria</i>	B	2,6806654
<i>N. atlantica</i>	B	2,3981166

Les huiles essentielles non suivies de la même lettre sont significativement différentes.

Le pouvoir antibactérien des HE est en relation avec la composition chimique et peut être lié au composé majoritaire qui est le nepetalactone, du fait que les trois HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* appartenant au même groupe ont un taux élevé en nepetalactone (supérieur à 74%), alors que *N. granatensis* à activité antibactérienne plus faible que les autres HE contient un taux relativement faible en nepetalactone (42%) et une teneur significative d'eucalyptol (24%).

- **Concernant les souches bactériennes :**

Comme constaté avec les huiles essentielles, les résultats de l'analyse de la variance selon les souches sont présentés dans la figure 48.



D'après ces résultats, on constate qu'il y'a quatre groupes de souches selon leur sensibilité aux huiles essentielles testées. Le premier contient *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (S.A.1) qui est le plus sensible à l'action des HE, suivi de *Escherichia coli* ATCC 25922 (E.C.1), le troisième groupe rassemble *Staphylococcus aureus* (S.A.2) et *Escherichia coli* (E.C.2). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (P.A.1) et *Salmonella enteritidis* (S.E.) sont moins sensibles à l'effet des HE, elles constituent un quatrième groupe.

Les résultats de test de Student représentés dans le tableau 12 montrent aussi quatre groupes différents des souches (les mêmes groupes que précédemment).

Tableau 12 : Classification de la sensibilité des souches aux HE du genre *Nepeta* (Test de Student).

Souches	Groupe ment	Moyenne
SE : <i>Salmonella enteritidis</i>	A	3,5733549
PA1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	A	3,4289493
EC2 : <i>Escherichia coli</i>	A B	3,0227633
SA2 : <i>Staphylococcus aureus</i>	A B	3,0210738
EC1 : <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	B C	2,5191936
SA1 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	C	1,9993332

Les souches non suivies de la même lettre sont significativement différentes.

Comme, constaté dans les résultats ci-dessus, l'activité antibactérienne des HE observée est dépendante de la nature de l'HE testée, de la souche étudiée. On note aussi que les souches *S. aureus* (ATCC 25923) et *E. coli* (ATCC 25922) sont plus sensibles que *S. aureus* et *E. coli*, alors que *S. enteritidis* et *P. aeruginosa* (ATCC 27853) sont les moins sensibles à l'effet de ces huiles essentielles (SA1>EC1> EC2, SA2>SE,PA1).

Nos résultats suggèrent que l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* et *N. granatensis*, peut être liée à leur composé majoritaire le nepetalactone (monoterpénoïde). Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (Zomorodian et al. 2012; Kalemba et Kunicka 2003 ; Dorman et Deans 2000).

Des études ont suggéré également que d'autres espèces de *Nepeta* contenant nepetalactone comme principal composé possèdent des activités antibactériennes et antifongiques (Zomorodian et al. 2012 ; Adiguzel et al. 2009 ; Sonboli et al. 2004 ; Stojanovic et al. 2005 ; Bourrel et al. 1993), ce qui n'exclut pas la possibilité que les autres constituants puissent expliquer la propriété antibactérienne de ces huiles. Ceci peut être supporté au moins en partie par les différences observées dans la sensibilité des bactéries testées aux différentes huiles

essentielles de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* qui ont des niveaux similaires en nepetalactone. Ainsi *N. Atlantica* présente une activité antibactérienne plus prononcée contre *E. coli* et *P. aeruginosa* ATCC 27853 comparativement aux autres HE de *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis*, qui est peut être liée à la présence relativement élevée du β -caryophyllène (8.2%) et du farnésol (2.5%). Comme cela a été décrit pour le *p*-cymène, qui, en facilitant la pénétration intracellulaire du carvacrol, potentialise les effets de ce composé sur *Bacillus cereus* (Ultee et al. 2002). Carson et al. 2006 ont rapporté que le 1,8 cinéole qui est considéré comme un élément d'activité antibactérienne marginale, peut perméabiliser les membranes bactériennes et faciliter l'entrée des autres éléments plus actifs. Il est également possible que les composants mineurs pourraient être impliqués en synergie avec les autres composés actifs (Giles et al. 2010). Des synergies du même ordre pourraient avoir lieu dans l'action de HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria*.

En outre nous avons constaté que dans l'huile essentielle de *N. granatensis*, le nepetalactone représente 42% et l'eucalyptol 24%. A noter que certaines études ont montré que l'eucalyptol présente une activité antibactérienne contre *S. aureus* (Karlovic et al. 2000). Néanmoins, on peut prendre en considération le fait que l'effet antibactérien des huiles essentielles pourrait résulter d'une action synergique ou antagoniste des différents composants d'une huile essentielle (Burt 2004).

L'activité antibactérienne varie d'une huile à l'autre et d'une souche à l'autre, ces résultats concordent avec les travaux de Kalemba et Kunicka 2003; Abu-Darwish et al. 2012. On note aussi que les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positive que sur les bactéries Gram négative. Toutefois, les bactéries Gram négative paraissent moins sensibles à leur action (Zomorodian et al. 2012 ; Burt 2004) et ceci serait directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt 2004). Néanmoins la bactérie *P. aeruginosa* (Gram négative) reste la bactérie la moins sensible à l'effet des huiles essentielles (Abu-Darwish et al. 2012 ; Dorman et Deans 2000).

Par ailleurs, certains travaux ont montré que la tolérance *P. aeruginosa* à des concentrations élevées de *Melaleuca alternifolia* et/ou à ses principaux constituants est associée à la membrane externe. En montrant que lorsque les cellules de *P. aeruginosa* sont prétraitées avec polymyxine B (perméabilisant) ou de l'EDTA, elles deviennent plus sensibles aux effets bactéricides de *Melaleuca alternifolia*, terpinène-4-ol, ou γ -terpinène (Carson et al. 2006 ; Longbottom et al. 2004 ; Mann et al. 2000).

Concernant *S. aureus*, des études ont montré que le traitement de cette bactérie avec l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé = TTO) entraîne la fuite d'ions potassium (Cox et al. 2000 ; Hada et al. 2003), inhibe la respiration (Cox et al. 2000), et produit des changements morphologiques apparents sous microscopie électronique (Carson et al. 2006; Reichling et al. 2002). Toutefois, aucune lyse significative des cellules de *S. aureus* n'a été observée par spectrophotométrie ou par microscopie électronique (Carson et al. 2006 ; Carson et al. 2002 ; Reichling et al. 2002).

Chez *E. coli*, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (TTO) a entraîné des effets néfastes sur l'homéostasie du potassium, la respiration cellulaire et la morphologie (Carson et al. 2006 ; Cox et al. 1998 ; Gustafson et al. 1998). Une lyse cellulaire d'*E. coli* traitée avec TTO a été rapportée (Carson et al. 2006 ; Gustafson et al. 1998), en contraste avec l'absence de toute lyse cellulaire chez *S. aureus* traitée avec TTO (Carson et al. 2002 ; Reichling et al. 2002).

L'huile essentielle de *Thymus x-porlock*, génère des épaissements anormaux de la paroi cellulaire de *Listeria monocytogenes* (Rasooli et al. 2006), la surface des cellules s'épaissit, devient plus rugueuse et perd de son uniformité, alors que les huiles essentielles d'origan, de bois de rose et de thym détruisent la membrane plasmique de *Streptococcus pneumoniae* de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (Horne et al. 2001).

Souza et al. 2013 ont étudié l'effet du carvacrol et du thymol sur des souches de *Staphylococcus aureus*. Ils ont conclu que les concentrations sublétales du carvacrol et du thymol inhibent l'activité enzymatique de la coagulase et de la lipase, entraînent une suppression totale de la production d'entérotoxine et une perte d'ions potassium et de matériel absorbant à 260 nm. Des observations au microscope électronique à balayage ont montré des déformations cellulaires de *S. aureus*. Le largage du matériel cellulaire et l'altération de la surface cellulaire suggèrent un endommagement de la membrane cytoplasmique cellulaire, ce qui entraîne une perturbation de la sécrétion de protéines et pourrait être responsable des propriétés anti-staphylocoques du carvacrol et du thymol (Souza et al. 2013).

Le cinnamaldéhyde, principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*), est très actif contre de nombreuses bactéries Gram positive et Gram négative (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* sp). Il inhibe les ATP synthétases

bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill et Holley 2004 et 2006).

Généralement l'hydrophobicité des molécules qui composent les huiles essentielles, facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Ceci induit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres composants cellulaires (Souza *et al.* 2013 ; Carson *et al.* 2006 ; Trombetta *et al.* 2005; Cox *et al.* 2000 ; Ultee *et al.* 2002; Sikkema *et al.* 1994). Outre les altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (Cristani *et al.* 2007). Vu la complexité et la diversité moléculaire des huiles essentielles, il est fort probable que leur pouvoir antibactérien soit attribuable à plusieurs mécanismes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Burt 2004 ; Carson *et al.* 2002 ; Skandamis *et al.* 2001).

En résumé, nos données indiquent que les HE des trois espèces de *Nepeta* (*N. atlantica*, *N. tuberosa*, et *N. cataria*) inhibent efficacement *E. coli* et *S. aureus*, deux souches résistantes, qui causent de graves problèmes sanitaires dans le monde entier. *N. atlantica* (plante endémique du Maroc) a montré aussi un pouvoir antibactérien contre *P. aeruginosa* caractérisé par sa tolérance aux huiles essentielles. Ceci indique que cette plante peut être utilisée pour le développement de composés alternatifs à traiter les infections causées par ces agents pathogènes résistants aux antibiotiques. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour clarifier les propriétés antimicrobiennes des isomères de nepetalactone.

Betoni *et al.* 2006 ont démontré une synergie entre les extraits de plantes et les médicaments antimicrobiens utilisés pour le traitement des maladies liées au *Staphylococcus aureus*. Le traitement combiné peut être utilisé pour étendre le spectre antimicrobien, afin d'éviter l'émergence de mutants résistants, de minimiser la toxicité et d'obtenir une activité antimicrobienne synergique ; il pourrait être une alternative à la monothérapie pour les patients atteints d'infections invasives qui sont difficiles à traiter, comme ceux dus aux espèces multirésistantes et pour ceux qui ne répondent pas au traitement standard (Kamatou *et al.* 2006). En outre, la synergie des antimicrobiens pourrait être utilisée dans le but de prévenir ou de retarder l'émergence *in vivo* de populations résistantes de microorganismes pathogènes (Lupetti *et al.* 2002).



Conclusion générale



Dans ce travail, l'objectif principal était de contribuer à la caractérisation de la composition chimique en huiles essentielles des espèces marocaines en vue d'enrichir et de valoriser le catalogue de la flore marocaine. Aussi, nous nous sommes intéressés à trois plantes connues dans la médecine traditionnelle à savoir *Thymus. satureioides* Coss, *Origanum compactum* Benth et *Nepeta*. Chaque fois que cela était possible, ces espèces et leurs HE ont été explorées davantage soit en termes de productivité des HE, soit en termes d'étude de leurs activités biologiques notamment antibactériennes.

Aussi, dans une première étude, nous nous sommes fixés comme objectif la caractérisation chimique de 29 huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss (endémique du Maroc) ainsi que l'étude de sa productivité en biomasse et en huile essentielle en fonction de l'altitude dans la vallée de l'Agoundis. Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés davantage à la variabilité de la composition de HE d'*Origanum compactum* Benth (endémique du Maroc), récolté sur 9 sites au Maroc (Ben Karich, Souk tifelt, Merchouch, Owazane, Taounat; Khenifra, Zraïb, Ben Ider et Mssabih).

Dans la troisième étude, nous nous sommes fixés comme objectif l'analyse de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* d'origine Marocaine : *N. tuberosa*, *N. cataria*, *N. granatensis* et *N. atlantica* qui est une endémique du Maroc.

Concernant *Thymus. satureioides* Coss :

- La biomasse estimée en matière verte varie de 20 à 518,5 g/m². Cependant Il n'existe pas de relation entre l'altitude et la production de la biomasse.
- Pour la productivité estimée en huile essentielle, là aussi les rendements varient de 0,20 à 2,29%. Nous avons remarqué que l'altitude explique faiblement la variation du rendement en HE.
- Pour la variabilité chimique, l'analyse de 29 échantillons d'huile essentielle par CPG/SM nous a permis d'identifier 26 constituants. Le composé prépondérant dans presque la majorité des échantillons est le bornéol avec des valeurs comprises entre 22,67 et 37,47%. D'autres constituants ont été identifiés dont les plus importants sont : le camphène (4,34- 21,01%), le carvacrol (1,76-21,21%), α -pinène (2,04-12,15%), α -terpinéol (3,13- 10,56%), 3-Carène (1,45-10,51%) et le p-cymène (2,25-8%).

Une étude par groupe hiérarchique a été réalisée sur les 29 échantillons d'huile essentielle. Elle a révélé la présence de 3 groupes bien distincts : le premier à bornéol / carvacrol, le second à bornéol / camphène / carvacrol et le dernier à bornéol / camphène / α -pinène. On remarque que le bornéol est le constituant prépondérant de tous les échantillons. Les trois classes ont montré des variations principalement dans les teneurs en carvacrol, camphène et α -pinène.

La présence dominante du bornéol dans tous les échantillons d'huiles essentielles confère au *Thymus satureioides* de l'Agoundis une caractéristique spécifique particulière devant être valorisée par sa propre appellation : chémotype à bornéol ou thym de bornéol.

La présence de bornéol, carvacrol, camphène, α -pinène ; composés dotés d'un pouvoir antimicrobien ; dans l'huile essentielle de *T. satureioides*, peut attribuer un effet antimicrobien à cette huile essentielle, ce qui peut justifier au moins en partie l'usage traditionnel de cette plante contre les infections gastro-intestinales, les infections de la gorge et de la bouche, les gripes..

Concernant *Origanum compactum* Benth :

L'identification des composés chimiques de l'huile essentielle a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Les compositions chimiques des 9 échantillons présentent une assez grande variabilité chimique. Les constituants majeurs sont : le carvacrol (67,81 à 3,39%), thymol (58,29 à 0,21%), p-cymène (27,75 à 0,42%) et le γ -terpinène (21,88 à 10,44%). Suite à l'analyse statistique, nos résultats fragmentaires obtenus à ce jour sur *O. compactum* permettent de supposer qu'il existe trois chémotypes : l'un à carvacrol, l'autre à thymol et le 3^{ème} à carvacrol/p-cymène.

Les données de la variabilité de composition chimique des huiles essentielles d'*Origanum compactum* Benth et leur teneur élevée surtout en carvacrol, thymol: composés qui présentent une activité antimicrobienne, justifieraient leur usage traditionnel contre les affections gastro-intestinales, la dysenterie, les gripes, les affections O.R.L. et les bronchites ainsi que dans la conservation des aliments.

Concernant les quatre espèces du genre *Nepeta* d'origine Marocaine : *N. tuberosa*, *N. cataria*, *N. granatensis* et *N. atlantica*, plante endémique du Maroc :

L'analyse de la composition chimique des quatre huiles essentielles a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), et des

tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique des quatre huiles essentielles sélectionnées.

- L'examen des résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de chacun des échantillons de *N. tuberosa*, *N. cataria*, *N. granatensis* et *N. atlantica* montre que le nepetalactone (le stéréo-isomères 4a-a, 7-a, 7ab- nepetalactone et le dihydronepetalactone) est le constituant majoritaire. Il représente environ 74% pour *N. atlantica*, 82% pour les deux espèces de *N. tuberosa* et *N. cataria* mais seulement 42% pour *N. granatensis*. On note aussi que *N. atlantica* est caractérisée par la présence relativement élevée du β -caryophyllène (8,2%) et du farnésol (2,5%), tandis que *N. granatensis* se distingue par la présence de l'eucalyptol (24%) accompagné de α -pinène (6,3%) et α -phellandrène (5,8%). En outre, *N. cataria* présente des teneurs appréciables en terpinène (4,2%) et en limonène (4,1%).
- Le screening de l'activité antibactérienne des quatre HE de Nepeta montre que l'huile essentielle de *N. atlantica*, *N. tuberosa* et *N. cataria* présente une activité antibactérienne contre les six souches de bactéries testées. Alors que l'huile essentielle de *N. granatensis* possède une activité antibactérienne relativement faible. Nos résultats indiquent que les HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et *N. cataria* inhibent efficacement *E. coli* et *S. aureus*, deux souches résistantes, qui causent de graves problèmes sanitaires dans le monde entier. L'effet le plus marquant c'est que *N. atlantica* endémique du Maroc a montré un pouvoir antibactérien contre *P. aeruginosa* caractérisée par sa tolérance aux huiles essentielles. Elle a présenté aussi une activité plus prononcée contre *E. coli* comparativement à *N. tuberosa*, *N. cataria* et *N. granatensis*. Ceci indique que cette plante peut être utilisée pour le développement de composés alternatifs à traiter les infections causées par ces agents pathogènes résistants aux antibiotiques.

Ces résultats permettent d'entrevoir la valorisation des HE des plantes étudiées de point de vue production et commercialisation en vue d'utilisations diverses dont notamment comme alternative dans la lutte contre les infections microbiennes.



Perspectives



Perspectives

❖ Pour *Thymus Satureioides* Coss.

Afin d'améliorer la situation dans la vallée de l'Agoundis, quelques recommandations ont été élaborées pour la population locale organisée au sein de la coopérative de l'Agoundis pour le Développement Forestier et Agricole (CADEFA). L'accent est mis sur les actions suivantes :

- ✓ L'application d'une rotation bisannuelle, c'est très important pour donner plus de chance à la régénération des plantes.
- ✓ Dans l'aire exploitée, les collecteurs doivent laisser quelques plantes pour la formation des graines. Ceci permet de reconstituer le stock en graines dans le sol.
- ✓ Éviter la coupe des jeunes plantules caractérisées par des racines superficielles et des ramifications faibles.
- ✓ Installer des ruches des abeilles dans la zone en repos afin d'améliorer la pollinisation et de ce fait, la production des graines.
- ✓ Enfin, la replantation du thym dans les zones dégradées est souhaitable.

❖ Pour *Origanum compactum* Benth.

L'*Origanum compactum* est une plante en voie de disparition et présente un polymorphisme chimique, il serait d'un grand intérêt d'entreprendre les actions suivantes :

- Élargir le champ d'étude pour déterminer les différents chémotypes.
- Étudier la variabilité génétique inter et intra-spécifique.
- Protéger et sauvegarder la biodiversité de cette espèce.
- La Mise en culture des chémotypes performants.

❖ Pour les espèces de *Nepeta*

Concernant les espèces de *Nepeta* et surtout *N. atlantica*, L'étude doit être complétée par les actions suivantes :

- Vérification de l'effet antibactérien du nepetalactone isolé.
- Investigation des mécanismes d'action des HE de *Nepeta*, surtout *N. atlantica*.
- Mise en évidence des mécanismes d'action du nepetalactone.
- La formulation de l'utilisation de *N. atlantica*.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.



- Abu-Darwish M. S., Al-Ramamne E. A. M., Kyslychenk V.S. & Karpiuk U. V. 2012.** The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ashshoubak region – South of Jordan Pak. J. Pharm. Sci., Vol.25(1), 239-246.
- Adiguzel A., Ozer H., Sokmen M., Gulluce M., Sokmen A., Kilic H., Sahin F. & Baris O. 2009.** “Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria*” Polish. J. Microbiol., Vol. 58(1), 69–76.
- AFNOR (Association française de Normalisation) 2000.** Huiles essentielles, Tome1 – Echantillonnage et méthode d’analyse, Tome 2 – Volume 1et 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6ème édition. Afnor, Paris,
- Agnihotri A., Khatoon S. & Shanta M. 2003.** Pharmacognostical evaluation of an antioxidant plant-Acorus calamus linn. Nat. Prod. Sci. 9(4), 264-269.
- Ahmad H., Tijerina M.T. & Tobola A.S. 1997.** Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 236, 825-828.
- Ajibesin K.K., Ekpo B.A., Bala D.N., Essien E.E. & Adesanya S.A. 2008.** Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. J. Ethnopharmacol. 115(3), 387-408.
- Akbay P., Calis I., Undeger U., Basaran N. & Basaran A.A. 2002.** In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L.. Phytother. Res., 16 (6) 593-595.
- Sharma S., Sangwan N. S. & Sangwan R. S. 2003.** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. Curr. Sci., 84 (4-25), 544-550.
- Allegrini J., Simmeon de Buochberg M. & Billot A. 1973.** Emulsions d’huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, 33, 73-86.
- Allen K. G., Banthorpe D. V. & Charlwood B. V. 1977.** Metabolic pools associated with monoterpen biosynthesis in higher plants. Phytochemistry 16: 79-83.
- Alvaez-Castellanos P.P. & Pascual-Viilalobos M.J. 2003.** Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. Ind. Crops Prod. 17, 77-81.
- Andrews J.M. 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemother., 48, 5-16.
- Andrews R.E., Parks L.W. & Spence K.D. 1980.** Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. Appl. Environ. Microb., 40(2), 301-304.

- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S. & Cabras P. 2006.** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem., 54(12), 4364–4370.
- Anonyme 1974.** Encyclopédie-Le Grand Médical. L’histoire de la médecine et de la chirurgie, l’avenir de la médecine, les prix Nobel. Edition Service S.A., Genève (Suisse), 397 pp.
- Anonyme 2002.** Etude relative à l’inventaire participatif de la biodiversité dans le versant Sud du haut Atlas (Document de synthèse 80p). Projet conseevation de la biodiversité par la Transhumance dans le le versant Sud du haut Atlas (CBTHA). Projet MOR/99/G33/A/1G/99.
- Anton R & Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles; Tec & Doc, Paris, 522 p.
- Assad Y.O.H., Torto B., Hassana H. A., Njagi, P.G.N., Bashir N.H.H. & Mahamat H. 1997.** Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Phytochemistry 44, 833-841.
- Aureli P., Costantini A. & Zolea S. 1992.** Antimicrobial activity of some essential oils against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55, 344–348.
- Aydin S., Beis R. Ozturk Y. & Baser K.H.C. 1998.** Nepetalactone a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. J. Pharm. Pharmacol, 50: 813-817.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Toxicol., 46 (2) 446-475.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Zhiri, A. & Idaomar M. 2005.** Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 585, 1–13.
- Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M. & Ferreira I.C.F.R. 2010.** Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolic. Food Sci. Technol. 43, 544–550.
- Baser K. H. C. 2002.** Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. Pure Appl. Chem. 74: 527–545.
- Baser K. H. C., Kirimer N., Kurkcuoglu M. & Demirci B. 2000.** “Essential oils of *Nepeta* species growing in Turkey,” Chem. Nat. Compd., vol. 36, no. 4, pp. 356–359.

- Bekhechi C., Atik-Bekkara F. & Abdelouahid D.E. 2008:** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*; Vol. 6; 153–159.
- Belaïche P. 1979.** Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. l'Aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.
- Belghazi L., Lahlou N., Alaoui Ismaili M., Abousaouiria T., Habti N., Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M. & Fellat-Zarrouck K. 2002.** Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie. Casablanca. Biochimie et Santé, 38-40.
- Béliveau R. & Gingras D. 2005.** Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré. Outremont. 213p.
- Bellakhdar J., Claiss R., Fleurentin J. & Younos C. 1991.** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* 35, 123–143.
- Bellekhdar J. 1997.** Pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaire, Paris, Edit. Ibis Press, 764 p.
- Benabid A. 2000.** «Flore et écosystèmes du Maroc », Évaluation et préservation de la biodiversité. Ibis Press, Paris, p. 360.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini J.F. & Costa J. 2007.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106,132-139.
- Benjilali B., Hammoumi M. & Richard H. 1987a.** Polymorphisme chimique des huiles essentielles de thym du Maroc. I- Caractérisation des composants. *Sciences des aliments* 7 : 77-91.
- Benjilali B., Hammoumi M., M'Hamedi A. & Richard H. 1987b.** Polymorphisme chimique des huiles essentielles de thym du Maroc. II. Analyse en composantes principales (ACP). *Sciences des aliments* 7 : 275-299.
- Benjilali B., Richard H. & Baritoux O. 1986.** Etude des huiles essentielles de deux espèces d'origan du Maroc: *Origanum compactum* Benth et *Origanum elongatum* Emb. Et Maire. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 19 22-26.
- Betoni J.E.C., Mantovani R.P., Barbosa L.N., De-Stasi L.C. & Junior A. F. 2006.** Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101(4), 387-390.

- Beylier-Maurel M.F. 1976.** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. Rivista Italiana. E.P.P.O.S., 58: 283-286.
- Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G. & Piattelli M., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. Flavour Frag. J. 8, 331–337.
- Birkett M. A., Hassanali A., Hoglund S., Pettersson J. & Pickett J. A. 2011.** “Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoide nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites,” Phytochemistry, vol. 72, no. 1, 109–114.
- Bloch K., Chaykin S., Phillips A.H. & Waard A. 1959.** Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyle-pyrophosphate. J. Biol. Chem., 234, 2595-2604.
- Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. & Hmamouchi M. 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr., J. Ethnopharmacol., 89, pp. 165-169.
- Bouhdid S., Abrini J., Zhiri A., Espuny M.J. & Manresa A. 2009.** Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. J. Appl. Microbiol.;106(5):1558-1568.
- Bouidida El H., Alaoui K., Cherrah Y., Chammache M. & Il Idrissi A. 2008.** Action analgésique de différents extraits non-volatils de *Nepeta atlantica* Ball. et *Nepeta tuberosa* L. ssp *reticulata* (desf.) Maire. Thérapie; 63 (4): 333-338.
- Bouidida H., Alaoui K., Cherrah Y., Fkih-Tetouani S. & IL Idrissi A. 2004.** Toxicité aiguë et action analgésique des huiles essentielles de *Nepeta atlantica* Ball et *Nepeta tuberosa* L. ssp. *reticulata* (Desf.) Maire. Phytothérapie, Vol. 2 (4), 120-125.
- Boulos L. 1983.** Medicinal plants of North Africa. Ed Reference Publications Inc Michigan.
- Bourrel C. 1993.** Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d’extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l’Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France.
- Bourrel C., Perineau F., Michel G. & Bessiere J.M. 2000.** Catnip (*Nepeta cataria*) essentiel oil: analysis of constituents, Bacteriostatic and fungistatic proprieties. Ess. Oil.Res., 5:159-167.
- Boyle W. 1955.** Spices and essential oils as preservatives. Am. Perfurmer Essent. Oil Rev. 66: 25-28.

Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., GaSastri L., Marceca M.X. & Guffanti E.E. 2006. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 76, 61-68.

Bruneton J. 1993. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Deuxième édition, Lavoisier, Paris. 915p.

Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 3ème édition Technique et documentation Lavoisier, 1120p.

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

Caccionni D., Guizzardi M., Biondi D., Agantio R. & Guiseppe R. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *penicillium digitatum* and *penicillium italicum*. *International J. Food Microbiol.* 43(12), 73-79.

Calcabrini A., Stringaro A., Toccaceli L., Meschini S., Marra M., Colone M., Salvatore G., Mondello F., Arancia G. & Molinari A. 2004. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* ,122(2):349-360.

Caldefie-Chézet F., Fusillier C., Jarde T., Laroye H., Damez M. & Vasson M.P. 2006. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother. Res.* 20, 364-370.

Caldefie-Chézet F., Guerry M., Chalchat J.C., Fusillier C., Vasson M.P. & Guillot J. 2004. Antiinflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Res.* 38, 805-811.

Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. & Akpulat H.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 87, 215–220.

Carson C. F., Hammer K. A. & Riley T. V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 19, No.1, p. 50–62.

Carson C. F., Mee B. J. & Riley T. V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1914–1920.

- Carson C.F. & Riley T.V. 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl. Bacteriol. 78(3): 264-269.
- Carson C.F., Cookson B.D., Farrelly H.D. & Riley T.V. 1995.** Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Antimicrob. Chemother. 35, 421-424.
- Chan C.H. & Loudon K.W. 1998.** Activity of tea tree oil on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J. Hosp. Infect. 39, 244-245.
- Chaouki W., Leger D.Y., Eljastimi J., Beneytout J.L. & Hmamouchi M. 2010.** Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. Pharm. Biol.; 48(3):269-274.
- Charai M., Faid M. & Chaoucha A. 1999.** Essential oils from aromatic plants (*Thymus broussonetti* Boiss., *O. compactum* Benth. and *Citrus limon* (L.) N.L. Burm.) as natural antioxidants for Olive oil, J. Essent. Oil Res., 11: 517-521.
- Charai M., Mosaddak M. & Faid M. 1996.** Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. Compactum* Benth., J. Essent. Oil Res., 8: 657-664.
- Chaumont J.P. & Leger D. 1989.** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. Relation structure –activité. Plant Med. Phyto. 23(2), 124-126.
- Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G. & Visinoni F. 2006.** Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. Anal. Chim. Acta 555, 157-160.
- Conner D.E. 1993.** Naturally occurring compounds. P.441-468. In P.M. Davidson, and A. Branen (ed.), Antimicrobials in foods, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Cox S. D., Gustafson J. E., Mann C. M., Markham J. L., Liew Y. C., Hartland R. P., Bell H. C., Warmington J. R., & Wyllie S. G. 1998.** Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26, 355–358.
- Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R. & Wyllie S. G. 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88 (1):170–175.

- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A. & Trombetta D. 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55(15), 6300-6308.
- Croteau R. & Karp F. 1977.** Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. *Arch. Biochem. Biophys.*, 184(1), 77-86.
- Dabbah R., Edwards V.M. & Moats W.A. 1970.** Antimicrobial action of some Citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.*, vol.19, N°1, p. 27-31.
- Dandlen S.A., Lima A.S., Mendes M.D., Miguel M.G., Faleiro M.L., Sousa M.J., Pedro L.G. Barroso J.G. & Figueiredo A.C. 2010.** Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour Frag. J.* 25. 150–155.
- De Buochberg M.S., Allegrini S., Bessiere C., Attisso M., Passet J. & Granger R. 1976.** Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* linnaeus. *Rivista. Italiana. E.P.P.O.S.*, 58: 527-536.
- Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T. & Chelghoum C. 2006.** Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. *Int. J. Aromather.*, 16, 95–100.
- Dorman H.J. & Deans S.G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-316.
- Dryden M.S., Daïly S. & Crouch M. 2004.** A randomized controlled trial of tea tree topical reparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J. Hosp. Infect.* 58, 86-87.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D. A. & Orlova I. 2006.** "Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives." *Critical Reviews in Plant Sciences* 25, 417-440.
- Dugo G. & Di Giacomo A. 2002.** *Citrus: The genus Citrus.* Taylor & Francis Publishing, London.
- Dunford N.T. & Vazquez R.S 2005.** Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *J. Applied Horticulture*; Vol. 7(1); 20-22.
- Duquenois P. 1968.** L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'europe du médicament. *Parf. Cosm. Sov.* 11: 414-418.

Durvelle J.P. 1893. Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants. J. Fritsch, Paris.

Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21, 308-323.

El Babili F., Bouajila J., Souchard J.P., Bertrand C., Bellvert F., Fouraste I., Moulis C. & Valentin A. 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Food Sci.* 76(3): C512-C518.

El Bouzidi L., Alaoui Jamali C., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D. & Abbad A. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind. Crop. Prod.* 43 (2013) 450– 456.

El Naghy M.A., Maghazy S.N., Fadi-Allah E.M. & El Gendy Z.K. 1992. Fungistatic action of natural oils and fatty acids on dermatophytic and saprophytic fungi. *Zentralbl. Microbiol.* 147: 214-220.

EL Rhaffari L. 2008. Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, Equipe Environnement et Santé.

Elhabazi K., Ouacherif A., Laroubi A., Aboufatima R., Abbad A., Benharref A., Ziad A., Chait A. & Dalal A. 2008. Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, Vol.(2) pp. 262-267.

Eloff J.N. 1998. A sensitive and quick method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta. Med.* 64, 711-713.

Emberger L. 1971. Considérations sur les genres de la flore Marocaine. In Travaux de botanique et d'écologie, livre jubilaire, Paris, Ed. Masson, 520p.

Encyclopédie du Maroc 1986-1989.

Esmaeili D., Mobarez A.M. & Tohidpour A. 2012. Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of *Thymus vulgaris* and *Eucalyptus globulus*. *Open Microbiol. Journal*, 6:65-69.

Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D. & Pagán R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, Vol.(6), 896-902.

- Fabian D., Sabol M., Domaracká K. & Bujňáková D. 2006.** Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. In Vitro*, 20, 1435-1445.
- Fahn A. 1979.** Secretory tissues in plants. - Academic Press, London.
- Fahn A. 1988.** Secretory Tissues and Factors Influencing their Development. *Phyton* (Austria) Vol. 28, Fasc. 1, p13-26.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Pedro L.G. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36. 35–40.
- Fellah S., Romadhane M. & Abderraba M. 2006.** Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *J. Soc. Alger. Chim.*; Vol. 16; N°2; pp 193-202.
- Fennane M. & Ibn Tatou M. 1998.** «Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc», *Boccone* 8, Palermo, p. 102-103.
- Fennane M., Ibn Tattou M., Mathez J., Ouyahya A. & El Oualidi J. 2007.** Flore pratique du Maroc, 2. Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae); *Trav. Ins. Sci. Sér. Bot.*, n° 38. Institut Scientifique, UMV Agdal, Rabat, 636 pp.
- Fisher K. & Phillips C. 2009.** In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.* 66: 180-185.
- Flamini G., Cioni P.L., Puleio R., Morelli I. & Panizzi L. 1999.** Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother. Res.* 13(4): 349-351.
- Flamini G., Tebano M., Cioni P.L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I. 2007.** Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40.
- Flaxman D. & Griffiths P. 2005.** Is tea tree oil effective at eradicating MRSA colonization? A review. *Br. J. Community Nurs.* 10, 123-126.
- Fluck H. 1963.** Chemical Plant Taxonomy, T. SWAIN Academic, London.
- Franchomme P. & Pénnoël D. 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

Garnero J. 1985. Semipreparative separation of terpenoids from essential oil. *Phytotherapy* 15 : 19.

Garnéro J. 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques- Encyclopédie des médecines naturelles. (Paris, France), phytothérapie, Aromathérapie, C-2, pp. 2-20.

Garnero J. 1996. Les huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, K 345, Paris.

Ghannadi A., Aghazari F., Mehrabani M., Mohagheghzadeh A. & Mehregan I. 2003. Quantity and Composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian J. Pharm. Sci.* 2: 103-105.

Ghasemi Pirbalouti A. , Mahdad E. & Craker L. 2013. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food Chem.*; 141(3), 2440-2449.

Ghasemi Pirbalouti A. 2009. "Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts. Iran". *Herba Polon.* 55: 69-75.

Gilani A.H., Shah A.J., Zubair A., Khalid S., Kiani J., Ahmed A., Rasheed M. & Ahmad V.U. 2009. Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L.. *J Ethnopharmacol.* 121(3):405-11.

Giles M., Zhao J., An M. & Agboola S. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731–737.

Gill A.O. & Holley R.A . 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 170-174

Gill A.O. & Holley R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5750-5755

Gkinis G., Tzakou O., Iliopoulou D. & Roussis V. 2003. Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Z. Naturforsch.* 58: 681-686.

Gómez-Sánchez A., Palou E. & López-Malo A. 2011. Antifungal activity evaluation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact. *J. Food Prot.*, 74(12):2192-8.

- Gortzi O., Lala S., Chinou I. & Tsaknis J. 2007.** Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*, 12, 932–945.
- Gouladis M., Tzakoy O., Verykokidoy E. & Harvala C. 2003.** Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* 17, 194–195.
- Goun E., Cunningham G., Solodnikov S., Krasnykch O. & Miles H. 2002.** Antithrombin activity of some constituents from *Origanum vulgare*. *Fitoterapia*, 73, 692–694.
- Grosso C., Figueiredo A.C., Burillo J., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., Coelho J.A. & Palavra A.M.F. 2010.** Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *J. Sep. Sci.*, 33, 2211–2218.
- Gunter K. D. & Bossow H. 1998.** The effect of etheric oil from *Origanum vulgare* in the feed ration of weaned pigs on their daily feed intake, daily gains and food utilization. *Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham*, 223.
- Gustafson J. E., Liew Y. C., Chew S., Markham J., Bell H. C., Wyllie S. G. & Warmington J. R. 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 194–198.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C. & Bourke P. 2008.** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.*, 124: 91–97.
- Hada T., Inoue Y., Shiraishi A. & Hamashima H. 2003.** Leakage of K⁺ ions from *Staphylococcus aureus* in response to tea tree oil. *J. Microbiol. Methods* 53(3), 309–312.
- Hala G.M., Christ H. & Carla K. 2000.** Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. *J. of Ethnopharmacol.*, 71(3), 513–520.
- Harkenthal M., Reichling J., Geiss H.K. & Saller R. 1999.** Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput, oil, niaouli oil, manuka oil, Kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*, 54(6): 460–463.
- Hart P.H., Brand C., Carson C.F., Riley T.V., Prager R.H. & Finlay-Jones J.J. 2000.** Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.*, 49, 619–626.
- Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A.R., Faleiro M.L. & Miguel M.G. 2009.** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* 116, 714–721.

- Hmamouchi M., Lahlou M. & Agoumi A. 2000.** Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. *Fitoterapia*, 71(3):308-14.
- Home D.S., Holm M., Oberg C., Chao S. & Young D.G. 2001.** Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res.* 13, 387-392.
- Horváthová E., Slamenová D., Marsálková L., Sramková M. & Wsóllová L. 2009.** Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food Chem. Toxicol.*; 47(6), 1318-1323.
- Hudaib M., Speroni E., Pietra M Di. & Cavrini V. 2002.** GC/MS evaluation of thymus (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharma. Biom. Analysis.* 29(4), 691-700.
- Ichrak G., Rim B., Loubna A.S., Khalid O., Abderrahmane R. & Said el M. 2011.** Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oils from *Thymus satureioides* and *Thymus pallidus*. *Nat. Prod. Commun.* 6(10):1507-10.
- Ietswaart J.H.A. 1980.** A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, Vol 4, Leiden University Press, The Hague, Netherlands.
- INRA 2011.** Rapport d'activité, Institut National de la Recherche agronomique 2011. Division de l'Information et de la Communication, Editions 2012, N° dépôt légal : 2012 MO 1019.
- Inyoue S., Tsuruoka T., Uchida K. & Ymaguchi H. 2001.** Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol. Immunol.*, 45(3), 201-208.
- Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Camporese A., Sosa S., Altinier G., Della Loggia R. & Aquino R. 2004.** In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 91(1):31-6.
- Ismaili H., Sosa S., Brkic D., Fkih-Tetouani S., Ilidrissi A., Touati D., Aquino R. & Tubaro A. 2002.** Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1137-1140.
- Jaafari A., Ait Mouse H., Rakib E., Ait M'barek L., Tilouai M., Benbakhta C., Boulli A., Abbad A. & Zyad A. 2007.** Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Braz. J. Pharmacogn.* 17 (4), 477-491.
- Jahandiez E. & Maire R. 1934.** "Catalogue des plantes du Maroc" - Spermaphytes et ptéridophytes. T3, 630-632.

- Jalas J. 1971.** Notes on *Thymus* L. (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. Bot. J. Linn. Soc., 64, 199–215.
- Jamali C.A., El Bouzidi L., Bekkouche K., Lahcen H., Markouk M., Wohlmuth H., Leach D. & Abbad A. 2012.** Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. Chem. Biodivers., 9(6):1188-97.
- Juhás S., Cikos S., Czikková S., Veselá J., Il'ková G., Hájek T., Domaracká K., Domaracký M., Bujnáková D., Rehák P. & Koppel J. 2008.** Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. Folia Biol. (Praha), 54(1):1-7.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F. & Weisslowicz H. 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol. 76, 626-631.
- Kalemba D. & Kunicka A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. Vol.10 (10), 813-829.
- Kamatou G.P.P., Van Zyl R.L., Van Vuuren S.F. & Viljoen A.M. 2006.** Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. J. Ess. Oil Res. 18: 72-79.
- Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B., Amer A.M., el-Banna H.A. & Amer W.M. 1994.** Extracts and fractions of *Thymus Capitatus* exhibit antimicrobial activities. J. Ethnopharmacol., 44(1): 19-24.
- Karaman S., Digrak M., Ravid U. & Ilcim A. 2001.** Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* Celak from Turkey. J. Ethnopharmacol.; 76(2): 183-186.
- Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D. & Skaltsa H. 2006.** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. Planta Med. 2006; 72(14), 1330-1334.
- Karlovic Z., Anic I., Miletic I., Prpic-Mehicic G., Pezelj-Ribaric S. & Marsan T. 2000.** Antibacterial activity of halothane, eucalyptol and orange oil. Acta Stomatol. Croat., 34, 303-306.
- Kim J.M., Mashall M.R., Cornell J.A., Preston III J.F. & Wei C.I. 1995.** Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurum* in culture medium and on fish tubes. J. Food Sci., 60 : 1364-1374.

- Kimball D.A. 1999.** Citrus processing: A complete guide, 2ème édition, p: 435. Aspen Publication inc., Maryland.
- Kintzios S.E. 2002.** Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios, S.E. (Ed.), *Oregano – The Genera Origanum and Lippia*. Taylor & Francis, London, pp. 3–8.
- Koh K.J., Pearce A.L., Marshman G., Finlay-Jones J.J. & Hart P.H. 2002.** Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation, *Br. J. Dermatol.* 147, 1212-1217.
- Kokkini S. 1996.** Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species, pp. 2–12. In Padulosi S. [Ed.], *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. CIHEAM Publication 12, Bari, Italy, 389 pp.
- Konig G. M., Wright A.D. & Sticher O. 1990.** A new polyhalogenated monoterpène from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *J. Nat. Prod.*, 53(6), 1615-1618.
- Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A. & Yildirim A. 2005.** Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9452–9458.
- Kwon J.A., Yu C.B. & Park H.D. 2003.** Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 61-65.
- Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S. & Boskou D. 1993.** Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197:20-23.
- Lahlou M. 2004.** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils *Phytotherapy research*; Vol.18; 435-448.
- Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M. & Hseini S. 2009.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, Revue de botanique*, Nouvelle série N° 186.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G. & Carde J.P. 1994.** Biogénétique des monoterpènes-*Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, Vol. 133; 79-99.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462.

- Lattaoui N. & Tantaoui-Elaraki A. 1994.** Comparative kinetics of microbial destruction by the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. J. Essent. Oil Res. 6, 165–171.
- Lattaoui N., Tantaoui-Elaraki A. & Errifi A. 1993.** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. J. Essent. Oil Res. 5, 45–53.
- Lawrence B.M. & Tucker A.O. 2002.** The genus *Thymus* as a source of commercial products. Thyme. The genus *Thymus*. In: Stahl-Bishop, E., Sáez, F. (Eds.), Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles, vol. 17. Taylor & Francis, London, pp. 252–262.
- Lee B.K., Kim J.H., Jung J.W., Choi J.W., Han E.S., Lee S.H., Ko K.H. & Ryu J.H. 2005.** Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma MSK-N-SH cells. Toxicol. Lett. 157, 49–56.
- Lemhadri A., Zeggwagh N.A., Maghrani M., Jouad H. & Eddouks M. 2004.** Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. J. Ethnopharmacol. 92, 251–256.
- Lev E. 2006.** Ethno-diversity within current ethno-pharmacology as part of Israeli traditional medicine – A review. J. Ethnobiol. Ethnomed., 2:4, 1–12.
- Levison M.E. 2004.** Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. Infect. Dis. Clin. North Am., 18, 451–465.
- Lis-Balchin M., Hart S. & Simpson E. 2001.** Buchu (*Agathosma betulina* and *A. crenulata*, Rutaceae) essential oils: their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. J. Pharm. Pharmacol., 53(4): 579–582.
- Lis-Balchin M., Hart S.L. & Deans S.G. 2000.** Pharmacological and antimicrobial studies on different tea- (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka Kunzea ericoides* or *Knuka*), originating in Australia and New Zealand. Phytother. Res; 14(8): 623–629.
- Liu G. Y., Essex A., Buchanan J. T., Datta V., Hoffman H. M., Bastian J. F., Fierer J. & Nizet V. 2005.** *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. J. Exp. Med., Vol. 202, No. 2, 209–215.
- Longbottom C. J., Carson C. F., Hammer K. A., Mee B. J. & Riley T. V. 2004.** Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. J. Antimicrob. Chemother., 54, 386–392.

Loomis D. & Croteau R. 1980. Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. 364-410. Academic Press, San Francisco.

Lopes N., Kato M. J., Andrade Eloisa H.A., Maia J. G. S., Yoshida M., Planchart A. R. & Katzin A. M. 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. J. Ethnopharmacol., 67, 313–319.

Lopes N.P., Kato M.J., Aguiar Andrade H., Soares Maia J.G. & Yoshida M. 1997. Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves, Phytochemistry 46, 689-693.

Loupy A. 2006. Microwaves in Organic Synthesis, 2ième édition, Tome I et II. Wiley VCH, Weinheim.

Loziene K. & Venskutonis P.R. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. Biochem. Syst. Ecol.; Vol. 33; 517–525.

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

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

Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M. & Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends Mol. Med., 8: 76–81.

Lynen F., Eggerer H., Henning U. & Kessel I. 1958. Farnesylpyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene. III. Angew. Chem., 70, 738-742.

Mann C. M., Cox S. D. & Markham J. L. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Lett. Appl. Microbiol., 30(4), 294–297.

Marin P.D., Grayer R.J., Kite G.C. & Veljic M. 2005. External flavones from *Thymus striatus* Vahl (Lamiaceae). Biochem. Syst. Ecol., 33, 1179-1182.

Marino M., Bersani C. & Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. J. Food Protein 62 (9), 1017–1023.

- Maruyama N., Sekimoto N. & Ishibashi H. 2005.** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. inflamm*, 2, 1-11.
- Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraief I., Khemiss F., Chekir Ghedira L. & Boukef K. 2006.** Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *J. Food Agric. Environ.*, Vol.4; N°3-4; 61-65.
- May J., Chan C.H., King A., Williams L. & French G.L. 2000.** Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45, 639-643.
- Meister A., Bernhardt G., Christoffel V. & Buschauer A. 1999.** Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med*, 65(6), 512-516.
- Mengel P., Beh D., Bellido G.M. & Monpon B. 1993.** VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.
- Merghoub N. 2004.** Etude de l'activité antiproliférative in vitro des huiles essentielle de quatre espèces d'une plante du genre *Nepeta*, Mémoire de DESA.
- Meyer-Warnod B. 1984:** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist*, 9, 93-103.
- Mezzoug N., Elhadri A., Dallouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A. Baudoux D., Diallo B. & El Jaziri A. 2007.** Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.*, 629, 100–110.
- Mheen (van der) H. 2006.** Selection and production of oregano rich in essential oil and carvacrol. *Acta Hort.*, 709, 95–99.
- Mihailovic-Stanojevic N., Belščak-Cvitanović A., Grujić-Milanović J., Ivanov M., Jovović D.j., Bugarski D. & Miloradović Z. 2013.** Antioxidant and Antihypertensive Activity of Extract from *Thymus serpyllum* L. in Experimental Hypertension. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 68(3):235-40.
- Milner J.Â. 2001.** A historical perspective on garlic and cancer. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *J. Nutr.* 131, 1027-1031.
- Milner J.Â. 2006.** Preclinical perspectives on garlic and cancer. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 136, 827-831.

- Miura K., Kikuzaki H. & Nakatani N. 2002.** Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. J. Agric. Food Chem. 50, 1851–1854.
- Morales R. 2002.** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup, E., Saez, F. (Eds.), *Thyme: The Genus Thymus*. Taylor & Francis, London, pp. 1-43.
- Morin P. & Richard H., 1985.** Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation in Proc. 4 Fh Weurman Flav. Res. Symp., pp 563 - 576, Elsevier Sci. Publ., B. V., Amsterdam.
- Muller R.F., Berger B. & Yegen O. 1995.** Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agric. Food Chem. 43, 2262– 2266.
- Muthu C., Ayyanar M., Raja N. & Ignacimuthu S. 2006.** Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. J Ethnobiol. Ethnomed., 2:43, 1-10.
- N’Guessan K., Kadja B., Zirihi G.N., Traoré D. & Aké-Assi L. 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire). Sciences & Nature Vol. 6 N°1 : 1 – 15.
- Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. & Someya T. 1985.** A study of the phototoxicity of lemon oil. Arch. Dermatol. Res. 278, 31-36.
- Nakiboglu M., Urek R.O., Kayali H.A. & Tarhan L. 2007.** Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. Food Chem., 104, 630–635.
- Napoli E. M., Curcuruto G. & Ruberto G. 2010.** Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. Biochem. Syst. Ecol. 38; 816–822.
- NCCLS 1990.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility test for bacteria that grows aerobically- Second edition, approved standard; NSSLS Doc M7-A2, Villanora, PA.
- Nestorović J., Misić D., Siler B., Soković M., Glamoclija J., Cirić A., Maksimović V & Grubisić D. 2010.** Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. Fitoterapia; 81(6):621-626.
- Nhu-Trang T.T., Casablanca H. & Grenier- Loustalot M.F. 2006.** Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ -terpinène and p-cymène in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatographypyrolysis- isotope ratio mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1132, 219-227.

Nostro A., Cannatelli M.A., Giuseppe C. & Alonzo V. 2001. The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18: 583-585.

Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid R., Yaniv Z. & Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90, 710–715.

Okazaki K., Kawazoe K. & Takaishi Y. 2002. Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytother. Res.* 16. 398–399.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. OMS, Genève, p78.

Ormeno E., Fernandez C. & Mévy J.P. 2007. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*; Vol. 68; pp 840–852.

Oumzil H., Ghouami S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M. & Benjouad A. 2002. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.*, 16, 727-731.

Oussala M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.*, Vol.73; 236-244.

Ozkan G., Sagdic O., Ekici L., Ozturk I. & Ozcan M.M. 2007. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. Extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *J. Food Lipids* 14, 157–169.

Padua L.S. de, Bunyapraphatsara N. & Lemmens R.H.M.J. 1999. Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1). Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Paris M. & Hurabielle M. 1981. Abrégés de matière médicale. Pharmacognosie Tome 1. Ed Masson. Paris. France

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

Peana A.T., D'Aquila P.S., Panin F., Serra G., Pippia P., Moretti M.D.L. 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* Vol. 9 (8), 721-726.

Pellecuer J., Allegrini J. & De Buocberg S.M. 1976. Huiles essentielles bactéricide et fongicides. *Revue de l'institut Pasteur de Lyon.* 9 : 135-159.

- Pellecuer J., Roussel J.L. & Andary C. 1980.** Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana Essenzo (EPPOS)*. 23, 45-50.
- Perez C., Agnese A.M. & Cabrera J.L. 1999.** The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): Chemical composition and antimicrobial activity tests. *J. Ethnopharmacol.* 66(1): 91-96.
- Pérez-Alfonso C.O., Martínez-Romero D., Zapata P.J., Serrano M., Valero D. & Castillo S. 2012.** The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *Int. J. Food Microbiol.*, 158(2):101-106.
- Perry N.B., Anderson R.E. & Brennan N.J. 1999.** Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) : variation among individuals, plant parts, seasons, and sites. *J. Agric. Food chem.*, Vol.47 (5), 2048-2054.
- Peterson C. J., Nemetz L. T., Jones L. M. & Coat J. R. 2002.** “Behavioral activity of catnip (Lamiaceae) essential oil components to the German cockroach (Blattodea: Blattellidae),” *J. of Econ. Entomol.*, Vol. 95, no. 2, 377–380.
- Peterson C.J. & Ems-Wilson J. 2003.** Catnip essential oil as a barrier to subterranean termites (*Isoptera rhinotermitidae*) in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 96 (4): 1275-1282.
- Peyron L. & Naves Y.R. 1977.** Lexique des termes et expressions utilisées dans les industries des matières premières aromatiques. (Les huiles essentielles). *Rivista italiana*.
- Porter N. 2001.** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. Number 39.
- Poulose A. J. & Croteau R. 1978.** Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of gamma-terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 307-314.
- Pyun M.S. & Shin S. 2006.** Antifungal effects of the volatile oils from *Asium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, 13, 394-400.
- Rai M. K., Acharya D. & Wadegaonkar P. 2003.** Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects*, Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-185.
- Rasooli I. & Mirmostafa S. A. 2002.** Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*, 73, 244–250.
- Rasooli I., Rezaei M.B. & Allameh A. 2006.** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* 10: 236-241.

- Reichling J., Weseler A., Landvatter U. & Saller R. 2002.** Bioactive essential oils used in phytomedicine as antiinfective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Acta Phytotherapeutica* 1, 26–32.
- Richard H. 1992 :** Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris.339p.
- Richter G. 1993.** Métabolisme des végétaux - Physiologie et biochimie. Edition PRESSES Polytechniques et universitaires romandes. 526 pages.
- Rota M. C., Herrera A., Martínez R. M., Sotomayor J. A. & Jordán M. J. 2008.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, Vol. 19(7), 681-687.
- Ruzicka L. 1953.** The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357-396.
- Sauvage C. 1974.** L'état actuel de nos connaissances sur la flore du Maroc. Colloque du CNRS n° 235, la flore du bassin Méditerranéen. Paris.
- Saxena J. & Mathela C.S. 1996.** Antifungal activity of new compounds from *Nepeta leucophylla* and *Nepeta clarkei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, p.702-704.
- Scherrer A.M., Motti R. & Weckerle C.S. 2005.** Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy) *J. Ethnopharmacol.*, 97,129-143.
- Schmidt E., Wanner J., Hiiferl M., Jirovetz L., Buchbauer G., Gochev V., Girova T., Stoyanova A. & Geissler M. 2012.** Chemical composition, olfactory analysis and antibacterial activity of *Thymus vulgaris* chemotypes geraniol, 4-thujanol/terpinen-4-ol, thymol and linalool cultivated in southern France. *Nat. Prod. Commun.* 7(8):1095-8.
- Schnitzler P., Schon K. & Reichling J. 2001.** antiviral activity of australian tea oil and eucalyptus oil against *herpes simplex* virus in cell culture. *Phamazie*. 56(4):343-347.
- Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. & Steiner W. 2001.** Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. *Biotechnol.* 39 (4), 341-345.
- Senhaji O., Faïd M. & Kalalou I. 2006 :** Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie*; Vol. 1; pp 24–30.
- Sfeir J., Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S. & Licznar P. 2013.** In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils against *Streptococcus pyogenes*. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* , Vol. 2013, 9p.
- Sharma S., Sangwan N. S. & Sangwan R. S. 2003.** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Sci.* 84 (4-25), 544-550.

- Shin S. & Kim J.H. 2005.** In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.*, 28: 897-901.
- Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M & Al-Ahdal M.N. 1996.** Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *herpes simplex* virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci. Res.* 24, 185-186.
- Sienkiewicz M., Lysakowska M., Cieciewicz J., Denus P. & Kowalczyk E. 2011.** Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med. Chem.*, 7 (6): 674-689.
- Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B. 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269: 8022-8028.
- Silou T., Malanda M. & Loubaki L. 2004.** Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2^3 . *J. Food Eng.*, Vol. 65 (2), 219–223.
- Silvério M.S., Del-Vechio-Vieira G., Pinto M.A., Alves M.S. & Sousa O.V. 2013.** Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). *Molecules*; 18(8):9785-9796.
- Simic N., Palic R., Vajs V., Milosavljevic S. & Djkovic D. 2002.** Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil. *J. Essent. Oil Res.*, 14(1): 76-78.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou, Kokkini S., Lanaras T. & Arsenakis M. 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. *J. Agric. Food.* 44: 1202-1205.
- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K. & Nychas G. J. E. 2001.** Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. *Ital. J. Food Sci.*, 13, 55–65.
- Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G. & Johnson C.B. 1999.** A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry*, 52, 649–657.
- Slamenová D., Horváthová E., Wsóllová L., Sramková M. & Navarová J. 2009.** Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutat. Res.*, Vol.677(1-2), 46–52.
- Smallfield B. 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*. Number 45, 4p.

- Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T. & Hotchkiss S.A. 2000.** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168,189-99.
- Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H.A., Dafererad D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. & Sahin F. 2004.** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, Vol.15 (8): 627-634.
- Soliman K.M. & Badeaa R.I. 2002.** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669–1675.
- Sonboli A., Salehi P. & Yousefzadi M. 2004.** Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Z.Naturforsch. C. J. Biosci.*, 59(9-10): 653-656.
- Souza E.L., Oliveira C.E.V., Stamford T.L.M., Conceição M.L. & Gomes Neto N.J. 2013.** Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, entérotoxine production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.*, 44 (1), 29-35.
- Sow A.I., Koyalta D., Boye C.S., Diedhiou/Badiane D. & Bassene E. 1995.** Antibacterial activity of essential oils from mint in Senegal. *Dakar med.*, 40(2): 193-195.
- Sözmen F., Uysal B., Köse E.O., Aktaş O., Cinbilgel I. & Oksal B.S. 2012.** Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* P.H.Davis with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. *Chem. Biodivers.* 9(7):1356-63.
- Srifi A., Rahmouni B., Boudida El H., Alaoui K., Cherrah Y., Il Idrissi A., El Mellouki W., Bouchrik M. & Lmimouni B. 2013.** Étude phytochimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepeta* du Maroc. *Phytothérapie*, Volume 11 (3), 161-171.
- Stahl-Biskup E. & Saez F. 2002.** Thyme, The genus *Thymus*. Taylor and Francis. (331 pp).
- Stojanovic G., Radulovic N., Lazarevic J., Miladinovic D. & Dokovic D. 2005.** Antimicrobial activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *J. Essent. Oil Res.* 17, 587-589.
- Su J., Chen J., Liao S., Li L., Zhu L. & Chen L. 2012.** Composition and biological activities of the essential oil extracted from a novel plant of *Cinnamomum camphora* Chvar. *Borneol. J. Med. Plants Res.*, Vol. 6(18), pp. 3487-3494.
- Svoboda K.P. & Hampson J.B. 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related

pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F. & Legault J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. J. Ethnopharmacol., 103(1):99-102.

Sylvestre M., Legault J., Dufour D. & Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. Phytomedicine, 12, 299-304.

Sylvestre M., Pichette A., Lavoie S., Longtin A. & Legault J. 2007. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* L. Coulter. Phytother. Res. 6, 536-540.

Tabanca N., Kirmer N., Demirci F. & Baser K. H. 2001. «Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. Phrygia and the enantiomeric distribution of borneol». J. Agric. Food Chem., 49, 4300-4303.

Tahiri B., Rejdali M. & Atbib M. 1998. Contribution à l'étude caryologique de certaines espèces marocaines du genre *Thymus* L. (*Labiatae*). Fl. Medit., 8: 41-47.

Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N., Errifi A. & Benjilali B. 1993. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. J. Essent. Oil Res., 5, 45– 53.

Teisseire P.J. 1991. Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p.

Tepe B., Daferera D., So˘kmen M., Polissiou M. & So˘kmen A. 2004. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*. J. Sci. Food Agric., 84, 1389–1396.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA., Daferera D., Polissiou M. & Sokmen A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. J. Food Eng., 66: 447-454.

Thompson J.D, Chalchat J.C, Michet A, Linhart Y.B & Ehlers B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. J. Chem. Ecol., Vol. 29; N°4.

Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Naze mi J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Phytomedicine, 17: 142-145.

- Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M. & Rammal S. 2002.** Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58, 491–495.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. & Bisignano G. 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(6), 2474-2478.
- Tyler V.E. 1993.** Phytomedicines in western Europe: potential impact on herbal medicine in the United States. In *Human medicinal agents from plants*. Edited by A.D. Kinghorn and M.F. Balandrin. American Chemical Society, San Francisco, Washington, DC. pp.25–37.
- Uedo N., Tatsuta M., Lishi H., Baba M., Sakai N., Yano H. & Otani T. 1999.** Inhibition by Dlimonene of gastric carcinogenesis induced by A/-methyl-/V'-nitro-A/-nitrosoguanimidine in wistar rats. *Cancer Lett.*, 137,131-136.
- Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A. & Smid E.J. 2000a.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.*, 174 (4), 233– 238.
- Ultee A. & Smid E.J. 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 64(3), 373-378.
- Ultee A., Bennik M. H. & Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568.
- Ultee A., Gorris L.M.G & Smid E.J. 1998.** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 211-218.
- Ultee A., Kets E.P.W. & Smid E.J. 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, 65(10): 4606-4610.
- Ultee A., Slump R.A., Steging G. & Smid E.J. 2000b.** Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.*, 63(5): 620-624.
- Uribe S., Ramirez J. & Peña A. 1985.** Effects beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.*, 161(3):1195-1200.
- Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. & Cilapraz J. 1978.** L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant. Med. Phytother.*, 12: 43-52.
- Van Den Broucke C.O. & Lemli J.A. 1983.** Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm. Weekbl. Sci.*, 5(1): 9–14.

- Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M., Donmez E. & Tepe B. 2003.** Antibacterial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). J. Agric. Food Chem., 51(1), 63-67.
- Vasconcelos Silva M.G., Craveiro A.A., Abreu Matos F.J., Machado M.I.L. & Alencar J.W. 1999.** Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. Fitoterapia Vol.70(1), 32-34.
- Viaud H. 1993 :** Distillateur Thérapeutiques naturelles-GNOMA- Ed.
- Vila R., Mundina M., Tomi F., FurSan R., Zacchino S., Casanova J. & Canigüeral S. 2008.** Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. Planta med., Vol. 68, 164-167.
- Viollon C. & Chaumont J.P. 1994.** Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia, 128(3), 151-153.
- Vokou D., Kokkini S. & Bessiere J.M. 1993.** Geographic Variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) Essential Oils. Biochem. Syst. Ecol. Vol 21 N°2. 287-295.
- Vokou D., Margaritis N.S. & Lynch J.M. 1984.** Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. Soil Biol. Biochem., 16, 509-513.
- Volk J. & Stodola J. 1983.** Plantes médicinales ; ed. Grund. p 204.
- Wallach O. 1887.** Zur Kenntnis der Terpene und ätherischen Oele. Justus Lieb. Ann. Chem., 238, 78-89.
- Wan J., Wilcock A. & Coventry M.J. 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Microbiol., 84: 152-158.
- Wang M.F., cheng K.W. Wu Q.L. & Simon J.E. 2007.** Quantification of nepetalactones in catnip (*Nepeta cataria* L.) by HPLC coupled with ultraviolet and mass spectrometric detection. Phytochem. Anal., 18, 157-160.
- Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T. & Thubthimthed S. 2005.** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia, 76: 233-236.
- Wichtl M. & Anton R. 1999.** Plantes thérapeutiques, Technique et Documentation, Paris.
- Wu N., Fu Y.J., Kong Y., Zu Y.G. & Liu X.L. 2011.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environ. Toxicol. Pharm., 32, 63-68.

Xianfei X., Xiaoqiang C., Shunying Z. & Guolin Z. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. Food Chem., Vol. 100 (4), 1312-1315.

Yousuf Dar M., Shah W.A., Mubashir S. & Rather M.A. 2012. Chromatographic analysis, anti-proliferative and radical scavenging activity of *Pinus wallichina* essential oil growing in high altitude areas of Kashmir, India. Phytomedicine, 19(13), 1228-1233.

Zenasni L., Boudida H., Hancali A., Boudhane A., Amzal H., Il Idrissi A., El Aouad R., Bakri Y. & Benjouad A. 2008. The essentials oils and antimicrobial activity of four nepeta species from Morocco. J. Med. Plants Res., Vol. 2(5): 111-114.

Zheng G., Kenny P. & Lam L. 1992. Inhibition of benzo[a]-pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. Carcinogenesis 13, 1921-1923.

Zomorodian K., Saharkhiz M.J., Shariati S., Pakshir K., Rahimi M. J. & Khashei R. 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Nepeta cataria* L. against Common Causes of Food-Borne Infections. ISRN Pharm.,1-6.



Annexes



Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes:

Publications

Zenasni L., Boudida H., Hancali A., Boudhane A., Amzal H., Il Idrissi A., El Aouad R., Bakri Y. & Benjouad A. 2008. The essentials oils and antimicrobial activity of four nepeta species from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(5), pp. 111-114.

Zenasni L., Bakhy K., Gaboun F., Mousadak R., Benjouad A. & Al Faiz C. 2014. Essential oil composition and biomass productivity of Moroccan endemic *Thymus satureioides* Coss. & Ball. growing in the Agoundis Valley. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 8(12), pp. 504-512.

Communications internationales

Communications orales

* **Zenasni L., Boudida H., Hancali A., Boudhane A., Amzal H., Il Idrissi A., El Aouad R., Bakri Y. & Benjouad A.** Antibacterial activity of *Nepeta* ssp. Essential oils. Séminaire International sur la valorisation des plantes médicinales en zones arides. 1-3 Février 2005, Ourgla, Algérie.

* **Zenasni L., Boudida H., Hancali A., Boudhane A., Amzal H., Il Idrissi A., El Aouad R., Bakri Y. & Benjouad A.** Antibacterial activity of *Nepeta* ssp. Essential oils. International Congress on Medicinal Plants, 16-19 March 2005, Errachidia, Morocco.

Communications par affiche

* **Zenasni L., Grech H., Hancali A., Charoufe M., El Aouad R., Benjouad A.** The essential oil and antimicrobial activity of *Artemisia inculta* from Morocco. 3rd International SMBBM Congress of Biochemistry and Molecular Biology. IUBMB Special Meeting on Plant Stresses & 6th FASBMB Congress. 20-24 April 2009, Marrakesh, Morocco, P189.

* **Zenasni L., Chawki I., Al Faiz C.** Chemical variation in the essential oil of *Thymus brossounetii* Boiss and *Origanum compactum* from Morocco. International workshop on research for development, sustainable use and adding value of aromatic and medicinal plants. 7-9 November 2007, Chefchaouen, Morocco, P22.

Full Length Research Paper

The essentials oils and antimicrobial activity of four nepeta species from Morocco

Laila Zenasni¹, Houssine Boudida², Amina Hancali³, Amina Boudhane³, Hassan Amzal¹, Abdelkader El Idrissi², Rajae El Aouad³, Youssef Bakri¹ and Abdelaziz Benjouad^{1*}

¹Laboratoire de Biochimie et Immunologie, Faculté des Sciences, Rabat, Morocco.

²Laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et Bio-organique, Faculté des Sciences, Rabat, Morocco.

³Laboratoire de Microbiologie, Institut National d'Hygiène, Rabat, Morocco.

Accepted 29 April 2008

The chemical composition of essential oils (EO) isolated from four *Nepeta* species (*Nepeta atlantica* Ball, *Nepeta tuberosa* L. subsp. *reticulata* (Desf.) Maire, *Nepeta cataria* L., *Nepeta granatensis* Boiss) were characterized and the antibacterial activity tested. Chemical analyses indicated that the major component of these EO was the sterioisomere 4a- α , 7- α , 7a- β -nepetalactone which represented more than 70% of oils from *N. atlantica*, *N. tuberosa*, *N. cataria* and 39.4% of oils from *N. granatensis*. The EO from *N. atlantica*, *N. tuberosa*, and *N. cataria* presented comparable antibacterial activity against tested bacteria. Statistical analysis indicated that *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922) strains were the most sensitive to the EO (MICs ranged from 4.37 to 16.25 μ L/mL), these strains were more sensitive than clinically isolated *E. coli*, *S. aureus* and *S. enteritidis* and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) strains. The EO from *N. granatensis* contained low nepetalactone concentrations and showed relatively poor antibacterial activity against tested bacteria (MICs ranged from 22.50 to 80.00 μ L/mL). These results indicate that the antibacterial activity of EO from the *Nepeta* genus depends on their chemical composition and suggests that nepetalactone plays an important role in antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* strains, two microorganisms which cause morbidity and mortality worldwide.

Key words: *Nepeta atlantica*, *Nepeta tuberosa*, *Nepeta granatensis*, *Nepeta cataria*, Lamiaceae, essential oil composition, 4a- α , 7- α , 7a- β -nepetalactone, antibacterial activity.

INTRODUCTION

Nepeta is a genus of annual or perennial herbs; it belongs to the Lamiaceae family, which includes approximately 250 species. These plants are localized to central and southern Europe, Asia, the Middle East, northern Africa, and to tropical mountains in Africa (Ghannadi et al., 2003; Gkinis et al., 2003).

Nepeta species are used in the traditional medicine of many countries and have a large ethnobotanical effect: diuretic, diaphoretic, vulnerary, antitussive, antispasmodic, antiasthmatic, tonic, febrifuge, emmenagogue and carminative (Ghannadi et al., 2003; Nostro et al., 2001). However, neither the antimicrobial activity of EO of *Nepeta* species growing spontaneously in Morocco nor the composition of the essential oils has been published. In

fact antibacterial properties of Lamiaceae oils compounds such as borneol and pinene has been reported (Dorman and Deans, 2000; Tabanca et al., 2001; Vardar-Unlü et al., 2003). It has also been reported that plant oils rich in phellandrene and limonene show high antimicrobial activity (Gonzalez et al., 2004). In addition, plants rich in carvophyllene and sesquiterpenoid hydrocarbons exhibited a broad spectrum of antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Oyedeji & Afolayani, 2005). In this context we were interested in analyzing the composition and the antibacterial activity of EO from *Nepeta* species. In this report we studied the composition of the oils from four *Nepeta* species growing in the wild in Morocco (Fennane and Ibn Tattou, 1998) i.e. *N. tuberosa* L. subsp. *reticulata* (Desf.) Maire, *N. cataria* L., *N. granatensis* Boiss, and *N. atlantica* Ball and we evaluated the antibacterial activity of their EO against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

*Corresponding author. Email: benjouad@fsr.ac.ma. Tel: +212 37 77 80 12. Fax: +212 37 77 54 61.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Whole plants of *N. cataria*, *N. granatensis*, *N. tuberosa* and *N. atlantica* were collected from Moroccan regions with agreement from the authorities and respecting the United Nations Convention on Biodiversity. *N. cataria* was collected in the region of Kenitra, *N. granatensis* and *N. tuberosa* were collected in the region of Ifran, and *N. atlantica* was collected in Boumia-Tounit.

Essential oil extraction

Plant material (100 g) was submitted to steam distillation and the distillate was subject to successive ethyl acetate extractions (3 x 100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The yield of extraction (percentage of weight of oil/weight of dry plant) was: 0.96% for *N. granatensis*, 1.04% for *N. atlantica*, 1.02% for *N. cataria*, and 1.2% for *N. tuberosa*.

Analytical techniques

GC-MS analysis of the EO was performed on a TRACE GC ULTRA equipped with non-polar VB5 (5% phenyl; 95% methylpolysiloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness), directly coupled to a mass spectrometer (Polaris Q) (EI 70 eV). The temperature of the injector and detector was set at 250°C and 300°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60°C to 200°C at 2°C/min, and then from 200°C to 300°C at 20°C/min. The components of the oil were identified by comparison of their mass spectra with those in the Wiley-NIST 7th edition library of mass spectral data. The percentage composition of the oil sample was calculated from GC-MS peak areas.

Microorganisms and inoculum preparation

The bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) isolated from patients were obtained from the culture collection of the microbiology department (Microthec Unity) at the National Institute of Health (Rabat, Morocco). Bacteria were identified based on the colony morphology, gram stain, API enterobacteria and biochemical gallery. Reference strains were obtained from the American Type Culture Collection: *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli* ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa* ATCC 27853).

Each isolate was inoculated into Muller Hinton Agar with a scraping from a glycerol stock frozen at -20°C and incubated during 18 - 20 h at 37°C. For the inoculum, colonies were selected from 18 - 20 h old cultures. Turbidity was adjusted to that of a 0.5 MacFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL) using sterile NaCl solution (0.9%).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The viability indicator MTT (3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) and the quick microplate method (Eloff, 1998) were used for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) as we described previously (Oumzil et al., 2002). A range of doubling dilutions of Nepeta EO was prepared in Muller Hinton Broth (BMH) in a 96-well microplate. Tween-80 was included in all assays at a final concentration of 0.001% (v/v) to enhance oil solubility. Each well was inoculated with

25 μL of a bacterial suspension. The covered microplates were incubated overnight at 37°C.

The bacterial suspension changed to blue when bacterial growth occurred. To verify that there was no abiotic reduction of MTT, tested products were incubated directly with the viability indicator without any bacterial suspension (negative control). The MIC is defined as the lowest concentration of antibiotic or extract at which there is no visible growth. The stock solution and the dilutions of antibiotic were prepared as described (Andrews, 2001; EUCAST, 2003). As an internal control, we determined the MIC for chloramphenicol against *E. coli* ATCC 25922; the value obtained was in agreement with the NCCLS standards (NCCLS, 1990).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a regression qualitative model, ANOVA and least differences analysis was carried out with J.M.P. version 5.1: SAS Institute. Inc, 2003.

RESULTS

The chemical composition of EO from tested Nepeta species was determined by GC-MS analysis. Table 1 shows that the EO of each plant species has a specific quantitative and qualitative composition. The major component was nepetalactone (the stereoisomere 4 α - α , 7- α , 7 α - β -nepetalactone and the dihydronepetalactone) which represents about 74% for *N. atlantica*, 82% for both *N. tuberosa* and *N. cataria* but only 42% in *N. granatensis*. This result is comparable to that obtained for others Nepeta species (Ghannadi et al., 2003; Gkinis et al., 2003). Of note *N. atlantica* is characterized by its relatively high β -caryophyllene (8.2%) and farnesol (2.5%) content while *N. granatensis* was relatively rich in other components (eucalyptol 24%, α -pinene 6.3 %, α -phellandrene 5.8%). In addition, *N. cataria* is characterized by its relative content in terpinene (4.2%) and limonene (4.1%).

The screening for antibacterial activity indicates that the oils from *N. atlantica*, *N. tuberosa*, and *N. cataria* present comparable activity against all strains of tested bacteria (MICs ranged from 4.37 to 53.33 $\mu\text{L/mL}$) (Table 2). The oils from *N. granatensis*, was found to possess a relatively low antibacterial activity (MICs ranged from 22.5 to 80 $\mu\text{L/mL}$). For example the MICs of EO from *N. tuberosa*, *N. atlantica*, and *N. cataria* against *S. aureus* (ATCC 25923) were 4.37, 7.50 and 5.00 $\mu\text{L/mL}$ respectively, while the MIC of EO from *N. granatensis* was of 22.50 $\mu\text{L/mL}$ (Table 2).

Of interest, *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922) were more sensitive to the oils of *N. atlantica*, *N. tuberosa*, and *N. cataria* (MICs ranged from 4.37 to 16.25 $\mu\text{L/mL}$). For isolated *E. coli* and *S. aureus* the MICs ranged from 7.96 to 30 $\mu\text{L/mL}$. *S. enteritidis* and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were less sensitive to EO, with MICs below 53.33 $\mu\text{L/mL}$ (Table 2). Interestingly, the oil of *N. granatensis*, which is poor in nepetalactone, has a relatively low antibacterial activity against tested microorganisms (MICs ranged from 22.5 to 80 $\mu\text{L/mL}$).

Table 1. Chemical composition (%) of four oils of *Nepeta* species

Compounds *	<i>N. atlantica</i>	<i>N. tuberosa</i>	<i>N. cataria</i>	<i>N. granatensis</i>
α - pinene	1.1	1.3	0.4	6.3
β - pinene	1.1	0.9	0.9	2.3
camphene	1.1	0.3	0.9	1.1
eucalyptol	1.1	1.2	0.5	24.0
α - phellandrene	1.1	0.6	0.2	5.8
terpinene	1.1	0.9	4.2	0.5
sabinene	0.2	0.6	0.2	0.5
p-Cymene	0.3	0.9	0.2	3.8
limonene	0.2	0.5	4.1	0.3
menthone	0.2	0.4	0.2	0.7
thujone	0.1	0.4	0.4	0.6
borneol	0.1	0.6	0.3	0.6
linalyl acetate	0.5	0.4	0.2	1.4
menthol	0.6	1.6	0.2	0.4
linalool	0.6	0.5	0.4	1.4
pulegone	0.4	0.9	0.2	1.6
thymol	0.8	0.6	1.3	0.9
α -terpineol	0.6	0.5	0.3	0.5
citronellol	0.8	0.6	0.2	0.6
4a- α , 7- α , 7a- β -nepetalactone	71.4	76.8	77.4	39.4
dihydronepetalactone	3.1	5.9	5.0	2.8
methyleugenol	0.9	0.8	0.1	0.9
methyloisoeugenol	0.5	0.6	0.4	0.6
β -caryophyllene	8.2	0.7	0.2	1.5
α - curcumene	1.3	0.7	0.6	0.9
farnesol	2.5	0.8	0.9	0.5

*Compounds are listed in order of their elution from a VB-5 column.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Nepeta* species oils against different bacteria.

Strains	MIC $\pm$ Std Err Means			
	<i>N. tuberosa</i>	<i>N. atlantica</i>	<i>N. cataria</i>	<i>N. granatensis</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6.25 $\pm$ 1.25	13.13 $\pm$ 4.25	16.25 $\pm$ 3.75	35.00 $\pm$ 15.00
<i>E. coli</i>	30.0 $\pm$ 5.77	7.96 $\pm$ 4.07	16.60 $\pm$ 3.33	70.00 $\pm$ 10.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	40.0 $\pm$ 0.00	22.50 $\pm$ 6.29	37.50 $\pm$ 15.47	40.00 $\pm$ 0.00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4.37 $\pm$ 0.62	7.50 $\pm$ 1.44	5.00 $\pm$ 0.00	22.50 $\pm$ 6.29
<i>S. aureus</i>	23.33 $\pm$ 8.81	18.43 $\pm$ 7.92	10.00 $\pm$ 3.53	68.00 $\pm$ 12.00
<i>S. enteritidis</i>	20.00 $\pm$ 0.00	20.00 $\pm$ 0.00	53.33 $\pm$ 13.33	80.00 $\pm$ 0.00

Data represent the MICs (μ L/mL) $\pm$ standard error of the means for 4 experiments.

In summary, our results indicate that *E. coli* and *S. aureus* are more sensitive than *P. aeruginosa* to EO from the *Nepeta* genus ($p < 0.001$).

DISCUSSION

The results suggest that the antibacterial activity of the oils of *Nepeta* species may be related to their major monoterpenoid component *i.e.* nepetalactone, however

this does not exclude the possibility that the other monoterpenes may account for the antibacterial property of the oils. This may be supported at least in part by the differences observed in the sensitivity of tested bacteria to EO from *Nepeta* species that have similar levels of nepetalactone (Table 1). In fact we found that nepetalactone represents 42% and eucalyptol represents 24% of the oil from *N. granatensis* and other reports showed that eucalyptol has antibacterial activity towards *S. aureus*

(Karlović et al., 2000). Thus, one may take into consideration that the antibacterial effect of the oils could result from a synergistic or antagonistic action of different oils components.

The antibacterial effect of the oils could be explained by disturbance of the permeability barrier of the bacterial membrane structure (Cowan, 1999). Indeed, recent findings revealed that tea tree oil damages the cell membrane structure of *E. coli*, *S. aureus* and *Candida albicans* (Cox et al., 2000). Such a phenomenon is due to the penetration of monoterpenes through the cell wall and cell membrane. In fact, monoterpenes are lipophilic, and may induce the expansion of cell membranes, increases fluidity, destroy the membrane structure and inhibit membrane embedded enzymes (Cox et al., 2000; Cox et al., 2001). In the case of *E. coli*, tea tree oil also caused a leakage of cellular potassium and inhibits glucose dependent respiration (Cox et al., 1998). Thus, further investigations should be made to explore the mechanisms of action of the oils of *Nepeta* species showing high activity against bacteria.

In summary, our data indicate that the EO from the *Nepeta* genus efficaciously inhibit *E. coli* and *S. aureus* strains, two resistant microorganisms which make serious sanitary problems worldwide. This indicates that this plant may be useful for developing alternative compounds to treat infections caused by these antibiotic resistant pathogens. As suggested in a recent report (Betoni et al., 2006), these compounds of plant origin may be used together with known drugs in the development of pharmacological agents against pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Région Rabat Salé-Zemour-Zaers, Pôle de compétences PHARCHIM. We thank Dr. MC Brahimi-Horn (CNRS UMR 6543) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Andrews JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1:5-16. Erratum in: *J. Antimicrob. Chemother.* 49:1049.
- Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101:387-390.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
- Cox SD, Gustafson JE, Mann CM, Markham JL, Liew YC, Hartland RP, Bell HC, Warrington JR, Wyllie SG (1998). Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 355-358.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warrington JR, Wyllie SG (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88:170-175.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warrington JR, Wyllie SG (2001). Determination the antimicrobial action of tea tree oil. *Molecules* 6: 87-91.
- Dorman HJ, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- Eloff JN (1998). A sensitive and quick method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta. Med.* 64: 711-713.
- EUCAST (2003). European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1.
- Fennane M, Ibn Tattou M (1998). Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. *Bocconea* 8, Palermo, pp. 102-103.
- Ghannadi A, Aghazari F, Mehrabani M, Mohagheghzadeh A, Mehregan I (2003). Quantity and Composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian J. Pharm. Sci.* 2: 103-105.
- Gkinis G, Tzakou O, Iliopoulou D, Roussis V (2003). Chemical composition and biological activity of *Nepeta parnassica* oils and isolated nepetalactones. *Z. Naturforsch.* 58: 691-696.
- González S, Guerra PE, Bottaro H, Molares S, Demo MS, Oliva MM, Zunino MP, Zygodlo J (2004). Aromatic plants from Patagonia. Part I. Antimicrobial activity and chemical composition of *Schinus molle* (Cav.) Cabrera essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 36-39.
- Karlović Z, Anić I, Miletić I, Prpić-Mehićić G, Pezelj-Ribaric S, Marsan T (2000). Antibacterial activity of halothane, eucalyptol and orange. *Acta. Stomat. Croat.* 34: 307-309.
- NCCLS 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility test for bacteria that grows aerobically- Second edition, approved standard; NCLS Doc M7-A2, Villanova, PA.
- Nostro A, Cannatelli MA, Giuseppe C, Alonzo V (2001). The effect of *Nepeta cataria* extract on adherence an enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18: 583-585.
- Oumzil H, Ghoulami S, Rhajoui M, Idrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* 16: 727-731.
- Oyediji OA, Alolayani J (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Centella asiatica* growing in south Africa. *Pharmaceutical Biol.* 43:249-252.
- Tabanca N, Kirimer N, Demirci F, Baser KHC (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria crista* subsp. *phygia* and enantiomeric distribution of borneol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4300-4303.
- Vardar-Unlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M, Dönmez E, Tepe B (2003). Antibacterial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 63-67.

Full Length Research Paper

Essential oil composition and biomass productivity of Moroccan endemic *Thymus satureioides* Coss. & Ball. growing in the Agoundis Valley

Laila Zenasni¹, Khadija Bakhy², Fatima Gaboun², Rachid Mousadak², Abdelaziz Benjouad^{1,3} and Chaouki Al Faiz^{2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Immunology, Faculty of Sciences, University Mohammed V-Agdal, Rabat, Morocco.

²National Institute of Agronomic Research, Rabat, Morocco.

³International University of Rabat, Morocco.

Accepted 14 March, 2014

Thymus satureioides Coss. & Ball. (*Th. satureioides*) is an endemic thyme of Morocco. Thirty two samples of wild *T. satureioides* were collected from High Atlas Mountains (Valley of Agoundis). The essential oils (EO) isolated by hydrodistillation from the aerial parts were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The yield of EO ranged from 0.2 to 2.3%. Twenty six components, representing more than 95% of the oil, were fully characterized. Borneol was the main constituent. Its proportion varied between 22.7 and 37.5%. Cluster analysis of the identified components grouped the samples into three main chemotypes, borneol/carvacrol (B/Ca), borneol/camphene/carvacrol (B/C/Ca) and borneol/camphene/ α -pinene (B/C/P). Other constituents were identified in significant amounts: α -terpineol (3.1 to 10.6%), 3-carene (1.5 to 10.5%) and *p*-cymene (2.3 to 8%). The fresh matter productivity average of *T. satureioides* was around 1.3 t/ha, revealing low potential of exploitation for collectors. This study has shown that the thyme growing in the valley of Agoundis is dominated by borneol chemotypes, showing different level of essential oil yield, according to locations and/or genotypes within general low potential of biomass production.

Key words: *Thymus satureioides*, Agoundis Valley, matter productivity, GC-MS, essential oil, borneol, carvacrol.

INTRODUCTION

Thymus belongs to the family of Lamiaceae, subfamily Nepetoideae and tribe Mentheae. The number of species within this genus is estimated between 250 and 350 taxa (species and varieties) of wild growing plants (Morales, 2002; Lawrence and Tucker, 2002; Napoli et al., 2010). According to Jalas (1971), *Thymus* is divided into eight

sections over the world. Thyme species are commonly used as herbal tea, flavouring agents (condiment and spice) and medicinal plants (Morales, 2002). The aromatic and medicinal properties of the genus *Thymus* have made it one of the most popular medicinal plants (Nickavar et al., 2005; De Lisi et al., 2011). In traditional

*Corresponding authors. E-mail: faizchawki@yahoo.fr. Tel: 00(212)661972726. Fax: 00(212)537775530.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](#)

medicine, leaves and flowering parts of *Thymus* species are widely used as tonic and herbal tea, antiseptic, antitussive, expectorant and carminative as well as treating colds (Ghasemi, 2009; Rasooli and Mirmostafa, 2002). Thyme oils and in some cases ethnolic extraxt are widely used in pharmaceutical, cosmetic and perfume industry, but also for flavouring and preservation of several food products. Moreover, these species have dermatological benefits against acne and more recently, anti-platelet, antimicrobial, antispasmodic and antioxidant activities have also been demonstrated (Okazaki et al., 2002; Faleiro et al., 2003; Dob et al., 2006; Hazzit et al., 2009; Oh et al., 2009; Dandlen et al., 2010; Meister et al., 1999; Grosso et al., 2010; Giweli et al. 2013).

In Morocco, the *Thymus* species are widely distributed and found in several areas in Morocco (Jahandiez and Maire, 1934; El Habazi et al., 2006). The rate of endemism in the *Thymus* genus is 46.6%, representing 7 species (Fennane et al., 2007). Among these endemic species, *T. satureioides* is the widely natural growing thyme and thus the most exploited, known as the "Moroccan thyme" in worldwide. This is a perennial shrub, locally named "Azukni", in Berber and Zaiitra in Arabic (Bellakhdar, 1997). As for most thyme, this plant possesses culinary, aromatic and especially medicinal uses (Bellakhdar et al., 1991; Bellakhdar, 1997).

The composition of the essential oils (Eos) isolated from aerial parts of *T. satureioides* harvested from different regions of Morocco has been slightly investigated. Analysis of EOs revealed various compositions. However, in most reported papers, only few samples (one-three samples except one) have been investigated and the reported composition could not be considered as representative of the *T. satureioides* growing wild in the very vast regions of the country, estimated to thousands of hectares. Furthermore, the few studies undertaken in the past reported biological activity of the EO and the composition of little number of samples.

A study of one essential oil sample, originated from Beni Mellal region, has shown, respectively 52% of borneol, 3% of carvacrol, 27% of thymol and 0.33% of camphene (Jaafari et al., 2007). This study has also shown an antitumor and cytotoxicity activities. Furthermore, antimicrobial and antioxidant activities of EOs of *T. satureioides* were also investigated by Bouhdid et al. (2006) and Mayaud et al. (2008) in commercial samples from Pronarom (private company) for each, with 26.4 and 27.3% of borneol, respectively. Less antimicrobial effect was also demonstrated on *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus megaterium* using an essential oil sample with 31.2% of borneol and 27.4% of camphene content (Tantaoui-Elaraki et al., 1993). In contrast, two compositions from EOs samples collected from Marrakech region were dominated by borneol/carvacrol which represented 30 and 36%, respectively (Jaafari et al., 2007) and 21 and 27%,

respectively (El Bouzidi et al., 2013).

Chemical variability of *T. satureioides* has been partly investigated by Benjilali et al. (1987a, b), who particularly studied different samples (32 samples) from two localities in Morocco: Western and Eastern region of High Atlas (HA) and the Rich region. These authors have reported two types of composition: the first is the most dominant, with borneol which content ranged between 26 to 78%, while the second showed important content of phenols: carvacrol or thymol (35 to 50%). Most studies undertaken on *T. satureioides* reported the presence at different proportion, of borneol or borneol/carvacrol or phenols (carvacrol and thymol) as shown in Table 1. Except Benjilali et al. (1987a, b), all the studies conducted have been realized on one sample, without any indication on the potential production of biomass.

In general, the exploitation of *T. satureioides* is realized by local population in the natural growing areas of the species. Collectors, generally women and children, start harvesting plants from May to July. There is no data on the available biomass nor the annual harvested quantities. The Agoundis Valley is considered as one of the richest region where *T. satureioides* is widely grown and where it is planned to develop with local population in a sustainable way to exploit thyme in the long term. The aim of the present work is to characterize the chemical composition of *T. satureioides* growing in this valley and the production capacity in term of exploitable biomass.

MATERIALS AND METHODES

Plant

Aerial parts 32 samples of *T. satureioides* Coss. & Ball, were collected at bloom stage on June and July, 2008, from 7 stations in the Agoundis Valley (Figure 1). The geographic coordinates (elevation, latitude and longitude) of each sample were recorded using a global positioning system (GPS) receiver (Table 2). Specimens of plants were taxonomically identified by Pr. Mohamed Ibn Tatou (Scientific Institute of Rabat, Department of Biology). Voucher specimens from each locality were kept at the Herbarium of National Institute of Agricultural Research (INRA, Rabat) and that of the Scientific Institute, under the index number RAB76330. The biomass was estimated using the method of squares. It consists of taking from a unit of space from 2 to 16 m², according to the visual estimation of plant density. Moreso the plant density was high and the surface of squares was small. The vegetative stage was noted and the biomass was determined by direct weighing of harvested plants from each square. A sample from each location was taken for hydrodistillation to determine the quantitative and qualitative extracted essential oil.

Essential oil extraction

Depending on the amount of the plant material available, the air-dried parts of the plants were cut into small pieces and submitted to hydro-distillation in a Clevenger-type apparatus from 2 to 3 h. The essential oil was then stored at +4°C in the dark until analysis. The essential oil yields were calculated from dry matter (weight of oil/w eight of dry plant).

Table 1. Mains compounds (%) of *T. satureioides* essential oil reported in almost papers.

Sample origin	Number of sample studied	Composition (%)					References
		Borneol	Camphene	α -Pinene	Thymol	Carvacrol	
Imintanout	1	31.2	27.4	17.5	-	0.2	Tantaoui-Elaraki et al. (1993)
High Atlas and Rich	32	13 - 77.6	0.1 - 11.2	0.1-5.6	0 - 21.3	0.5 - 49.5	Benjilali et al. (1987a)
PRANAROM*	1	26.4	-	-	11.48	8.76	Bouhdid et al. (2006)
Asni moulay Brahim-Marrakech	1	30.03	0.58	-	0.94	35.9	Jaafari et al. (2007)
Bin Elwidane-Beni-Mellal	1	51.98	0.33	-	26.81	2.83	Jaafari et al. (2007)
Tiznit	1	59.37	2.44	-	0.78	1.24	Jaafari et al. (2007)
Pranarom*	1	27.31	-	-	13.54	2.21	Mayaud et al. (2008)
Unknown	1	29.5	-	-	-	9.1	Ichrak et al. (2011)
Idni (Haut Atlas)	1	21.1	8	4.6	1.2	26.5	El Bouzidi et al. (2013)

*Private International society.

Table 2. Collection data and productivities (biomass and EO yield) of *T. satureioides*.

Stations	Locations	Sample Code	GPS data			Biomass g/m ²	EO (%)	Borneol	Carvacrol	Camphene	α -Pinene	α -Terpineol	p.Cymene	3-Carene	Linalool
			Longitude	Latitude	Altitude (m)										
1	Taghbart	1	N32°59'18"	W008°09'523"	1300	-	1.24	31.2	16.5	4.3	2.1	5	4.2	6.4	8
		30	N30°58'337"	W008°07'653"	1288	487.5	0.72	-	-	-	-	-	-	-	-
		8	N30°58'724"	W008°08'141"	1289	220.5	1.05	32.8	10.2	10.3	6.3	5	7.4	5.7	6
2	makhzen	2	N30°57'766"	W008°06'003"	1542	182.4	1.02	34.6	15.2	10.4	5.8	4.4	7.1	4.3	7.4
		3	N30°57'761"	W008°06'013"	1526	61.1	1.04	33.1	13.8	11.1	6	5	5.5	3.3	7.5
		4	N30°57'646"	W008°06'494"	1577	49.6	1.59	30.7	11.2	12.8	6.6	6.8	4.4	2.7	6.5
3	Makhzen to Ounain	5	N30°57'355"	W008°07'004"	1766	202.1	0.65	33.5	21.2	9.1	5	3.3	4.3	4.3	5.9
		6	N30°57'288"	W008°06'955"	1839	115.4	-	24.7	1.8	19.3	11.6	4.2	6.7	6.8	4.9
		18	N30°58'798"	W008°09'568"	1457	96.3	0.48	32.8	11.7	12.7	7.6	4.9	5	3.6	3.9
		19	N30°58'760"	W008°09'519"	1515	50	0.98	24.3	4.2	21	12.2	4.3	7.7	3.8	3.8
		20	N30°58'730"	W008°09'470"	1549	55	0.67	37.5	10.5	13	7.7	6.4	5.9	2.6	4.4
		21	N30°58'576"	W008°09'294"	1648	50	0.44	30.8	7.6	16.6	8.7	5.9	5.9	2.6	7.4
		22	N30°58'347"	W008°09'235"	1695	110	0.78	36.6	12.2	9.4	5.2	9.3	5.1	2.8	4.5
		23	N30°58'292"	W008°09'192"	1713	120	0.2	27.1	2.6	20.7	12	4.3	8	3.8	5.7
		31	N30°58'240"	W008°09'343"	1801	25	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
		24	N30°58'302"	W008°09'368"	1791	42.5	0.37	28.3	2.6	17	10.1	5.3	4	1.9	7
4	Wijdane	7	N30°56'389"	W008°07'526"	2181	518.4	1.47	25.4	9.5	12.6	6.6	8.2	2.3	3.1	4.3

Table 2. Contd.

5	Majjou	25	N30°58'469"	W008°09'437"	1742	100	0.66	29.6	4.6	17.6	9.7	9.5	5.4	2.9	3.9	
		26	N30°56'204"	W008°07'517"	2162	61.3	0.7	30.1	3	19.5	10.4	9.1	4.8	1.5	6.5	
		27	N30°56'170"	W008°07'709"	2146	37.5	0.86	24.3	3.4	19.7	10.7	8.1	7.1	2.9	7.6	
		9	N30°56'124"	W008°04'827"	1718	55.6	0.97	26	7.5	15.6	8.7	4.8	7.6	5.4	4.6	
		10	N30°56'416"	W008°03'846"	1882	20	1.67	28	15.6	7.2	4.5	3.2	6.9	10.5	5.6	
		11	N30°57'057"	W008°56'800"	1643	144.4	0.38	30.2	7.8	14.5	8.8	8.3	4.9	3.6	4.6	
		14	N30°55'132"	W008°06'744"	2013	62.5	1.47	26.9	9.6	12.37	7.02	10.6	3.4	5	6.7	
	6	Tanda n'Izm	12	N30°57'817"	W008°05'614"	1496	-	0.85	28.7	10.7	12.2	7.4	3.9	7.3	7.6	5.9
			13	N30°56'193"	W00807'701"	2146	62.5	1.4	27	8.8	13.9	7.7	9.2	4.5	5	5.8
			32	N30°55'373"	W008°06'031"	2097	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			15	N30°56'054"	W008°07'005"	1964	250	2.29	25.3	11.8	12.7	7.5	5.6	6.4	10.1	4
			16	N30°56'129"	W008°06'662"	1942	225	0.9	34.5	13.4	12	6.2	7.3	4.3	3.7	4.5
			17	N30°58'599"	W008°05'727"	1528	125	0.81	22.7	20.7	7.2	4.1	5	7.6	-	5.8
7	Tijghicht	28	N30°58'297"	W008°05'895"	1485	-	-	26.1	10.8	14.9	8.4	5.5	7.8	3.2	6.6	
8	CADEFA*	29	-	-	-	-	36	9.9	10.3	5.4	9.9	3.5	1.8	7.6		

*CADEFA: Cooperative of Agoundis for Development Forestry and agriculture.

GC-MS analysis

GC-MS analysis of the essential oil was performed on a TRACE GC ULTRA equipped with non-polar VB5 (5% phenyl; 95% methylpolysiloxane) capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness), directly coupled to a mass spectrometer (Polaris Q) (EI 70 eV). The temperature of the injector and detector was set at 250 and 300°C, respectively. The oven temperature was programmed from 60 to 200°C at 2°C/min, and then from 200 to 300°C at 20°C/min. Carrier gas was Helium (He) with a flow rate of 1 ml/min. The components of the oil were identified by comparison of their mass spectra with those in the Wiley-NIST 7th edition library of mass spectral data. The percentage composition of the oil sample was calculated from GC-MS peak areas.

Statistical analysis

Samples 30, 31 and 32 are excluded from statistical

analysis due to the absence of the chemical analysis data. All data were collected and statistically analysed using the XLSTAT software package trial version in order to determine the relationship between the different samples of thyme using the percentage composition of their essential oils. Euclidean distance was selected as a measure of similarity and the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average (UPGMA) was used for cluster analysis. These analyses will aim to identify groups and possibly recognize chemotypes.

RESULTS

EO yield and vegetal matter productivity

EO yield ranged from 0.20 to 2.29% (Table 2). The highest yield (2.29%) was found in Tnada N'Isn region (altitude 1964 m). Lowest levels are

found in station 3, ranging from 0.2 to 1.59% (Table 2), while high values ($\geq 1\%$) have been recorded in different locations (samples: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 13, 14 and 15). In Makhzen location, all samples showed similar yields, ranging from 1.02 to 1.04%. In general, the essential oil yield in the valley could be considered as 1%, except some area (Makhzen to Ounain) (Table 3). The biomass ranged from 20 to 518.4 g/m² of green matter.

Wijdane, Taghbart and Tnada N'Isn was the region where the most high biomass average values were recorded, while in the Makhzen to Ounain and Majjou locations we obtain the lowest yield (Table 3).

The highest average value was recorded in Taghbart (354 g/m² ± 133.5). The lowest value was noted in Majjou with an average 70.63 g/m² ± 26.3.

Table 3. Average of essential oil yield, biomass and borneol content production by region in the Agoundis Valley.

Locations	EO (%)	Biomass (g/m ²)	Borneol content (%)
Taghbart	1.00±0.15	354.0±133.50	31.20±0.80
Makhzen	1.03±0.01	121.75±60.65	33.85±0.75
Makhzen to Ounanin	0.70±0.12	83.26±15.55	30.63±1.45
Wijdane	0.92±0.19	179.30±113.80	27.35±1.46
Majjou	1.13±0.29	70.63±26.30	27.78±0.91
Tanda n'lzm	1.25±0.28	157.50±34.82	27.64±1.98

*Mean ± Standard error of mean (stderr).

Table 4. Chemical composition of EO extracted from 29 samples of *Th. satureioides* growing in the Agoundis Valley.

Compounds ^{a)}	Mean ^{b)}	SD ^{c)}	Min ^{d)}	Max ^{e)}
α -Thujene	1.18	0.18	0.93	1.54
α -Pinene	7.58	2.47	2.04	12.15
Camphene	13.44	4.25	4.34	21.01
Sabinene	1.94	0.52	1.14	3.06
β -Pinene	2.46	0.14	2.34	2.61
Myrcene	1.29	0.00	1.29	1.29
Geraniol formate	1.19	0.21	0.83	1.62
α -Terpinene	1.37	0.19	1.18	1.63
<i>p</i> -Cymene	5.69	1.58	2.25	8.00
Limonene	1.55	0.51	1.03	3.59
3-Carene	4.31	2.26	1.45	10.51
Linalool	5.78	1.28	3.89	7.91
Camphor	2.85	1.02	2.12	4.33
Borneol	29.61	4.10	22.67	37.47
Terpinen-4-ol	2.72	0.41	1.88	3.44
α -terpineol	7.00	2.18	3.13	10.56
<i>trans</i> -Dihydrocarvone	1.21	0.00	1.21	1.21
<i>cis</i> -Dihydrocarvone	4.30	0.00	4.30	4.30
Thymol methyl ether	2.41	1.23	1.05	4.81
Isobornyl formate	4.05	0.81	3.47	4.62
Bornyl acetate	3.15	1.44	1.23	7.09
Thymol	2.84	1.37	1.14	5.31
Carvacrol	9.83	5.16	1.76	21.21
<i>trans</i> -Caryophyllene	3.90	1.24	2.03	7.02
Caryophyllene oxide	1.44	0.00	1.44	1.44
α -farnesene	2.22	0.00	2.22	2.22

a) Compounds are listed in order of their elution from a VB-5 column; b) Mean: Mean value; c) SD: Standard deviation; d) Min: Low est content; e) Max: Highest content.

Chemical composition

Twenty six components representing more than 95% of the total detected constituents were identified. The predominant compound was borneol, ranging between

22.67 and 37.47%. Other constituents were identified with significant amounts, such as camphene which varied from 4.34 to 21.01%, followed by carvacrol 1.76 and 21.21%. α -Pinene ranged between 2.04 to 12.15%, α -terpineol between 3.13 to 10.56%, 3-carene between 1.45 to 10.51% and *p*-cymene between 2.25 to 8%. The average, minimal and maximal compound's proportions of the EOs are summarised in Table 4.

Cluster analysis of the identified components grouped the samples into three main chemotypes: borneol/carvacrol (B/Ca), borneol/camphene/carvacrol (B/C/Ca), borneol/camphene/ α -pinene (B/C/P) (Figure 3). Borneol was by far the common major compound in all the three classes. The first class B/Ca (samples: 1, 5, 10, 12, 15 and 17) was characterized by carvacrol with a significant content (10.43 to 21.21%). On the other hand, camphene and α -pinene presented less significant proportions than carvacrol, with average 8.78% for camphene and 5.09% for α -pinene. The second group - B/C/Ca (samples: 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 28 and 29) has camphene and carvacrol as main compounds after borneol with significant amount varying between 9.39 to 16.21% for camphene and from 7.36 to 15.2% for carvacrol. α -Pinene in this class presented less proportions with an average of 7.15%. The last chemotype - B/C/P (Samples: 6, 19, 23, 24, 25, 26, and 27) was characterized by camphene and α -pinene as major compounds after borneol: 10.28 to 21.01% and 5.35 to 12%, respectively. Carvacrol was present but in very less amount, with average 3.86%.

DISCUSSION

The essential oil yields of the aerial parts of *T. satureioides* varied from 0.20 to 2.29%. This value is similar to that reported previously (Jamali et al., 2012; El Bouzidi et al., 2013). Generally, in the Valley Agoundis, yield of essential oil could be considered as 1%, except areas (Makhzen to Ounain, Table 3) where plants are very old due to the difficult conditions for regeneration (more drought). There is a slight relation between the altitude and the EO yield, as shown in Figure 2B. But

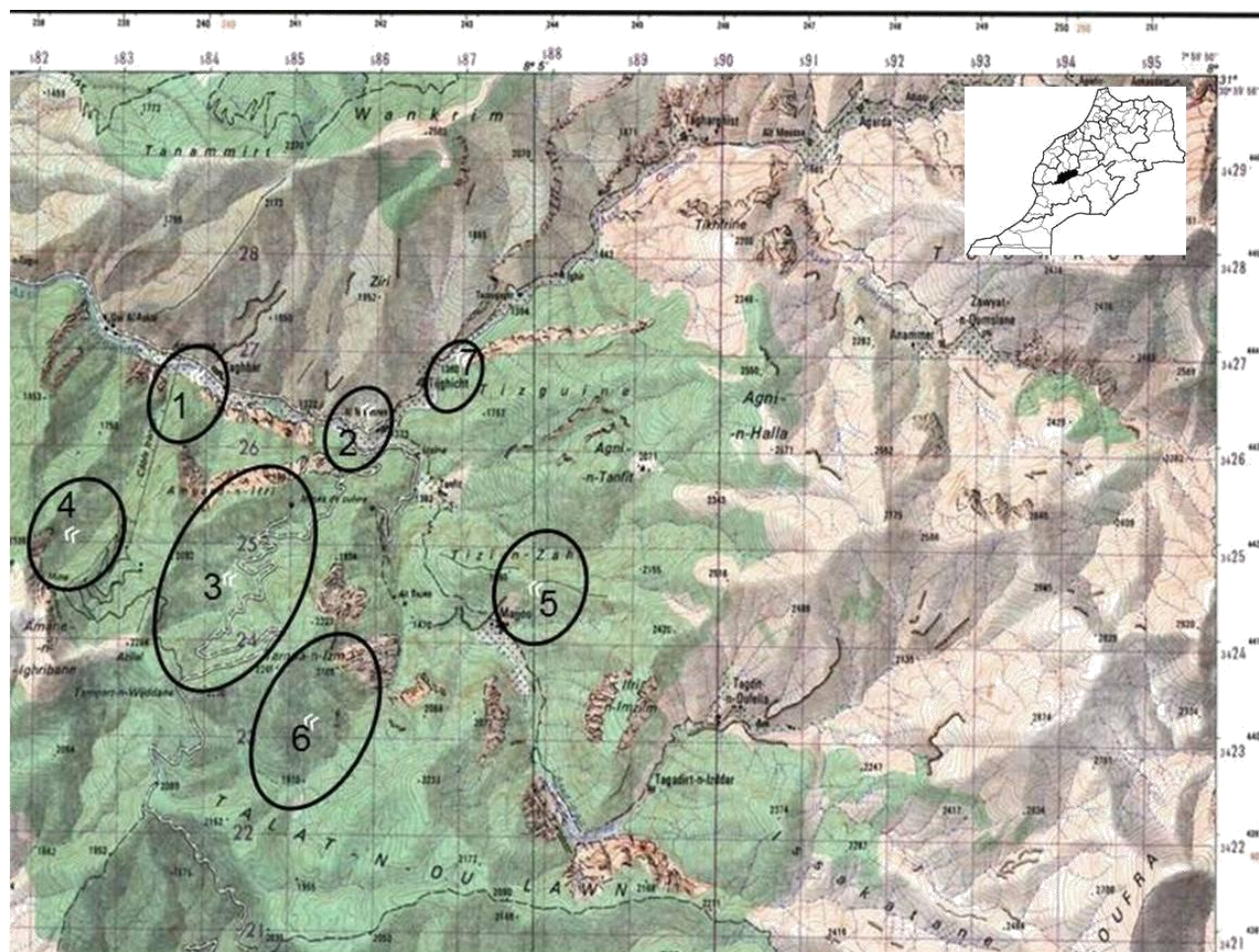


Figure 1. Investigated stations of *Th. satureioides*.

Figure 1. Investigated stations of *Th. satureioides*.

according to the observed results in different locations, other factors could explain the variability concerning EO production, among which genetic variation or environment effect (soil fertility, exposition, etc.) have an important role. This result is in contrast with that reported by Vokou et al. (1993), where evidence concerning the increase of EO with altitude was demonstrated. In our case, the valley is already situated in high altitude.

Concerning the biomass productivity, the regions Taghbart, Wijdane and Tanda n'Izm are characterized by favorable vegetative production (deep soils and good exposition to the north side) while in the regions Makhzen, Majjou and Makhzen to Ounanin, soils are generally more shallow and frequently exposed to South side, making the environment conditions much drier. There is however no relation with altitude and biomass production (Figure 2A). Other factors could explain the important variation of biomass. Local population starts cutting thyme from May to July, without any consideration to the survival of the species. In most case we observed that the plants are very old and plant regeneration from

seed is compromised, since no plants are kept in the field to set seeds for regenerating new seed stock.

The borneol content in most samples are less dosed than those reported in other regions of Morocco by Benjilali et al. (1987a, b), which reached in some cases, 77.6% of borneol. The samples combining borneol and carvacrol in balanced proportion are also interesting, such as the sample number 5, collected in Makhzen station, where borneol is 33.5% and carvacrol is 21.2%. Two authors have found the co-dominance of borneol and carvacrol (Jaafari et al., 2007) (30.03 and 35.9%) and El Bouzidi et al. (2013) (21.1 and 26.5%), respectively. Borneol was by far the major constituent of all samples, indicating the absence of any chemical polymorphism in the Agoundis Valley. The three classes observed showed however some variation, mainly in carvacrol, camphene and α -pinene. The dominance of borneol in the essential oils at reasonable part (30%) confers to *T. satureioides* collected from the Agoundis Valley, a good economic value. However, local population should take care on its use, both for medicine

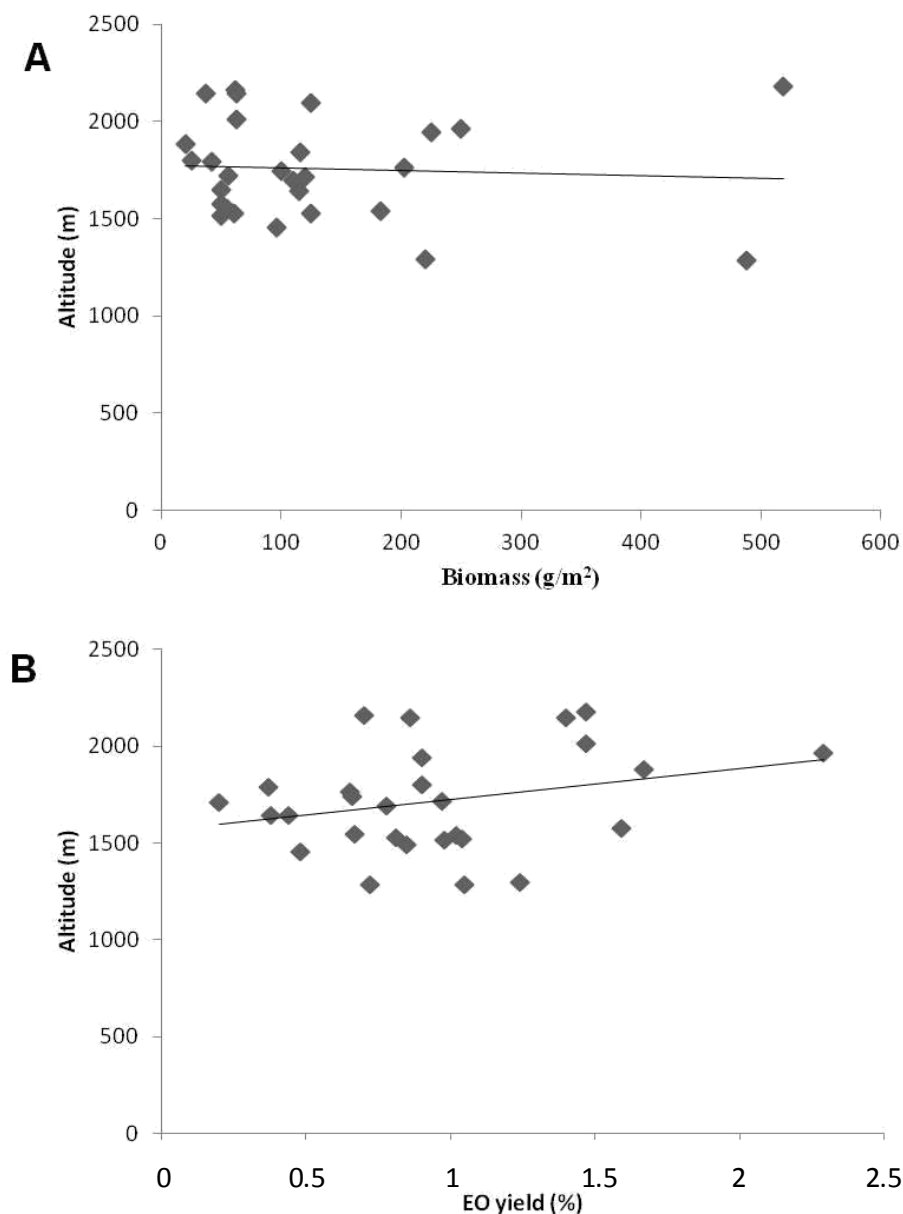


Figure 2. Variation of *Th. satureioides* biomass production (A) and EO yield (B) with the altitude.

use and flavouring foods, due to the presence of borneol and camphene recognized as having harmful effects due to exposure or consumption.

Conclusion

Local population starts cutting thyme from May to July, without any consideration to the survival of the species. In order to improve this situation, some recommendations have been made to the local population organized under

the cooperative of medicinal and aromatic plant exploitation. These recommendations include both some good practices for *T. satureioides* harvesting and sustainable way for medicinal and aromatic plant in general. Emphasis is put on the following actions: Avoid cutting thymus from the same place each year. That means exploited fields should be as bi-annual rotation, the rest area has to be respected as it is the case for pasture grazing. This is important to give more chance to the plants to regenerate from seeds or to increase ramifications of old plants.

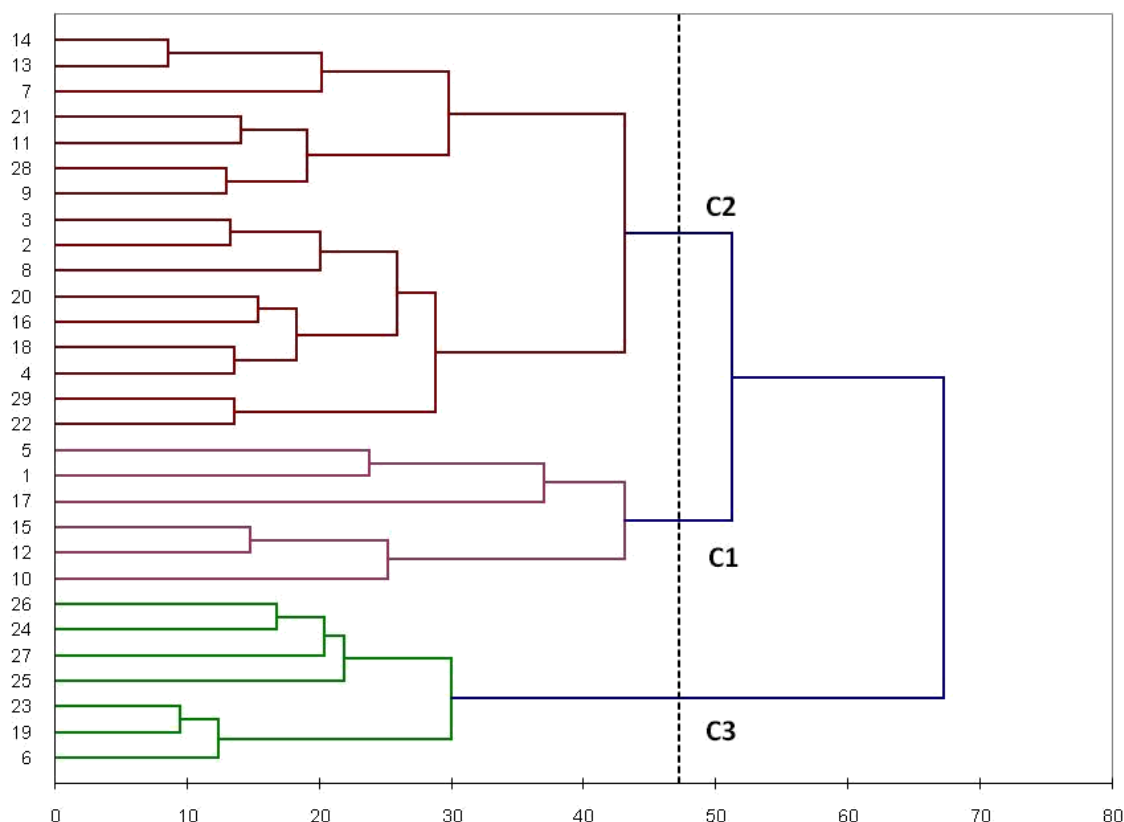


Figure 3. Dendrogram obtained by cluster analysis of the percentage composition of EOs.
Figure 3. Dendrogram obtained by cluster analysis of the percentage composition of EOs.

In the exploited area, collectors should let some plants to set seeds so the seed bank in the soil is constituted. It is also deeply recommended to avoid cutting the very young plants, which are having superficial roots and few ramifications. In the rest area, it is important to install hives of bees, to improve cross pollination and therefore seed production. Finally, it is also recommended to replant thyme in the degraded areas, by sowing seeds collected from some selected plants and grown in the nurseries during the first weeks after autumn.

Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a financial support from the GIZ. We are very grateful to Pr. Mohamed Ibn Tatou (Scientific Institute of Rabat, Department of Biology) for the botanical identification of the *T. satureioides*. Our thanks are due to the members of the association CADEFA for their help during the sampling and the

HCEFLCD services for their collaboration.

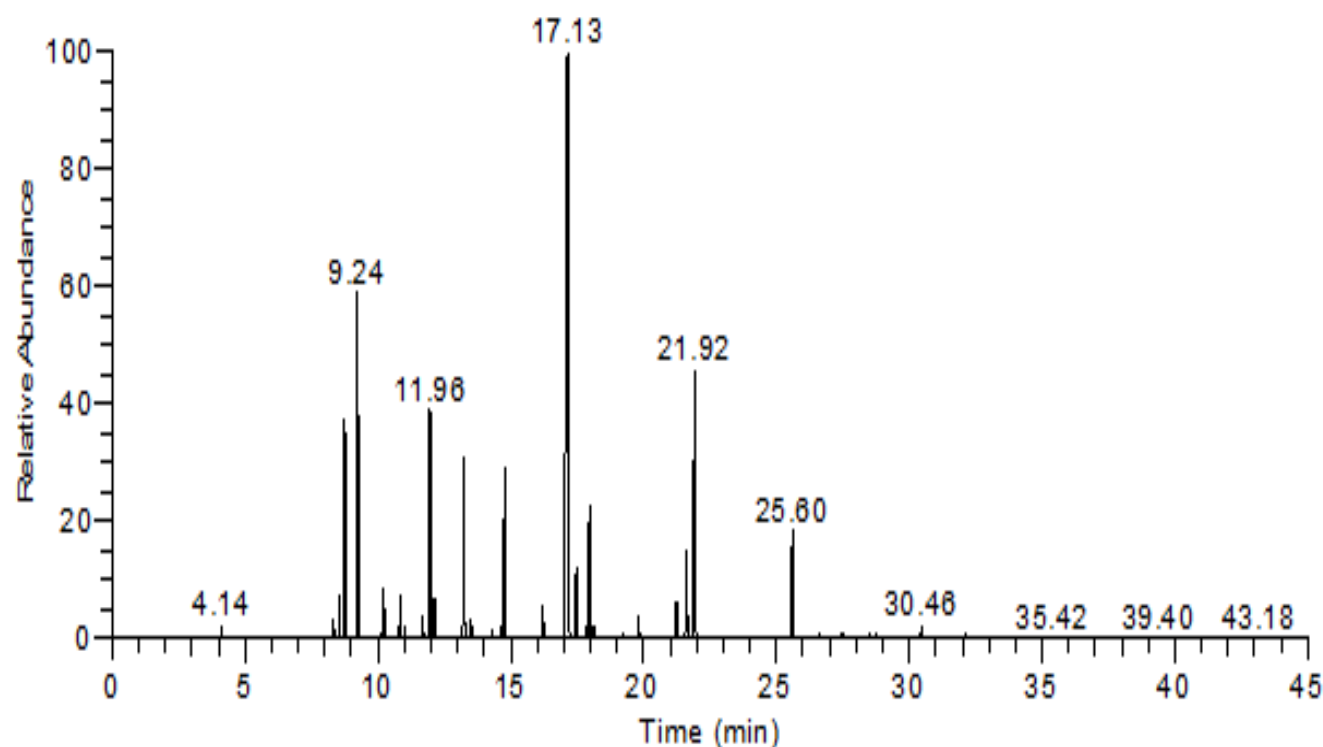
REFERENCES

- Bellakhdar J (1997). Traditional Moroccan pharmacopoeia. Ancient Arabic medicine and popular knowledge, Ibis Press. Paris pp. 358-359.
- Bellakhdar J, Claiss R, Fleurentin J, Younos C (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. J. Ethnopharmacol. 35:123-143.
- Benjilali B, Hammoumi M, M'Hamedi A, Richard H (1987b). Chemical polymorphism of thyme essential oils of Morocco. II. Principal component analysis (PCA). Food Sci. 7:275-299.
- Benjilali B, Hammoumi M, Richard H (1987a). Chemical polymorphism of thyme essential oils of Morocco. I. Characterization of components. Food Sci. 7:77-91.
- Bouhdid B, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Skali NS, Abrini A (2006). *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Int. Congr. Biochem. Agadir, Morocco, 09-12 May. 324-327.
- Dandlen SA, Lima AS, Mendes MD, Miguel MG, Faleiro ML, Sousa MJ, Pedro LG Barroso JG, Figueiredo AC (2010). Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. Flavour Frag. J. 25:150-155.
- De Lisi A, Tedone L, Montesano V, Sarli G, Negro D (2011). Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. Food Chem. 125:1284-1286.
- Dob T, Dahmane D, Benabdellkader T, Chelghoum C (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. Int. J. Aromather. 16:95-100.

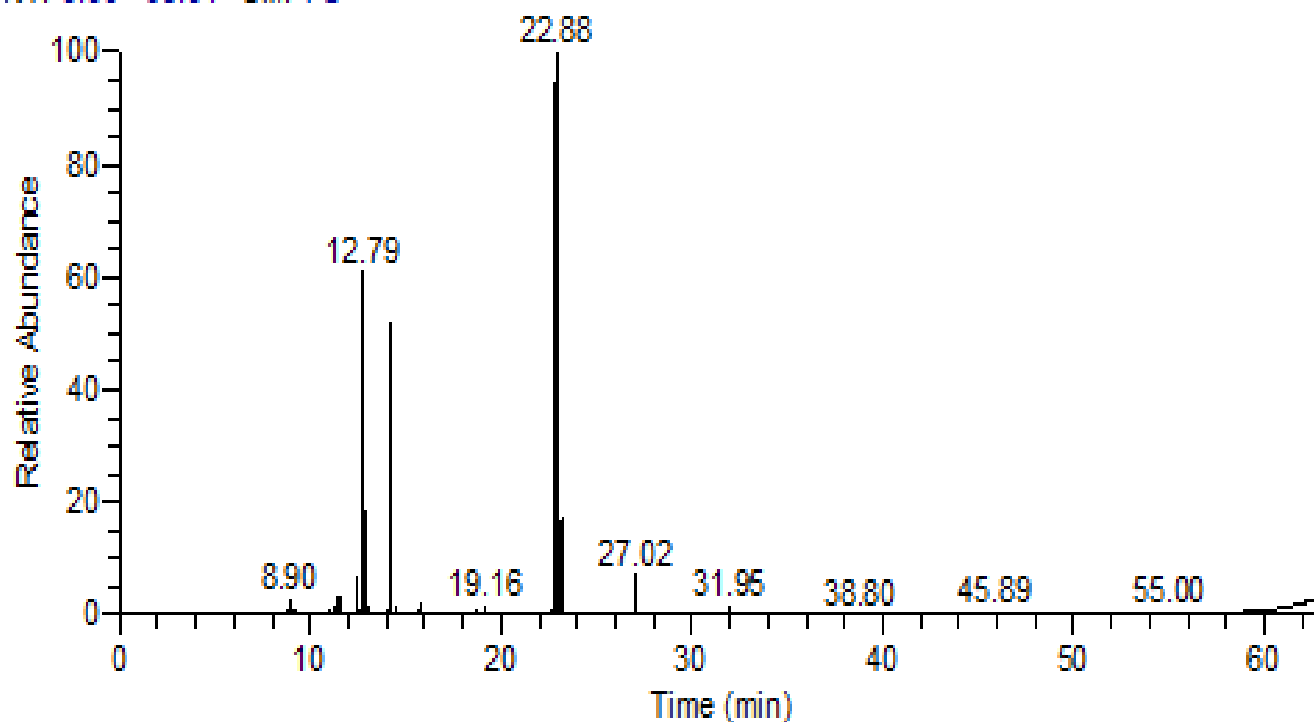
- El Bouzidi L, Alaoui Jamali C, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind. Crop. Prod.* 43:450-456.
- El Habazi K, Aboufatima R, Benharref A, Ziad A, Chait A, Dalal A (2006). Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 107:406-411.
- Faleiro ML, Miguel MG, Ladeiro F, Venâncio F, Tavares R, Brito JC, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:35-40.
- Fennane M, Ibn Tattou M, J Mathez, Ouyahya A, El Oualidi J (2007). Flora practice of Morocco, Vol. 2 Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae). *Trav. Ins. Sci. Ser. Bot.*, N° 38. Scientific Institute, Rabat, Morocco. pp. 477-482.
- Ghasemi PA (2009). "Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts. Iran". *Herba Polon.* 55:69-75.
- Gweli AA, Džamić AM, Soković M, Ristić MS, Marin PD (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *CEJB.* 8:504-511.
- Grosso C, Figueiredo AC, Burillo J, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AMF (2010). Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *J. Sep. Sci.* 33:2211-2218.
- Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* 116:714-721.
- Ichrak G, Rim B, Loubna AS, Khalid O, Abderrahmane R, Said el M (2011). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oils from *Thymus satureioides* and *Thymus pallidus*. *Nat. Prod. Commun.* 6(10):1507-1510.
- Jaafari A, Ait Mouse H, Rakib E, Ait Mbarek L, Tilaoui M, Benbakhta C, Boulli A, Abbad, A, Ziad A (2007). Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Braz. J. Pharmacogn.* 17 (4):477-491.
- Jahandiez E, Maire R (1934). Catalog of Moroccan Flora. *Minerva.* p. 653.
- Jalas J (1971). Notes on *Thymus* L. (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.* 64:199-215.
- Jamali CA, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A (2012). Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem. Biodivers.* 9(6):1188-1189.
- Lawrence BM, Tucker AO (2002). The genus *Thymus* as a source of commercial products. In: *Thyme. The genus Thymus.* E. Stahl-Bishop and F. Sáez, ed. Taylor and Francis, London and New York. pp. 252- 262.
- Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(3):167-73.
- Meister A, Bernhardt G, Christoffel V, Buschauer A (1999). Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.* 65:512-516.
- Morales R, (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme. The genus Thymus.* E. Stahl-Bishop and F. Sáez, ed. Taylor and Francis, London and New York. pp 1-43.
- Napoli EM, Curcuruto G, Ruberto G (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochem. Sys. Ecol.* 38:816- 822.
- Nickavar B, Mojab F, Dolat-Abadi R (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chem.* 90:609-611.
- Oh TH, Kim SS, Yoon WJ, Kim JY, Yang EJ, Lee NH, Hyun CG (2009). Chemical composition and biological activities of Jeju *Thymus quinquecostatus* essential oils against *Propionibacterium* species inducing acne. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55(1):63-68.
- Okazaki K, Kawazoe K, Takaishi Y (2002). Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytother. Res.* 16(4):398-399.
- Rasooli I, Mirmostafa SA (2002). Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* 73:244- 250.
- Tantaoui-Elaraki A, Lattaoui N, Errifi A, Benjilali B (1993). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus broussonetii*, *Thymus zygis* and *Thymus satureioides*. *J. Essent. Oil Res.* 5:45-53.
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1993). Geographic variation of greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.* 21(2):287-295.

Chromatogramme d'huile essentielle de *Thymus satureioides* Coss.

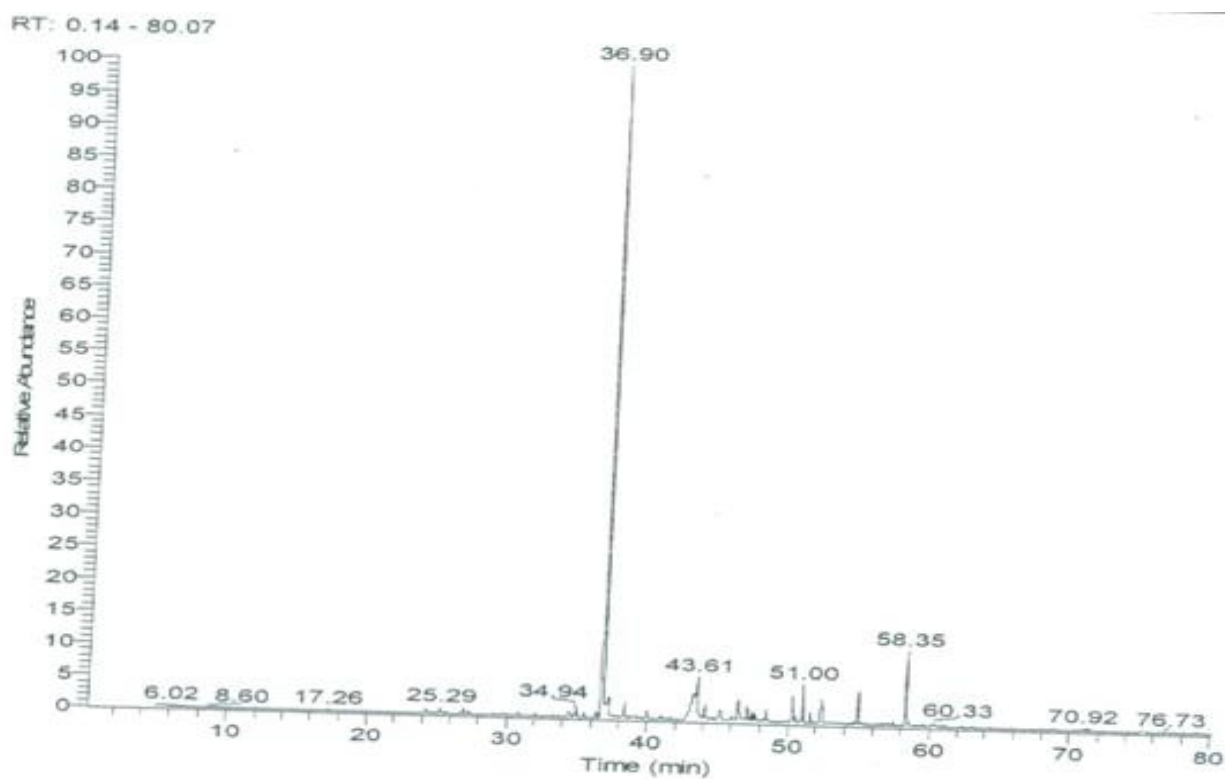
RT: 0.00 - 45.03 SM: 7G

**Chromatogramme d'huile essentielle d'*Origanum compactum* Benth.**

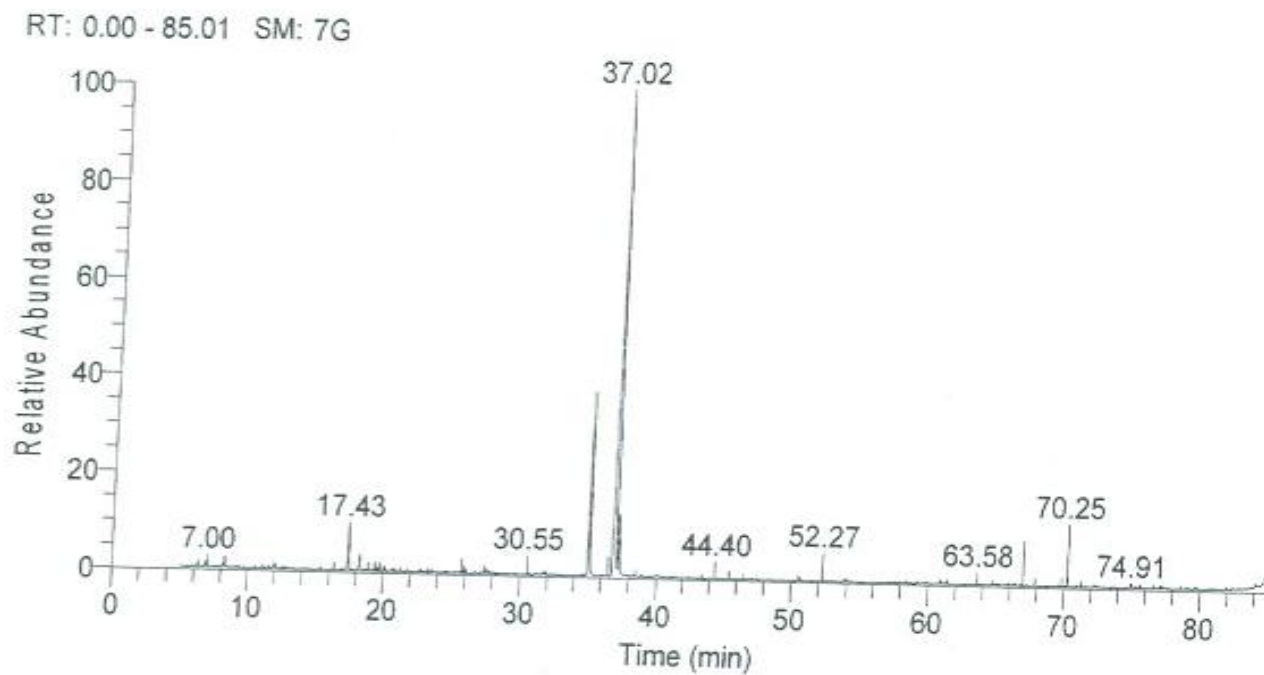
RT: 0.00 - 63.01 SM: 7G



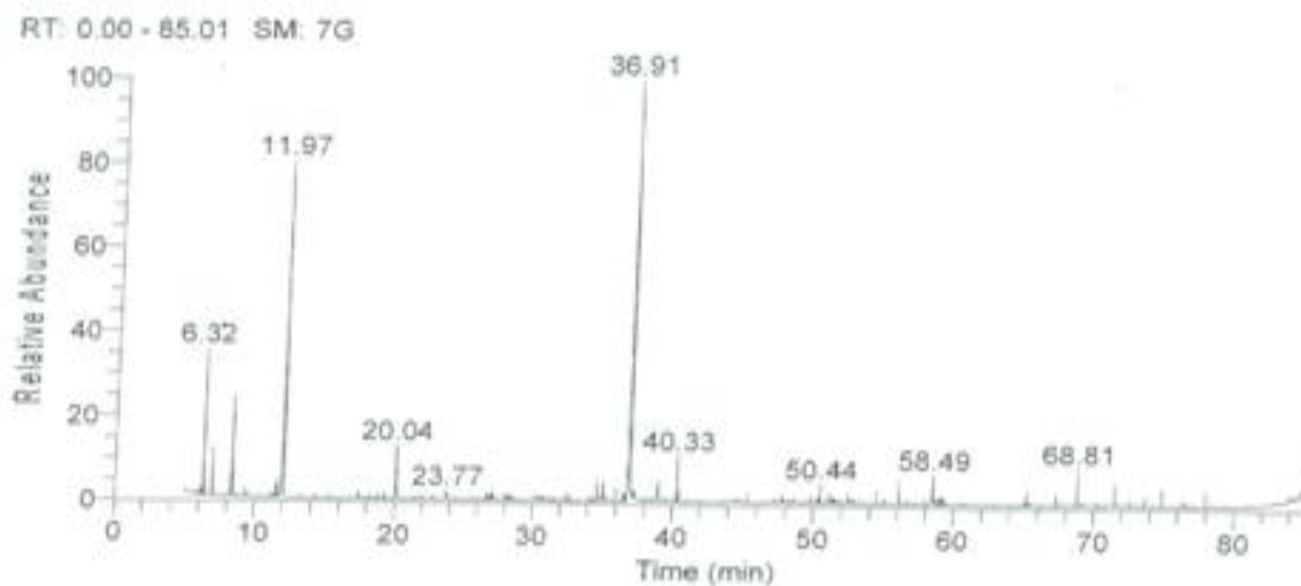
Chromatogramme d'huile essentielle de *Nepeta atlantica* Ball.



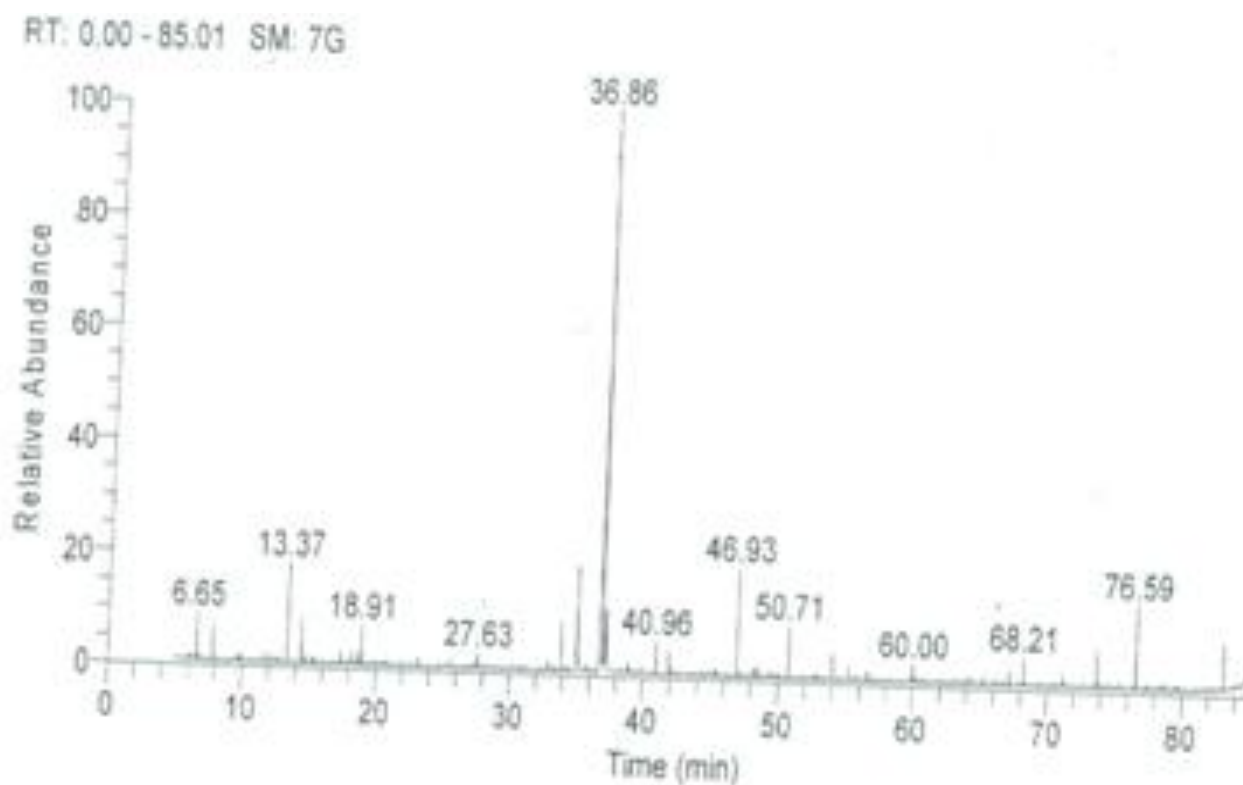
Chromatogramme d'huile essentielle *Nepeta cataria* L.



Chromatogramme d'huile essentielle de *Nepeta granatensis* Boiss



Chromatogramme d'huile essentielle de *Nepeta tuberosa* L. ssp. *Reticulata* (Desf.) Marie.



Résumé

Afin d'enrichir et de valoriser le catalogue de la flore marocaine, nous nous sommes fixés comme objectif, dans une première étude, la caractérisation chimique de 29 huiles essentielles (HE) de *Thymus satureioides* Coss (endémique du Maroc), ainsi que l'étude de sa productivité en biomasse et en HE en fonction de l'altitude dans la vallée de l'Agoundis. Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés à la variabilité de la composition de 9 HE d'*Origanum compactum* Benth (endémique du Maroc et de la Péninsule Ibérique). Concernant le troisième volet, nous l'avons consacré à l'analyse de la composition chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des HE du genre *Nepeta*: Les résultats obtenus ont montré que:

- **Pour *Thymus satureioides* Coss:**
 - Il n'existe pas de relation entre l'altitude et la production de la biomasse.
 - L'altitude explique faiblement la variation du rendement en HE.
 - Le composé prépondérant dans les HE est le bornéol, ce qui confère au *T. satureioides* de l'Agoundis l'appellation: chémotype à bornéol.
- **Pour *Origanum compactum* Benth:** Les constituants majeurs sont: le carvacrol, thymol, p-cymène et γ -terpinène.
- **Pour les espèces du genre *Nepeta* (*N. atlantica* Ball., *N. tuberosa* L., *N. cataria* L. et *N. granatensis* Boiss):** Le nepetalactone est le constituant majoritaire des HE, ainsi le screening de l'activité antibactérienne indique que les HE de *N. atlantica*, *N. tuberosa*, et *N. cataria* inhibent *E. coli* et *S. aureus*. En outre *N. atlantica* (endémique du Maroc) a montré un pouvoir antibactérien contre *P. aeruginosa* caractérisée par sa tolérance aux HE.

Ces résultats permettent d'entrevoir la valorisation des HE des plantes étudiées de point de vue production et commercialisation en vue d'utilisations pharmaceutiques, agricoles et industrielles.

Mots-clefs: *Thymus satureioides* Coss, *Origanum compactum* Benth, *Nepeta*, production en biomasse, huiles essentielles, polymorphisme chimique, activité antibactérienne.

Abstract

In the aim to enrich and enhance the Moroccan flora catalog, three axis of research were conducted in our laboratory : 1) the chemical characterization of 29 *Thymus satureioides* Coss essentials oils (EO) (endemic of Morocco) and evaluation of biomass and essential oil productivity depending on the altitude in the Agoundis Valley. 2) the composition variability of 9 EO of *Origanum compactum* Benth (endemic to Morocco and the Iberian Peninsula) and 3) the analysis of chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of the genus *Nepeta* against different bacterial strains. Our results showed that:

Regarding the third part, we devoted to the analysis of the chemical composition and evaluation of antibacterial activity of essential oils of the genus *Nepeta*

- ***Thymus satureioides* Coss:**
 - There is no relationship between the altitude and the biomass production.
 - The altitude explains fairly the EO yield variation.
 - The thymus is a borneol chemotype due to its main compound the borneol.
- ***Origanum compactum* Benth:** The main compounds were: le carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene.
- **Species of genus *Nepeta*** (*N. atlantica* Ball., *N. tuberosa* L., *N. cataria* L. et *N. granatensis* Boiss): Nepetalactone was the main compound of *Nepeta* EO, the screening and antibacterial activity of different HE from *N. atlantica*, *N. tuberosa*, and *N. cataria* inhibited the pathogenic bacteria like *E. coli* and *S. aureus* strains. Furthermore, *N. atlantica* (endemic of Morocco) showed a high reducing power activity against *P. aeruginosa* which is tolerant to EO.

These results provide a glimmering development in the studied HE plants in the point of view of the production and the marketing for pharmaceutical, agricultural and industrial uses.

Key words: *Thymus satureioides* Coss, *Origanum compactum* Benth, *Nepeta*, essential oils, Biomass production, chemical polymorphism, antibacterial activity.