

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT de Biologie et Ecologie végétale

N°...../SNV/2020

**THÈSE**

Présentée par

**BOUDJEDJOU Lamia**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE**

**THÈME**

**Etude de la composition chimique et des activités biologiques des  
huiles essentielles de quelques espèces endémiques**

Soutenue publiquement le 15/11./2020

DEVANT LE JURY

Président	Pr. LAOUER Hocine	Pr.	UFA Sétif 1
Directeur	Pr. RAMDANI Messaoud	Pr	UFA Sétif 1
Examineurs	Dr. KHENCHOUCHE Abdelhalim	MCA	UFA Sétif 1
	Pr. LAIADI Ziane	Pr.	UMK Biskra
	Pr. ZELLAGUI Amar	Pr	ULBM O.E.B
	Pr. GHERRAF Noureddine	Pr.	ULBM O.E.B

*Laboratoire de valorisation des ressources végétales.*

## **Remerciements**

*Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage, la patience et la force, sans lesquels cette thèse n'aurait pas pu être ce qu'elle est.*

*Mes remerciements les plus profonds vont à mon directeur de thèse: professeur RAMDANI Messaoud, pour son encadrement, l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour ces conseils précieux,*

*J'exprime mes vifs remerciements à monsieur :-L'AOUAR Hocine, Professeur à l'université Ferhat Abbes Sétif 1 pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

*Mes remerciements et ma gratitude vont également envers :*

*Monsieur KHENCHOUCHE Abdelhalim, maître de conférence-A- à l'université Ferhat Abbes Sétif 1.*

*Monsieur LAIADI Ziane, professeur à l'université Mohammed Khieder Biskra.*

*Monsieur ZELLAGUI Ammar, professeur à l'université d'Oum-El-Bouaghi.*

*Monsieur GHERRAF Noureddine, professeur à l'université d'Oum-El-Bouaghi.*

*Qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute considération et de mes chaleureux remerciements pour m'avoir fait un immense honneur en acceptant de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont pris pour l'examiner.*

*Un grand merci à Monsieur ZERAIIB Azzeddine maître de conférences à l'université Abbes Laghrour Khenchela pour m'avoir accompagné dans ce travail, pour son soutien et son aide précieuse sans laquelle cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui. C'est un immense bonheur de l'avoir à mes côtés.*

*J'adresse mes sincères remerciements également à messieurs RAHAL Khaled et FERCHA Azzeddine pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.*

*Enfin, pour tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes parents, source de ma fierté, que dieu les protège ;*

*A mon âme sœur, mon mari*

*A mes anges : Hanine et Wassim, source de mon bonheur ;*

*A mes sœurs et frères et ma belle-famille pour leur soutien.*

*Merci infiniment*

# Avant-propos

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à la publication de plusieurs articles scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture. Ces travaux ont également été valorisés par des communications scientifiques.

## Publications

Zeraib A., Ramdani M., **Boudjedjou L.**, Chalard P., Figuredo G., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *J. BioSci. Biotech.*, 3(2): 147-154

Zeraib A., Ramdani M., **Boudjedjou L.**, Chalard P., Figuredo G., 2014. Characterization and chemosystematics of Algerian thuriferous juniper (*Juniperus thurifera* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87:249 – 255.

**Boudjedjou L.**, Ramdani M., Zeraib A., Benmeddour T., Fercha A. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of berries essential oil of Algerian *Juniperus thurifera* (Var. *aurasiaca*). *Pharmaceutical Sciences*, 24: 240-245.

**Boudjedjou L.**, Ramdani M., Zeraib A., Benmeddour T., Fercha A. 2019. Chemical composition and Biological activities of Algerian *Santolina africana* essential oils. *Scientific African*, 4: doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00090.

## Communications scientifique

Zeraib A., Ramdani M., **Boudjedjou L.**, Typification de la thurifère Algérienne (*Juniperus thurifera* L.). 2<sup>ème</sup> Séminaire National; Eau, Environnement et Biodiversité. 27-28 Mai 2014, Khenchela, Algérie.

**Boudjedjou L.**, Ramdani M., Zeraib A. Composition chimique et activité antioxydant et antibactérienne des huiles essentielles et extraits hydro-méthanoliques de *Santolina africana* et *Hertia cheirifolia*. Séminaire international sur les biotechnologies appliquées à l'agronomie, la santé et l'environnement. 17-19 Avril 2016, Khenchela, Algérie.

Zeraib A. et **Boudjedjou L.** Chimio-systématique de *Juniperus thurifera* en Algérie. Séminaire international sur les biotechnologies appliquées à l'agronomie, la santé et l'environnement. 17-19 Avril 2016, Khenchela, Algérie.

## ملخص

النباتات هي مصدر لا ينضب للجزيئات النشطة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي وتقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة والسمية النباتية للزيوت الأساسية المستخلصة من ثلاثة أنواع مستوطنة *Santolina africana* L. و *Hertia cheirifolia* L. و *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*. تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق التقطير المائي و قد بين التحليل الكيميائي لهذه الزيوت بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة ان ال  $\alpha$ -pinène ، 1,8-cinéole ، germacrène D ،  $\beta$ -pinène ، m-mentha-6,8-diène هي المركبات الرئيسية للزيوت الأساسية الثلاثة.

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار على القرص ضد أربعة سلالات مرجعية. أظهرت *S. aureus* و *E. coli* حساسية قوية للزيوت التي تم اختبارها ، بينما ابدت السلالتان *P. aeruginosa* و *B. subtilis* مقاومة للزيوت الأساسية لكل *H. cheirifolia* و *J. thurifera*. كما تم اختبار التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية مضافة الى ثلاث مضادات حيوية: الجنتاميسين ، الأموكسيسيلين والسيفازولين. تم تسجيل التأثير التآزري مع الجنتاميسين ، بينما لوحظت التأثيرات المضافة والمضادة مع الأموكسيسيلين والسيفازولين.

أظهر الإرساء الجزيئي docking moléculaire لمركبات الزيوت الأساسية على أربعة بروتينات مستهدفة ل  $\beta$ -Lactames أن مكونات الزيت الاساسي ل *S. africana* لديها تقارب أكبر لهذه البروتينات. المعقدات المتشكلة تحافظ على استقرارها اساسا بفضل الروابط الكارهة للماء.

أظهر اختبار فحص ازاحة الجذور DPPH واختبار FRAP أن الزيت الاساسي ل *Hertia cheirifolia* لديه اهم نشاط مضاد للأكسدة. تقييم تأثير السمية النباتية للزيوت الثلاثة على انتاش ونمو *Lactuca sativa* و *Triticum durum* اظهر خصائص مثيرة للاهتمام للسمية النباتية.

**الكلمات المفتاحية:** الأنواع المستوطنة ، الزيوت الأساسية ، النشاط البيولوجي.

## Résumé

Les plantes constituent une source inépuisable des molécules actives. La présente étude se propose d'identifier la composition chimique et d'évaluer les activités antibactérienne, antioxydant et la phytotoxicité des huiles essentielles de trois espèces endémiques : *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* L. et *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*.

L'analyse par CPG/SM des huiles extraites par hydrodistillation a mis en évidence leur composition chimique. Le  $\beta$ -pinène, le germacrène D, le 1,8-cinéole, l' $\alpha$ -pinène et le mentha-6,8-diène sont les composés majoritaires des trois huiles essentielles.

L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis de quatre souches de référence. *S. aureus* et *E. coli* ont manifesté une forte sensibilité aux agents testés, tandis que *P. aeruginosa* et *B. subtilis* se sont révélées résistantes à l'action des HEs de *H. cheirifolia* et *J. thurifera*.

L'effet antibactérien des HEs combinées avec la Gentamicine, Amoxicilline et Céfazoline a été également testé. L'effet synergique a été enregistré en combinant les HEs avec la gentamicine, alors que les effets additifs et antagonistes ont été observés avec l'amoxicilline et céfazoline.

Le docking moléculaire des composés des HEs sur quatre cibles des  $\beta$ -Lactames a montré que les constituants de l'HE de *S. africana* ont plus d'affinité pour ces protéines. Les complexes formés sont stabilisés principalement par des interactions hydrophobiques.

Le test de piégeage du radical DPPH et le test de FRAP ont mis en évidence que l'HE de *Hertia cheirifolia* présente le potentiel antiradicalaire et réducteur les plus importants.

L'évaluation de l'effet phytotoxique des trois huiles sur la germination et la croissance de *Triticum durum* et *Lactuca sativa* ont permis de mettre en valeurs des propriétés phytotoxiques intéressantes.

**Mots clés :** Espèce endémique, huile essentielle, activité biologique.

## Abstract

Plants are an inexhaustible source of active molecules. This study aims to identify the chemical composition and assess the antibacterial, antioxidant and phytotoxicity activities of essential oils from three endemic species: *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* L. and *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*. Analysis of oils extracted by hydrodistillation by GC/MS has highlighted their chemical composition.  $\beta$ -pinene, germacrene D, 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene and m-mentha-6,8-diene are the major compounds of the three essential oils.

Antibacterial activity was tested by the disc diffusion method against four reference strains. *S. aureus* and *E. coli* showed strong sensitivity to the agents tested, while *P. aeruginosa* and *B. subtilis* were found to be resistant to the action of the EOs of *H. cheirifolia* and *J. thurifera*. The antibacterial effect of EOs combined with Gentamicin, Amoxicillin and Cefazolin was also tested. The synergistic effect was recorded by combining the EOs with gentamicin, while the additive and antagonistic effects were observed with amoxicillin and cefazolin.

Molecular docking of the EOs compounds on four  $\beta$ -Lactam targets has shown that the EO constituents of *S. africana* have more affinity for these proteins. The complexes formed are stabilized by hydrophobic interactions.

The DPPH radical trapping test and the FRAP test have shown that the EO of *Hertia cheirifolia* has the most significant anti-radical and reducing potential. Evaluation of the phytotoxic effect of the three oils on the germination and growth of *Triticum durum* and *Lactuca sativa* showed interesting phytotoxic properties.

**Key words:** Endemic species, essential oil, biological activity.

## Sommaire

	page
Liste des Abréviations .....	V
Liste des figures .....	VI
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des annexes.....	X
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Aperçu sur les espèces étudiées</b> .....	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. <i>Santolina africana</i> L .....	4
I-2-1- Description botanique .....	4
I.2.2. Répartition géographique.....	5
I.2.3. Position systématique.....	5
I.2.4. Utilisations et effets thérapeutiques.....	5
I.2.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de <i>S. africana</i> .....	6
I.3. <i>Hertia cheirifolia</i> (L.) O.K. ....	7
I.3.1. Description botanique.....	7
I.3.2. Répartition géographique .....	8
I.3.3. Position systématique.....	8
I.3.4. Utilisations et effets thérapeutiques.....	8
I.3.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de <i>H. cheirifolia</i> .....	8
I.4. <i>Juniperus thurifera</i> L. ....	9
I.4.1. Description botanique .....	9
I.4.2. Répartition géographique.....	10
I.4.3. Position systématique.....	11
I.4.4. Utilisations et effets thérapeutiques .....	12
I.4.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de <i>J. thurifera</i> .....	12
<b>II. Généralités sur les huiles essentielles</b> .....	15
II.1. Définition.....	15
II.2. Répartition des huiles essentielles dans la plante .....	15
II.3. Rôle des huiles essentielles .....	15
II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	15

II.5. Composition chimique des huiles essentielles .....	16
II.5.1. Les terpénoïdes .....	16
II.5.2. Les phénylpropanoïdes .....	17
II.6. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles .....	18
II.7. Méthodes d'analyses des huiles essentielles .....	18
<b>III. Place des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibiorésistance .....</b>	<b>19</b>
III.1. Les antibiotiques .....	19
III.2. Cibles des antibiotiques.....	19
III.3. L'antibiorésistance: causes et mécanismes .....	20
III.4. Potentiel antibactérien des huiles essentielles.....	21
III.5. Modes d'action des huiles essentielles .....	21
<b>IV. Potentiel antioxydant des huiles essentielles .....</b>	<b>23</b>
IV.1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	23
IV.2. Sources des radicaux libres.....	23
IV.3. Le stress oxydant et ses conséquences.....	23
IV.4. Antioxydants et systèmes de défenses antioxydants .....	24
IV.5. Activité antioxydante des huiles essentielles.....	25
<b>V. Potentiel allélopathique des huiles essentielles.....</b>	<b>27</b>
V.1. Connaissances sur l'allélopathie.....	27
V.2. Place des plantes aromatiques dans l'allélopathie.....	27
V.3. Phytotoxicité des huiles essentielles.....	28
V.4. Modes d'action des allélochimiques.....	29
V.5. Constituants des huiles essentielles à potentiel phytotoxique .....	29
<b>VI. Le docking moléculaire.....</b>	<b>31</b>
VI.1. Introduction.....	31
VI.2- Le processus du docking .....	31
VI.3. La fonction de scoring .....	32
VI.4. Approches du docking.....	33
<b>Chapitre II: Matériel et Méthodes</b>	
<b>I- Matériel.....</b>	<b>35</b>
I.1 Matériel Végétal .....	35
I.2. Souches bactériennes.....	36
I.3. Antibiotiques.....	36

<b>II. Méthodes</b> .....	36
II.1. Extraction des huiles essentielles.....	36
II.2. Calcul de rendement .....	37
II.3. Analyse chimique des huiles essentielles.....	37
II.3.1. Analyse par GPC/MS .....	37
II.3.2. Identification des composants.....	38
II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	38
II.4.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque.....	38
II.4.2. Antibiogramme.....	39
II.4.3. Test de combinaison des HEs avec les antibiotiques .....	40
II.5. Évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles.....	40
II.5.1. Piégeage du radical DPPH (Diphényl Picrylhydrazyle).....	40
II.5.2. Test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	41
II.6. Tests de phytotoxicité.....	42
II.6.1. Test de la germination.....	42
II.6.2. Test de croissance.....	43
II.7. Analyses statistiques.....	43
II.8. Docking moléculaire.....	43
II.8.1. Structures des ligands.....	43
II.8.1. Structures des protéines cibles.....	44
II.8.3. Processus du docking.....	45

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

<b>I. Composition chimique des huiles essentielles</b> .....	47
<b>I.1. Huile essentielle de <i>Santolina africana</i></b> .....	47
I.1.1. Rendement en huile essentielle.....	47
I.1.2. Composition chimique de l'HE de <i>S. africana</i> .....	48
b) Etude des populations .....	40
<b>I.2. Huile essentielle de <i>Hertia cheirifolia</i></b> .....	53
I.2.1. Rendement en huile essentielle.....	53
I.2.2. Composition chimique de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> .....	53
<b>I.3. Huile essentielle de <i>Juniperus thurifera</i></b> .....	61
I.3.1. Rendement en huile essentielle.....	61

I.3.2. Composition chimique de l'HE de <i>J. thurifera</i> .....	62
<b>II. Etude de l'activité antibactérienne</b> .....	67
<b>II.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles seules</b> .....	67
II.1.1. Activité antibactérienne de l'HE de <i>Santolina africana</i> .....	67
II.1.2. Activité antibactérienne de l'HE de <i>Hertia cheirifolia</i> .....	70
II.1.3. Activité antibactérienne de l'HE de <i>Juniperus thurifera</i> .....	72
<b>II.2. Résultats de la combinaison des HEs avec les antibiotiques</b> .....	74
II.2.1. Combinaison de l'HE de <i>S. africana</i> avec les ATBs.....	74
II.2.2. Combinaison de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> avec les ATBs.....	75
II.2.3. Combinaison de l'HE de <i>J. thurifera</i> avec les ATBs.....	77
<b>II.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles in-silico par le Docking moléculaire</b> .....	80
II.3.1. Tests de fiabilité du protocole.....	80
II.3.1.1. L'écart quadratique moyen.....	80
II.3.1.2 L'analyse visuelle.....	81
II.3.2. Docking des diverses molécules sur les cibles d'antibiotiques $\beta$ -lactames .....	83
II.3.2.1. Docking des molécules sur la protéine PBPa1.....	83
II.3.2.2. Docking des molécules sur la protéine ALR.....	86
II.3.2.3. Docking des molécules sur la protéine DDL.....	89
II.3.2.4. Docking des molécules sur la protéine LDT.....	92
<b>III. Activité antioxydant des huiles essentielles</b> .....	97
III.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	97
III.2. Test de la réduction du fer (FRAP).....	99
<b>VI. Phytotoxicité des huiles essentielles</b> .....	102
VI.1. Paramètres de germination.....	102
a- Pourcentage de germination.....	102
b- Vitesse de germination.....	105
VI.2. Test de croissance.....	107
<b>Conclusion</b> .....	111
<b>Références Bibliographiques</b> .....	114
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

**Ab:** Antibiotique.

**ACP:** Analyse en composantes principales.

**ALR:** Alanine Racémase

**Amx:** Amoxicilline.

**ANOVA:** Analyse de la variance.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**CCM:** Chromatographie sur couche mince.

**Céf:** Céfazoline.

**CFU:** Colony forming units.

**CHA:** Classification hiérarchique ascendante.

**CI<sub>50</sub>:** Concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres.

**CPG/MS:** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie.de masse.

**CPG:** Chromatographie en phase gazeuse.

**DDL:** D-Alanyl-D-Alanine ligase.

**DPPH:** 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**ERO:** Espèces réactives de l'oxygène.

**FRAP:** Ferric Reducing Antioxidant Power.

**Gent:** Gentamicine.

**HE:** Huile essentielle.

**LDT:** L, D-Transpeptidase 2.

**LSD:** Low significant difference.

**MHA:** Muller Hinton Agar.

**MOE:** Molecular Operating Environment.

**PBP-a1:** Penicillin-Binding Proteins-a1

**PDB:** Protein Data Bank.

**RMSD:** Root-mean-square deviation.

**Rt:** Temps de rétention.

## Liste des figures

	Page
Figure 1: <i>Santolina africana</i> L au stade de floraison.....	4
Figure 2: <i>Hertia cheirifolia</i> L. au stade de floraison .....	7
Figure 3: <i>Juniperus thurifera</i> L. dans son milieu naturel .....	10
Figure 4: Montage de l'hydrodistillation .....	16
Figure 5: Structure de l'isopentényl pyrophosphate .....	17
Figure 6: Structure de quelques terpènes .....	17
Figure 7: Schéma des cibles de quelques classes d'antibiotiques .....	20
Figure 8: Exemples d'antioxydants d'origine alimentaire .....	25
Figure 9: L'allélopathie dans le système biologique .....	28
Figure 10: Etapes du processus de docking .....	33
Figure 11: Localités des plantes récoltées.....	35
Figure 12: Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles .....	37
Figure 13: Réduction du radical DPPH par une molécule donneuse de protons .....	41
Figure 14: Structure cristallographique des cibles choisies pour le test <i>in silico</i> .....	44
Figure 15: Illustration du site actif de la DDL.....	46
Figure 16 Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>S. africana</i> .....	48
Figure 17: Principaux composés de l'HE de <i>S. africana</i> .....	50
Figure 18: Répartition des familles de composés chimiques de l'HE de <i>S. africana</i> ...	52
Figure 19 Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>H. Cheirifolia</i> .....	53
Figure 20: Composés majeurs de l'huile essentielle de <i>H. cheirifolia</i> .....	55
Figure 21: Répartition des familles de composés chimiques de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> .	56
Figure 22: ACP des HEs de <i>H. cheirifolia</i> rapportées dans la littérature et l'HE étudiée (axe1 et 2) .....	58
Figure 23: ACP des HEs de <i>H. cheirifolia</i> rapportées dans la littérature et HE étudiée (axe2 et 3). .....	59
Figure 24: ACP des composés chimiques des HEs de <i>H. cheirifolia</i> rapportées dans la littérature et l'HE étudiée (axe1 et 2).....	60
Figure 25: Dendrogramme des HEs de <i>H. cheirifolia</i> rapportées dans la littérature et l'HE étudiée en fonction de leurs compositions chimiques.....	61
Figure 26 Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>J. thurifera</i> .....	62
Figure 27: Principaux composé de l'huile essentielle de <i>J. thurifera</i> .....	64
Figure 28: Répartition des familles de composés chimiques de l'HE des graines de <i>J.</i>	

	<i>thurifera</i> var <i>aurasiaca</i> .....	65
Figure 29	Effets de la combinaison de l'HE de <i>S. africana</i> avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	75
Figure 30	Effets de la combinaison de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	76
Figure 31	Effets de la combinaison de l'HE de <i>J. thurifera</i> avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	78
Figure 32	Emplacements des ligands co-cristallisés et après docking sur les sites actifs des cibles protéiques.....	82
Figure 33	Complexe Eicosyne-PBP $\alpha$ 1 issu de docking.....	84
Figure 34	Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible PBP $\alpha$ 1.....	86
Figure 35	Complexe Phenylthioacetic-ALR de docking.....	87
Figure 36	Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible ALR.....	89
Figure 37	Complexe Bornéol-DDL.....	90
Figure 38	Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible DDL.....	92
Figure 39	Complexe LDT- 3-Eicosyne.....	93
Figure 40	Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible LDT.....	94
Figure 41	Pouvoir réducteur du Fer des HEs testées et de l'acide ascorbique.....	100
Figure 42	Effets des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la capacité germinative de <i>T. durum</i> .....	104
Figure 43	Taux de germination des graines de <i>L. sativa</i> traitées avec différentes concentrations huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> .....	104
Figure 44	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la vitesse de germination des graines de <i>T. durum</i> .....	106
Figure 45	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la vitesse de la germination de <i>L. sativa</i> .....	106
Figure 46	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la croissance de la partie racinaire de <i>L. sativa</i> .....	108

## Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 Principaux constituants des HEs de <i>S. africana</i> rapportées dans la littérature.....	6
Tableau 2 Principaux constituants des HEs de <i>H. cheirifolia</i> rapportées dans la littérature.....	9
Tableau 3 Principaux constituants des HEs de <i>J. thurifera</i> rapportées dans la littérature.....	13
Tableau 4: Coordonnées géographiques des populations échantillonnées.....	36
Tableau 5: Protéines cibles utilisées dans le docking moléculaire.....	45
Tableau 6: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. africana</i> .....	49
Tableau 7: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>H. cheirifolia</i> .....	54
Tableau 8: Composition chimique de l'HE des graines de <i>J. thurifera</i> var. <i>aurasiaca</i> .....	63
Tableau 9: Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>S. africana</i> .....	67
Tableau 10: Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> .....	70
Tableau 11: Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>J. thurifera</i> .....	72
Tableau 12: Résultats de la combinaison de l'HE de <i>S. africana</i> avec les antibiotiques.....	74
Tableau 13: Résultats de la combinaison de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> avec les antibiotiques.....	76
Tableau 14: Résultats de la combinaison de l'HE de <i>J. thurifera</i> avec les antibiotiques.....	77
Tableau 15: Valeurs de RMSD des quatre complexes étudiés .....	81
Tableau 16: Meilleurs scores d'interaction avec la protéine PBPa1.....	83
Tableau 17: Meilleurs scores de l'interaction entre les composés des HEs étudiées ayant un pourcentage $\geq 2\%$ et la protéine PBPa1.....	85
Tableau 18: Meilleurs scores d'interaction avec la protéine ALR.....	87
Tableau 19: Meilleurs scores d'interaction entre les composés des HEs étudiées ayant un pourcentage $\geq 2\%$ et la protéine ALR.....	88
Tableau 20: Meilleurs scores d'interaction avec la protéine DDL.....	90
Tableau 21: Meilleurs scores de l'interaction entre les composés des HEs testées ayant un pourcentage $\geq 2\%$ et la protéine DDL.....	91

Tableau 22	Meilleurs scores d'interaction avec la protéine LDT.....	93
Tableau 23:	Meilleurs scores d'interaction entre les composés des HEs testées ayant un pourcentage $\geq 2\%$ et la protéine LDT.....	94
Tableau 24:	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de <i>S. africana</i> .....	97
Tableau 25	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de <i>J. thurifera</i> .....	98
Tableau 26	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de <i>H. cheirifolia</i> .....	98
Tableau 27	Pouvoir réducteur des HEs étudiées.....	100
Tableau 28	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la germination des graines de <i>T. durum</i> et <i>L. sativa</i> .....	102
Tableau 29	Effet huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la vitesse de germination de <i>T. durum</i> et <i>L. sativa</i> .....	105
Tableau 30	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la croissance de la tige et la racine de <i>T. durum</i> .....	107
Tableau 31	Effet des huiles essentielles de <i>S. africana</i> , <i>H. cheirifolia</i> et <i>J. thurifera</i> sur la croissance racinaire de <i>L. sativa</i> .....	108

## Liste des annexes

- Annexe 1      Identifiants des constituants des huiles essentielles téléchargés à partir de la base des données PubChem.
- Annexe 2:    **Publication1** : Chemical Composition and Antibacterial Activity of Berries Essential Oil of Algerian *Juniperus thurifera*(Var. *aurasiaca*)
- Annexe 3:    **Publication 2** : Chemical composition and biological activities of Algerian *Santolina africana* essential oil.

---

*Introduction  
Générale*

---

## **Introduction**

Les plantes médicinales aromatiques dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis longtemps, suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs dans le domaine thérapeutique. Elles fournissent une vaste gamme de composés actifs inépuisables doués de propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales et ont été reportées en tant que sources potentielles de nouveaux composés antimicrobiens, d'agents favorisant la conservation des aliments et de traitements de substitution des maladies infectieuses.

La prise de conscience de la place que pourraient jouer les plantes aromatiques et médicinales dans le domaine thérapeutique est apparue suite à la remise en question de l'efficacité des molécules utilisées dans la chimiothèque antimicrobienne. En effet, de nos jours, la résistance acquise des germes à bon nombre d'antibiotiques à cause d'une utilisation massive de ces agents semble être le plus grand défi face auquel se trouve la santé publique. Ces dernières années, la recherche et le développement de nouveaux agents antibactériens d'origine naturelle pour lutter contre la résistance bactérienne ont suscité un intérêt croissant. Les huiles essentielles qui se présentent sous forme de mélanges complexes semblent être capables de répondre à cet objectif.

De plus, une piste de recherche de plus en plus intéressante consiste à la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques qui pourrait constituer une approche thérapeutique efficace pour combattre les maladies infectieuses et réduire l'émergence des agents pathogènes résistants.

En outre, les radicaux libres sont à l'origine de plusieurs pathologies tels que le cancer, les maladies auto-immunes ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer pour lesquelles, les antioxydants de synthèse ont montré leur efficacité mais les effets secondaires voire toxiques qui leur sont associés sont à prendre sérieusement. Ceci fait que le recours aux principes actifs extraits des plantes s'avère être un choix indétournable.

La lutte contre les mauvaises herbes constitue un problème critique pour les agriculteurs. L'interférence des mauvaises herbes dans les zones agricoles réduit la qualité des produits agricoles et provoque des pertes de rendements importantes. Pour les contrôler le recours aux herbicides synthétiques est une pratique courante. De plus, la résistance croissante des mauvaises herbes aux herbicides ainsi que les préoccupations

environnementales liées à l'application ininterrompue des produits de synthèse ont conduit à de grands efforts dans la planification de stratégies alternatives de gestion des mauvaises herbes.

L'utilisation des huiles essentielles impliquées dans les interactions allélopathiques comme sources de nouveaux herbicides pourraient répondre au double objectif de protection des cultures et de protection de l'environnement.

La flore aromatique et médicinale algérienne très riche et diversifiée est encore méconnue et sous-exploitée. La valorisation de cette flore en vue de son utilisation dans des domaines aussi divers que la cosmétique, la pharmacie, la parfumerie et l'agroalimentaire s'avère d'une importance primordiale. Mais cette valorisation doit passer inévitablement par des études approfondies et des données solides.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail de recherche qui a pour objectif d'identifier la composition chimique des huiles essentielles extraites de trois espèces et d'évaluer leur potentiel antibactérien, antioxydant et phytotoxique. Notre choix a porté sur trois plantes : la santoline (*Santolina africana*) endémique du Nord d'Afrique, l'othonnopsis à feuilles de giroflée (*Hertia cheirifolia*) endémique Tuniso-Algérienne, et le genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*) endémique dans le massif des Aurès en Algérie.

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre dresse une revue bibliographique dans laquelle les plantes étudiées seront décrites et des notions de bases sur les huiles essentielles et leurs activités biologiques seront abordées. Ensuite, je me propose d'exposer le matériel utilisé et la méthodologie adoptée. Le troisième chapitre, présente les principaux résultats issus de cette étude dont certains ont fait l'objet de deux publications. Finalement, nous clôturons ce manuscrit par la conclusion tirée de ce travail de recherche ainsi que les perspectives futures.

---

*CHAPITRE I*

---

*Synthèse*  
*Bibliographique*

---

## I. Aperçu sur les espèces étudiées

### I.1. Généralités

La flore algérienne a fait l'objet de nombreuses explorations botaniques qui ont été couronnées, en 1962, par la publication de la "*Flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*" de Quezel et Santa qui reste à ce jour, la flore de référence pour l'Algérie. Depuis 1962, l'exploration botanique de la flore algérienne a été prise en charge par de nombreux travaux dont ceux de Médail et Quezel (1999), Vela et Benhouhou (2005), Yahi *et al.* (2012), Miara *et al.* (2018) ...etc.

La diversité floristique algérienne est estimée à 3994 taxons repartis sur 131 familles botaniques et 917 genres. Parmi lesquels, 464 taxons sont endémiques nationales (Yahi et Benhouhou, 2011).

La famille des Astéracées est la plus vaste famille de la division des spermatophytes, avec plus de 43 tribus, 1600 genres et au moins 24000 espèces réparties sur toute la planète (Paul, 2017). Elle est constituée essentiellement de plantes herbacées, des arbustes ou des lianes, qui ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules (Coste, 1980). En Algérie, cette famille est représentée par 408 espèces réparties en 109 genres (Quezel et Santa, 1963).

Quant à la famille des Cupressacées (*Cupressaceae*), elle compte plus de 130 espèces réparties en 29 genres (Adams *et al.*, 2009). Il s'agit d'arbres ou d'arbustes persistants généralement résineux et aromatiques monoïques. En Algérie, cette famille est représentée par des essences forestières classées comme rares et menacées. Il s'agit de: *Tetraclinis articulata*, *Cupressus sempervirens*, *C. dupreziana*, *Juniperus phoeniceae*, *J. oxycedrus*, *J. communis*, *J. sabina* et *J. thurifera* (INRF, 2012).

Dans la présente étude, notre choix a porté sur deux espèces de la famille des Astéracées à savoir *Santolina africana* et *Hertia cheirifolia* et une espèce appartenant à la famille des Cupressacées à savoir *Juniperus thurifera*.

## I.2. *Santolina africana* L.

### I.2.1. Description botanique

Le genre *Santolina* renferme des sous-arbrisseaux, ligneux et rustiques; le feuillage est alterne, très finement penné, à hélices foliaires minces; les capitules en boule, jaunes, crèmes ou blancs, longuement pédicellés, sont discoïdes et composés de fleurs toutes tubuleuses hermaphrodites. La corolle présente une évagination qui coiffe le sommet de l'ovaire. Les bractées de l'involucre sont imbriquées sur peu de rangs. Le réceptacle est convexe ou sub-hémisphérique, paléacé. Akènes non ailés, chauves, tétragones; entièrement dépourvus de côtes et de faisceaux libéro-ligneux saillants (Quezel et Santa, 1963).

*Santolina africana* est un sous-arbrisseau ligneux (haut de 2 à 3 dm) se développant en stations rocailleuses et sur les crêtes élevées en terrains calcaires. Elle développe des tiges très rameuses, dont les rameaux tous, subverticaux, raides et pubescents, supportent d'abondantes feuilles blanchâtres, sessiles et découpées (Figure 1). Les inflorescences, sommitales et larges, de 8 à 10mm, correspondent à des capitules de fleurs jaunes, toutes bisexuées et tubuleuses (Boullard, 2001).



**Fig. 1:** *Santolina africana* L. au stade de floraison.

### I.2.2. Répartition géographique

Le genre *Santolina* est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région méditerranéenne (Derbesy *et al.*, 1989) parmi lesquelles, les plus répandues sont : *S. viridis* W. (sud de la France et nord de l'Espagne), *S. pectinata* Lag (Péninsule Ibérique) et *S. chamaecyparissus* L. (Liu *et al.*, 2007). *Santolina africana* est une espèce méditerranéenne calcicole endémique d'Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1963).

### I.2.3. Position systématique

*Santolina africana* L. est classée comme suit: (Dupont et Guignard, 2007).

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermaphyta

**Sous-embranchement:** Magnoliophyta

**Classe:** Eudicots

**Sous-Classe:** Asteridae

**Ordre:** Asterales

**Famille:** Asteraceae

**Tribu:** Anthemideae

**Genre:** *Santolina*

**Espèce:** *Santolina africana* L.

### I.2.4. Utilisations et effets thérapeutiques

*S. africana* L. est largement utilisée en médecine traditionnelle grâce à ses propriétés antispasmodiques, analgésiques, désinfectantes, anti-inflammatoires, bactéricides et fongicides (Da Silva, 2004). Il a été rapporté que cette plante est utilisée en phytothérapie pour de nombreux types de dermatite (Giner *et al.*, 1988). En infusion, les fleurs et les feuilles sont utilisées comme vermifuges pour les enfants et pour traiter la mauvaise digestion ainsi que les problèmes menstruels (Grosso *et al.*, 2009). L'infusion de la santoline a aussi une action insectifuge sur les pucerons, les acariens et les chenilles. La poudre de la santoline est utilisée localement pour soulager les douleurs liées aux piqûres des insectes. Quand elle est appliquée sur les plaies, elle accélère la cicatrisation (Lopez *et al.*, 2008).

### I.2.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de *S. africana*

La composition chimique des huiles essentielles des espèces du genre *Santolina* a été étudiée: *S. chamaecyparissus* (Djeddi *et al.*, 2012), *S. oblongifolia* (De Pascual *et al.*, 1983), *S. ligustica* (Flamini *et al.*, 1999) et *S. rosmarinifolia* (Palá-Paúl *et al.*, 1999; 2001).

La composition chimique de *S. africana* d'Algérie a été rapportée par Derouiche *et al.* (2013) et Zaiter *et al.* (2015). Les HEs des tiges, des feuilles et des fleurs des échantillons marocains ont été étudiées par Fdil *et al.* (2011) et Lmachraa *et al.* (2014), alors que *S. africana* de Tunisie n'a fait l'objet que d'une seule étude réalisée par Attia *et al.* (2012a) (Tableau 1).

**Tableau 1:** Principaux constituants des HEs de *S. africana* rapportées dans la littérature.

Provenance	Partie utilisée	Principaux composés	Référence
Marrakech (Maroc)	Partie aérienne	Camphor (54,30%), bornéol (17,24%), acétate de bornyl (8,61%), 1,8-Cinéole (5,27%).	Fdil <i>et al.</i> (2011)
	Tiges, feuilles et fleurs.	Camphor (69,14%, 71,37% et 80,44%), bornéol (20,33%, 18,13% et 12,34%), acétate de bornyl (7,08%, 8,12% et 3,50%)	Lmachraa <i>et al.</i> (2014)
T'éjrouine (Tunisie)	Partie aérienne	Terpinèn-4-ol (54,96%), $\alpha$ -terpinéol (14,06%), bornéol (8,37%), trans-chrysanthéol (3,65%), camphor (3,61%), 1,8-cinéole (3,59%)	Attia <i>et al.</i> (2012a)
Constantine (Nord-est d'Algérie)	Fleurs	Acénaphthane (25,23%), calarène (21,54%), ocimène (17,44%), $\alpha$ -farnesene (5,35%), tricyclo 5,1,0,0,2,4octane-5-carboxylic acid, 3,3,8,8, tetramethyl-,methylester (8,17%).	Derouiche <i>et al.</i> (2013)
	Partie aérienne	$\beta$ -pinène (12,78%), 1,8-cinéol (10,02%), curcumène (7,96%), myrcène (6,94%).	Zaiter <i>et al.</i> (2015)

D'après la recherche bibliographique que nous avons effectuée, les propriétés biologiques des HEs de *S. africana* ont été très peu étudiées. En dehors de l'étude de Derouiche *et al.* (2013) consacrée à l'activité antibactérienne et antioxydant de la santoline d'Algérie et celle de Attia *et al.* (2012a) qui se sont attachés à l'étude de l'effet acaricide des huiles essentielles de *S. africana* provenant de la Tunisie, les activités biologiques des

HEs de cette espèce demeurent mal connues. Notre présente étude se veut donc une contribution à une meilleure connaissance des potentiels biologiques que pourraient avoir les huiles essentielles de cette espèce.

### I.3. *Hertia cheirifolia* (L.) O.K

#### I.3.1. Description botanique

*Hertia cheirifolia* connue également sous le nom d'*Othonopsis cheirifolia* (Massiot *et al.*, 1990), est une plante vivace, glabre, en touffes denses (Figure 2). Les tiges sont couchées à la base puis ascendantes, elles peuvent atteindre 50cm. C'est une espèce héliophile, qui se développe sur un sol bien drainé et qui supporte bien le calcaire. Les feuilles sont persistantes, alternes et sessiles. Les capitules sont de couleur jaune citron, hétérogames, multiflores, radiés, solitaires sur des pédoncules nus et élargis au sommet, assez gros (2cm de diam.). Les akènes sont pubescents, à aigrette fournie et atteignant 2cm (Quezel et Santa, 1963). Les fleurs périphériques sont fertiles et les autres tubulaires et stériles (Pottier-Alapetite, 1981).



**Fig. 2 :** *Hertia cheirifolia* L. au stade de floraison.

### I.3.2. Répartition géographique

Le genre *Hertia* compte 12 espèces réparties partout dans le Sud et le Nord d'Afrique et le Sud-ouest d'Asie (Akhgar *et al.*, 2012) dont une seule Algéro-tunisienne: *Hertia cheirifolia* que l'on rencontre dans les champs la partie orientale de l'Algérie et de la Tunisie (Pottier-Alapetite, 1981).

### I.3.3. Position systématique

D'après APG II (2003), la position systématique de *Hertia cheirifolia* est la suivante :

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermaphyta

**Sous-embranchement:** Magnoliophyta

**Classe:** Eudicots

**Sous classe:** Asteridae

**Ordre:** Asterales

**Famille:** Asteraceae

**Tribu:** Senecioneae

**Genre:** *Hertia*

**Espèce:** *Hertia cheirifolia* Otto Kuntze (1891)

### I.3.4. Utilisations et effets thérapeutiques

En médecine traditionnelle, *H. cheirifolia* a été utilisée pour traiter les spasmes, l'inflammation, la diarrhée et les hémorroïdes (Iserin, 2001). Les feuilles et des tiges de sont utilisées en infusion comme traitement antidiabétique (Majouli *et al.*, 2016).

### I.3.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de *H. cheirifolia*

La composition chimique des huiles essentielles de *H. cheirifolia* provenant de différentes régions a été rapportée par plusieurs auteurs (Attia *et al.*, 2012a; Zellagui *et al.*, 2012; Majouli *et al.*, 2016a,b; Rahali *et al.*, 2017; Segueni *et al.*, 2017) (Tableau 2).

Des propriétés biologiques intéressantes des huiles essentielles de *H. cheirifolia* ont été mises en évidence lors de nombreuses études; une activité acaricide (Attia *et al.*, 2012a,b), antioxydant (Zellagui *et al.*, 2012; Majouli *et al.*, 2016b; Rahali *et al.*, 2017), inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase (Zellagui *et al.*, 2012; Majouli *et al.*, 2016b), antibactérienne

(Majouli *et al.*, 2016a; Majouli et Kenani, 2017b) et inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de l' $\alpha$ -amylase (Rahali *et al.*, 2017).

**Tableau 2:** Principaux constituants des HEs de *H. cheirifolia* rapportées dans la littérature.

Provenance	Partie utilisée	Principaux composés	Référence
T'ejrouine (Tunisie)	Partie aérienne	Thymol (61%), 2,6-diméthoxyphénol (12,83%), camphor (5,82%), terpinene-4-ol (5,48%).	Attia <i>et al.</i> (2012a)
Thala (Tunisie)	Fleurs	$\alpha$ -pinène (70,4%), germacrène D (6,7%), $\alpha$ -cadinol (3,2%), sabinène (2,3%)	Majouli <i>et al.</i> (2016a,b)
	Partie aérienne	$\alpha$ -Pinene (62,5%), germacrène D (9,5%), $\alpha$ -cadinol (2,7%), sabinène (2,1%), $\beta$ -caryophyllène (1,7%)	
	Racine	$\alpha$ -pinène (22,1%), valencène (13,2%), $\beta$ -caryophyllène(11,8%), germacrène A (7,6%), $\alpha$ -terpinyl acétate (6,9%), germacrène D (5,9%), $\beta$ -élémente (3,9%), caryophyllène oxide (2,5%)	
Sousse (Tunisie)	Partie aérienne	$\alpha$ -pinène (12,67-35,63%), germacrène D (5,25-13,18%), type drimane sesquiterpène lactone (13,81-34,08%), drimenin (27,29-32,55%)	Rahali <i>et al.</i> (2017)
Oum el bouaghi (Algérie)	Feuilles récoltées au stade végétatif	Drimenin (67.5%), 1,2-Di(2-pyridinyl)-1,2-ethanediol (11.2 %), globulol(1.7 %), cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl- (1.5 %).	Zellagui <i>et al.</i> (2012)
	Feuilles récoltées au stade de floraison	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl ester) (33,71%), valeranone (6,9%), (-)-Drimenin (6,71%), benzene, tert-butyl (3,06%).	Seguni <i>et al.</i> (2017)

#### I.4. *Juniperus thurifera* L.

##### I.4.1. Description botanique

Le genre *Juniperus* est composé d'environ 75 espèces (101 taxons) (Adams, 2014), il est le deuxième plus grand genre de conifères en nombre d'espèce après le genre *Pinus* (Farjon, 2010). Les espèces de ce genre sont caractérisées par des cônes très particuliers, appelés «galbules», comportant des écailles plus ou moins complètement soudées entre elles. Beaucoup d'espèces sont dioïques. Au printemps, les pieds mâles portent des petits cônes à l'aisselle des feuilles de l'année précédente. Les trois ovules, à l'aisselle des écailles

supérieures du rameau, émettent une goutte micropylaire captant le pollen (Rameau *et al.*, 2008).

*Juniperus thurifera* L. (Aiwâl ou Hazenzna en berbère) est un arbre de port très variable qui peut atteindre 20 mètres de hauteur, avec un tronc très ramifié montrant une structure «trunks multiples» ou multicaule (Figure 3). Les feuilles en écailles, entières ou faiblement denticulées, à dos plus ou moins caréné (Bertaudière, 1999). Les cônes femelles (galbules) sont charnus, de couleur noir bleuâtre. Les fleurs mâles sont réunies en chatons terminaux d'une taille moyenne de 5 mm (Montès, 1999).



**Fig. 03:** *Juniperus thurifera* L. dans son milieu naturel.

#### I.4.2. Répartition géographique

La flore Algérienne comprend deux sections et cinq espèces du genévrier : la section *Oxycedrus* (*J. communis* L., *J. oxycedrus* L.) et la section *Sabina* (*J. thurifera* L., *J. phonicea* L., *J. sabina* L.) (Quezel et Santa, 1963; Adams *et al.*, 2003).

L'aire de répartition de *J. thurifera* s'étend en Afrique du Nord (Maroc et Algérie), en Espagne, en France et dans les Alpes italiennes (Terrab *et al.*, 2008). En Algérie, le thurifère est uniquement localisé aux Aurès (Baghami *et al.*, 2013; Zeraib *et al.*, 2014a).

Le Genévrier thurifère s'observe, à la fois sur les versants exposés au sud et au nord. D'une manière générale, son amplitude altitudinale se situe entre 1300 et 2000 m (Baghami *et al.*, 2013). C'est une espèce héliophile, dioïque, bien que la présence de quelques individus monoïques ait été mentionnée dans les Alpes françaises, en Corse (Borel et Polidori, 1983) et en Algérie (Zeraib, 2016).

#### I.4.3. Position systématique

D'après Mao *et al.* (2010), la position systématique de *Juniperus thurifera* est la suivante:

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Pracheobionta

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Gymnospermes

**Division :** Pinophyta

**Classe :** Pinopsida

**Ordre :** Pinales

**Famille :** Cupressaceae

**Sous-famille :** Cupressoideae

**Genre :** *Juniperus* L.

**Section :** *Sabina*

**Espèce :** *Juniperus thurifera* L.

Les études menées sur la systématique de *Juniperus thurifera* ont conduit à la distinction de deux sous-espèces : *J. thurifera* subsp. *thurifera* qui correspond aux populations européennes regroupées en trois variétés : *hispanica*, *gallica* et *corsicana* et *J. thurifera* subsp. *africana* qui correspond aux populations nord-africaines (Gauquelin *et al.*, 2003). Récemment, des données de la recherche en systématique basées sur des caractères génétiques (Terrab *et al.*, 2008), morphologiques (Véla et Schäfer, 2013) et phytochimiques (Zeraib *et al.*, 2014a) ont permis de proposer une nouvelle classification du genévrier thurifère algérien : *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*.

#### I.4.4. Utilisations et effets thérapeutiques

Grâce à leurs nombreuses propriétés thérapeutiques, les espèces du genre *Juniperus* ont été considérées depuis l'antiquité comme des plantes médicinales. Elles sont employées pour leurs propriétés anti-inflammatoire, diurétique, antiseptique, hypoglycémiant, hypotensive et analgésique (Milos et Radonic, 2000). Des effets thérapeutiques dans le traitement du rhumatisme, des douleurs sciatiques, de la dermatite et de la névrose neurasthénique ont été également rapportés (Achak *et al.*, 2009).

#### I.4.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de *J. thurifera*

La composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *J. thurifera* Var. *africana* du Maroc a été décrite dans de nombreux travaux (Adams *et al.*, 2003; Achak *et al.*, 2008, 2009; Mansouri *et al.*, 2010; Bahri *et al.*, 2013 et Satrani *et al.*, 2015). Pour le taxon européen, le profil chimique des huiles essentielles des graines (Hernandez *et al.*, 1987), des feuilles (Adams, 1999) et du bois (Barrero *et al.*, 2005) ont été rapportés. Si la composition chimique des huiles de *J. thurifera* du Maroc et de l'Europe est bien étudiée, il n'en pas de même pour celle de l'Algérie dont les travaux de Zeraib *et al.* (2014a,b) ont été les seules à s'y intéresser en rapportant la composition chimique des feuilles (Tableau 3).

Les HEs de *J. thurifera* Var. *africana* ont été étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes. Bahri *et al.* (2013) ont mis en évidence une bonne activité inhibitrice contre toutes les souches testées à l'exception des *Pseudomonas* qui se sont révélées résistantes. Quant à Satrani *et al.* (2015), ils ont montré que par rapport aux deux espèces *J. oxycedrus* et *J. phoenicea*, les huiles de *J. thurifera* Var. *africana* ont présenté le potentiel antioxydant le plus intéressant.

L'activité antimicrobienne des sesquiterpènes isolés de l'HE du bois du genévrier thurifère originaire d'Espagne a été évaluée par Barrero *et al.* (2005). Parmi les vingt-deux composés testés, l' $\alpha$  et  $\beta$ -cedrène et le sesquithuriférol étaient les plus actifs (CMI= 3,06 $\mu$ g/ml), alors qu'une activité significative (CMI= 6,12 $\mu$ g/ml) a été attribuée au thujopsène.

**Tableau 3:** Principaux constituants des HES de *J. thurifera* rapportées dans la littérature.

Provenance	Partie utilisée	Principaux composés	Référence
Espagne	Graines	Limonène (84,32%), β-myrcène (3,82%), α-pinène (3,48%), α-terpinolène (1,39%).	Hernandez <i>et al.</i> (1987)
	Feuilles	Limonene (51,5%), linalyl acetate (7,6%), linalool (7,1%), myrcène (3,4%), α- terpinyl acetate (3,2%), piperitone (3,2%) et α- pinène (2,2%).	Adams (1999)
	Bois	Cedrol (41,8%), thujopsene (20,5%), widdrol (16,7%), α-cedrene (12,1%), sesquithriferol (4%).	Barrero <i>et al.</i> (2005).
Marrakech (Maroc)	Feuilles	Sabinène (12,2%-45,8%), α-pinène (4%-17,1%), γ-terpinène (0,9%-3,3%), myrcène (1,8%-3,9%).	Adams <i>et al.</i> (2003).
		Sabinène (7%-37,1%), α-pinène (1,2%-9,1%), γ-terpinène (1,5%-11,5%), α-terpinène (1,4%-8,5%), δ-cadinène (0,6%-12,7%)	Achak <i>et al.</i> (2008, 2009)
		Sabinène (36,2%- 39,4%), β-pinène (0,5%-12,5%), terpinèn-4-ol (4,3%- 10,4%), α-phellandrène (0,1%-7,4%), acétate de bornyle (0,4%-14,6%)	Bahri <i>et al.</i> (2013)
		β-pinène (36,3%), terpin-4- ol (12,8%), pinène α-oxide (10,9%), piperitone (10%), β-E-ocymène (4,4%), Myrcène (3,1%).	Mansouri <i>et al.</i> (2010) et Satrani <i>et al.</i> (2015)
Aurès (Algérie)	Feuilles	le sabinène (5,2-17,9%), α-cadinol (5,5-15,7%), terpinène-4-ol (5,4-9,4%), elémol (0,7-7,6%), δ-cadinène (3,3-6,1%), linalool (0,3-4,6%).	Zeraib <i>et al.</i> (2014a,b)

L'étude menée par Zeraib *et al.* (2014b) a montré que les huiles du taxon algérien inhibait la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, tandis que la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 n'a pas été affectée.

Il apparaît donc que les HEs des feuilles de *J. thurifera* sont les mieux étudiées. Les huiles des graines n'ont fait l'objet que d'une seule étude qui est celle de Hernandez *et al.* (1987) qui se sont intéressé à *J. thurifera* Var. *hispanica*. D'autre part, la composition chimique des graines du genévrier du Maroc et d'Algérie n'a jamais été rapportée.

## II. Généralités sur les huiles essentielles

### II.1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (Lardry et Haberkorn, 2007). La densité des HEs est généralement inférieure à celle de l'eau. De plus, elles sont hydrophobes et solubles dans les graisses, les alcools et les solvants organiques. Elles sont généralement incolores ou de couleur jaune pâle, mais quelques-unes sont très colorées comme celles de la camomille bleue (Gupta *et al.*, 2014).

### II.2. Répartition des huiles essentielles dans la plante

Plus de 3000 huiles essentielles ont été décrites dans la littérature avec plus de 300 usages commerciaux (Stefanakis *et al.*, 2013). Ces substances volatiles se rencontrent uniquement chez les plantes supérieures. Elles sont produites en quantités appréciables chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques (Djilani et Dicko, 2012).

Tous les organes de la plante sont capables de synthétiser les huiles essentielles (fleurs, feuilles, écorce, racines, fruits, graines, bois) (Ens *et al.*, 2009). Leur stockage se fait dans des cellules sécrétrices, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Bakkali *et al.*, 2008).

### II.3. Rôle des huiles essentielles

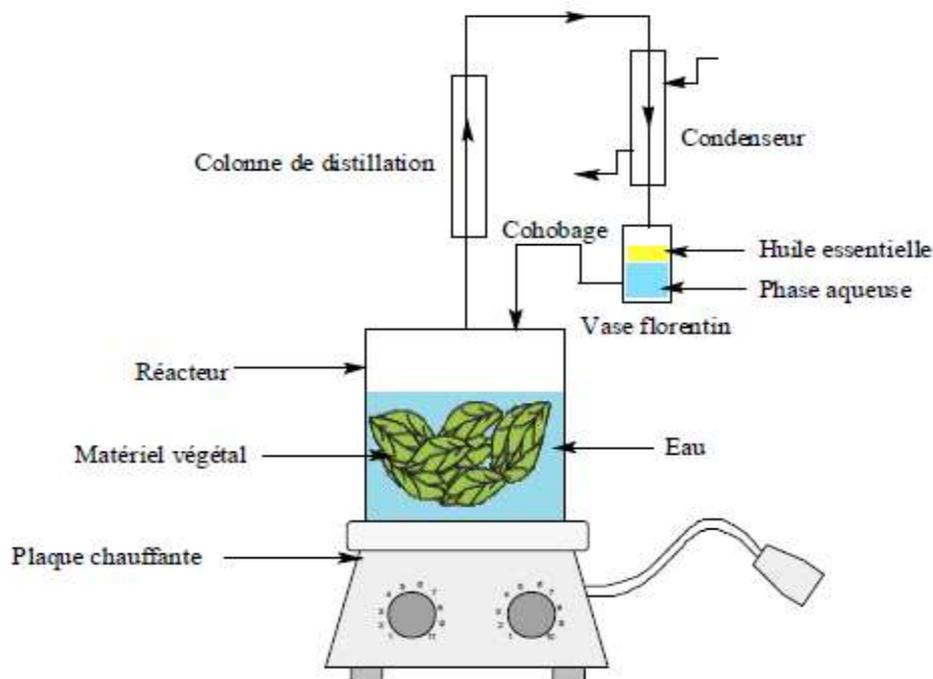
Les plantes synthétisent les huiles essentielles à diverses fins, notamment réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection des cultures en inhibant la multiplication des bactéries et champignons et contre les herbivores par leur effets défavorables sur le système nerveux (Ormeno *et al.*, 2007). Grâce à leur odeur, les huiles essentielles interviennent dans la pollinisation et jouent un rôle attractif ou répulsif vis-à-vis des prédateurs (Hamid *et al.*, 2011).

### II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites de la matière végétale par de nombreuses techniques anciennes : distillation à la vapeur d'eau, enfleurage (fleurs), expression (fruits)

et extractions par les solvants organiques (racines, feuilles, tiges) et nouvelles : extraction assistée par ultrasons, par liquide supercritique, par micro-ondes...etc.

L'hydrodistillation demeure la méthode d'extraction la plus fréquemment utilisée pour l'obtention des huiles essentielles (Figure 4).



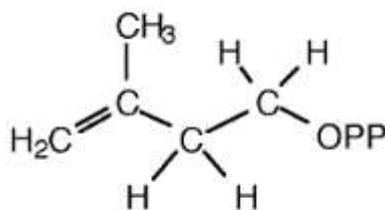
**Fig. 4:** Montage de l'hydrodistillation.

## II.5. Composition chimique des huiles essentielles

Les constituants des HEs appartiennent principalement à deux classes chimiques distinctes: les terpènes et les phénylpropanoïdes. Bien que les terpènes et leurs dérivés oxygénés (terpénoïdes) soient plus fréquents et plus abondants dans les huiles essentielles, certaines espèces contiennent de grandes quantités de phénylpropanoïdes qui confèrent une odeur et une saveur spécifiques à la plante (Baser et Buchbauer, 2015).

### II.5.1. Les terpénoïdes

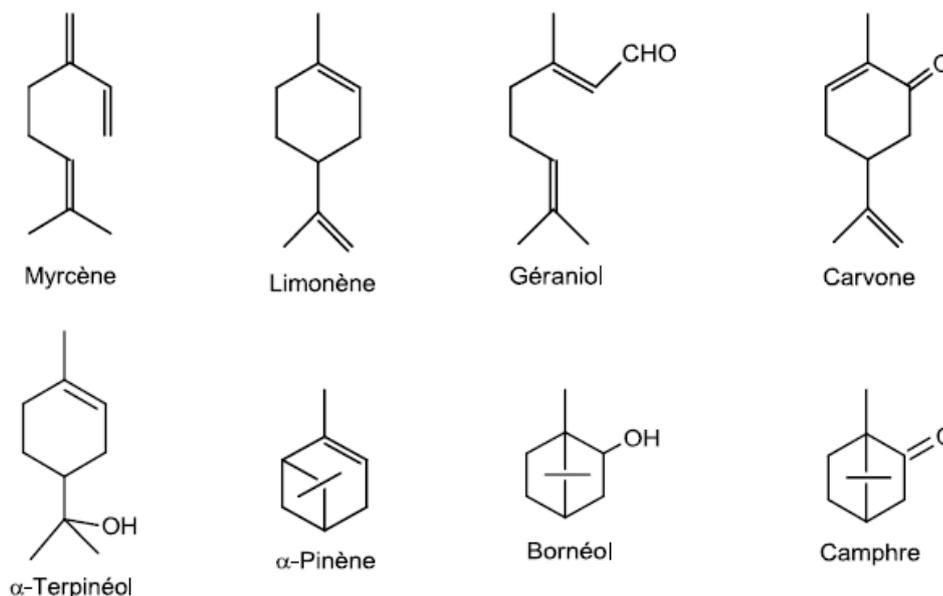
Les terpénoïdes renferment dans leur structure une unité isoprénique à cinq carbones ( $C_5H_8$ ) mais leur véritable précurseur est l'isopenténylpyrophosphate (Figure 5). Selon le nombre d'unités isopréniques associées, on distingue : les hémiterpénoïdes ( $C_5$ ), les monoterpènes ( $C_{10}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), les diterpènes ( $C_{20}$ ), les triterpènes, ( $C_{30}$ ) et les tétraterpènes ( $C_{40}$ ) (Moghaddam et Mehdizadeh, 2017).



**Fig. 5:** Structure de l'isopentényl pyrophosphate.

Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, pinène, terpinène, etc.) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène, etc.). Exceptionnellement, quelques diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Bakkali *et al.*, 2008).

Les composés terpéniques sont induits et émis par la plante en réponse à des facteurs biotiques et abiotiques internes (génétiques et biochimiques) et externes (écologiques) (Penuelas *et al.*, 1995). La plante émet également des composés terpéniques pour se protéger d'organismes pathogènes et d'autres espèces végétales (Holopainen, 2004).



**Fig. 6:** Structure de quelques terpènes.

### II.5.2. Les phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes forment un groupe important de métabolites secondaires synthétisés par les plantes à partir de la phénylalanine. Ils sont tous caractérisés par le même squelette carboné issu de la Phe: un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C6-C3). Ces composés aromatiques sont impliqués dans des fonctions diverses

telles que la protection contre les infections, les radiations ultraviolettes, les herbivores et les blessures (Andrade *et al.*, 2014).

## II.6. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

Il est bien admis que les profils chimiques des huiles essentielles sont fortement affectés par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques incluant les facteurs génétiques (espèce, chémotype) (Verma et Shukla, 2015), le stress biotique (attaques des agents pathogènes) (Taiz et Zeiger, 2006), les conditions climatiques (Rguez *et al.*, 2018) et édaphiques (type du sol, salinité) (Badawy *et al.*, 2018), le stade de développement des plantes (Moisa *et al.*, 2019), les organes prélevés (Bellili *et al.*, 2018), la période et la zone géographique de récolte (Shahbazi, 2016) ainsi que la méthode d'extraction (Younis *et al.*, 2007).

## II.7. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir). Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur (Hamid *et al.*, 2011).

Une méthode très couramment utilisée est le couplage d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM). Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse (Desjobert *et al.*, 1997).

Les techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie à haute performance sur couche mince (HPTLC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie sur colonne, sont utilisées pour la séparation des composants individuels du complexe parfumé.

### III. Place des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibiorésistance

#### III.1. Les antibiotiques

Utilisé pour la première fois en 1889, le terme antibiotique réfère à une substance produite par un microorganisme pour en détruire un autre. Plus tard, il désignera une substance chimique synthétisée par un microorganisme capables à faible concentration d'affecter la croissance des bactéries ou de les détruire (Muylaert et Mainil, 2013).

#### III.2. Cibles des antibiotiques

Bien que les bactéries utilisent de nombreux processus essentiels qui pourraient servir de cibles pour les antibiotiques, la plupart des médicaments actuels agissent sur un nombre limité de cibles (Payne *et al.*, 2007).

En fonction de leur mécanisme d'action, les antibiotiques sont classés en quatre groupes principaux: inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire, inhibiteurs de la synthèse des protéines, inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et anti-métabolites (Tenover, 2006). En général, les antibiotiques inhibent ces voies en interagissant avec des cibles de nature protéique (Figure 7).

Les antibiotiques sont divisés en familles: les bêta-lactamines, les aminosides, les macrolides, les cyclines, les quinolones, les polypeptides, les glycopeptides, les phénicolés, et les nitrofuranes. Les antibiotiques  $\beta$ -lactames comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases.

Les  $\beta$ -lactamines doivent se lier à des cibles spécifiques situées dans la membrane cytoplasmique des bactéries pour exercer leur effet inhibiteur. Ils agissent dans la phase finale (pariétale) de la biosynthèse des peptidoglycanes (Calvo et Martínez-Martínez, 2009).

D'autres antibiotiques interviennent dans le processus de la biosynthèse des protéines. Ils affectent les ribosomes bactériens, à savoir les sous-unités 30S et / ou 50S, en inhibant la synthèse des protéines aux phases initiale ou d'élongation, ou en induisant la synthèse de protéines anormales (Kohanski *et al.*, 2010).

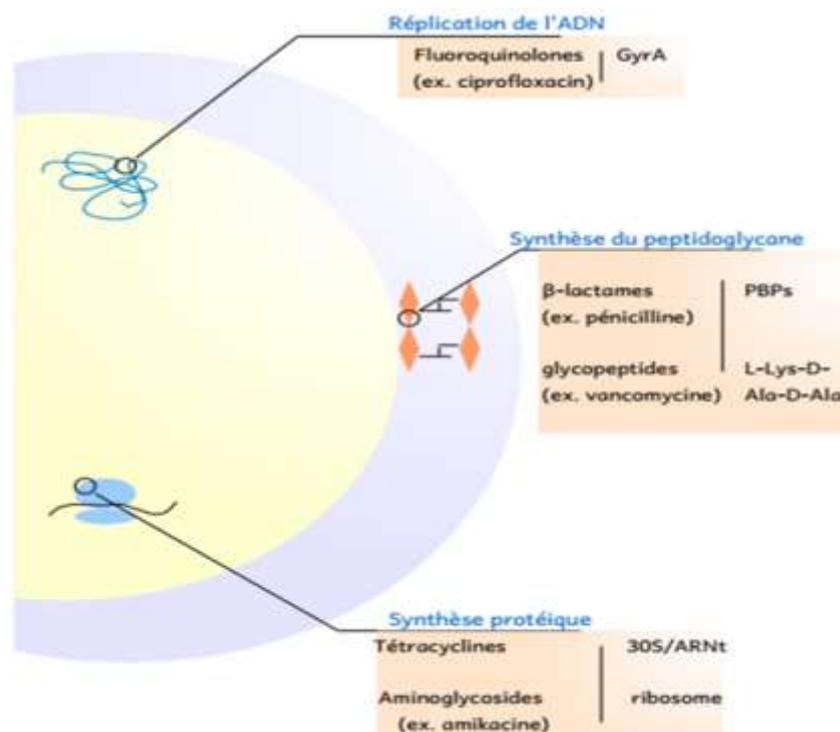


Fig. 7: Schéma des cibles de quelques classes d'antibiotiques (Godzaridis, 2012).

### III.3. L'antibiorésistance : causes et mécanismes

Aujourd'hui les antibiotiques risquent de perdre leur efficacité en raison de l'augmentation de la résistance microbienne. En effet, les échecs thérapeutiques associés aux bactéries multirésistantes sont devenus une préoccupation mondiale pour la santé publique (Guschin *et al.*, 2015). L'émergence et la propagation de l'antibiorésistance est due principalement à l'exposition massive des bactéries aux antibiotiques (Canton et Morosini, 2011). Administrés à titre curatif ou préventif, les antibiotiques favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection de souches plus résistantes. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006). Les souches résistantes vont rendre les traitements antibiotiques ultérieurs moins efficaces. La morbidité et la mortalité dues aux infections causées par des germes résistants sont plus élevées comparativement aux pathologies à bactéries sensibles aux antibiotiques (Boerlin et White, 2013).

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, un nombre limité de ces mécanismes ont été décrits. Les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le

remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule, et la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique (Guardabassi et Courvalin, 2006).

#### III.4. Potentiel antibactérien des huiles essentielles

Pour se défendre contre les pathogènes, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (Gibbons, 2008). Parmi ces molécules, les HEs se sont montrées efficaces contre bon nombre de souches bactériennes (Nazzaro *et al.*, 2013). Leur efficacité est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Oussou, 2009), mais aussi des composés mineurs qui y sont présents qui peuvent agir de manière synergique ou additive (Mourey et Canilla, 2002). Ce sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (Kalemba et Kunicka, 2003).

Plusieurs travaux ont montré l'efficacité des HEs sur des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Karaman *et al.*, 2001; Xianfei *et al.*, 2007; Sienkiewicz *et al.*, 2011; Bardaweel *et al.*, 2018). Cependant, les bactéries Gram négative paraissent moins sensibles à l'action des huiles essentielles et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. La bactérie Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* est reconnue comme la moins sensible à l'effet des HE (Dorman et Deans, 2000).

#### III.5. Modes d'action des huiles essentielles

Il est fort probable que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, résulte d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Carson *et al.*, 2002; Burt, 2004).

A cause de leur caractère hydrophobe, les HEs exercent leur fonction antibactérienne par plusieurs mécanismes: augmentation de la perméabilité membranaire, perturbation du transport membranaire par la modification du gradient ionique des deux côtés de la membrane cytoplasmique (Cox *et al.*, 2001), diminution des taux des acides gras insaturés responsables de la fluidité membranaire entraînant une modification structurale de la membrane (Di Pasqua *et al.*, 2007), inhibition des enzymes membranaires intégrées responsable de la biosynthèse des acides gras (Fitzgerald *et al.*, 2004) et affectation des protéines bactériennes causant une inhibition de la division cellulaire (Domadia *et al.*, 2007).

## **IV. Potentiel antioxydant des huiles essentielles**

### **IV.1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène**

Un radical libre est une molécule ou un atome qui contient un électron célibataire sur une orbitale (Leverve, 2006). Parmi les radicaux libres, ceux issus de l'oxygène moléculaire sont appelés les espèces réactives de l'oxygène (EROs). Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko *et al.*, 2007).

Le rôle des radicaux libres est très complexe car ils peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, au processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités des EROs pour percer la paroi membranaire de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Haleng *et al.*, 2007).

### **IV.2. Sources des radicaux libres**

La chaîne respiratoire et l'inflammation sont les deux sources majeures des EROs. Elles conduisent à la production des anions superoxyde, de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles (De Moffarts *et al.*, 2005). A côté de ces deux sources majeures d'autres facteurs viennent contribuer à la génération des radicaux libres. Parmi lesquels, le tabagisme, la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (Pincemail *et al.*, 2002).

### **IV.3. Le stress oxydant et ses conséquences**

Lorsque la production physiologique des radicaux libres au sein de l'organisme est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense: la balance antioxydants / pro-oxydants est en équilibre. Si ce n'est pas le cas soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, la conséquence de ce déséquilibre entre systèmes

producteurs d'ERO et systèmes de défense va entraîner un « stress oxydatif » (Xing *et al.*, 2012).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart de ces maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes (Sohal *et al.*, 2002).

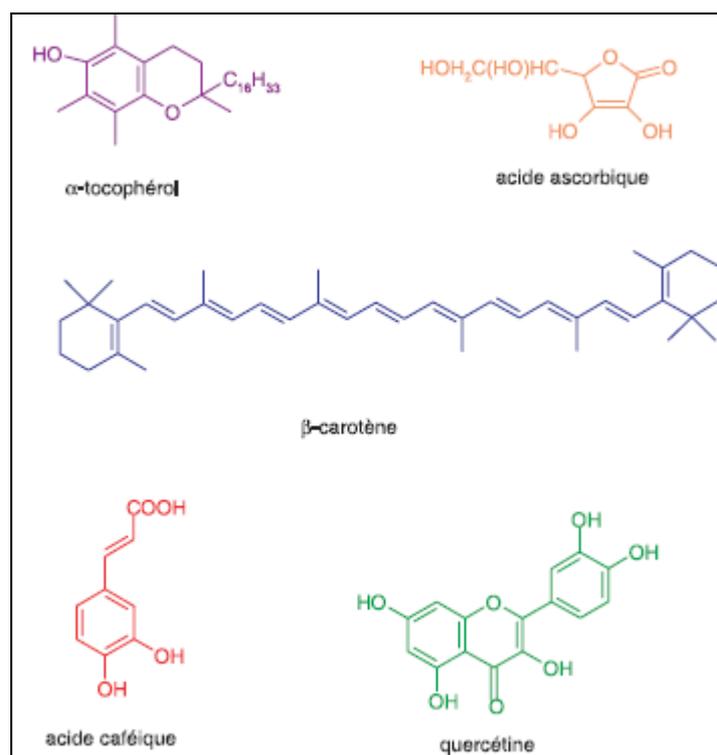
Le stress oxydatif provoque des lésions de macromolécules biologiques (ADN, protéines, lipides, glucides), avec pour conséquence une perte de leurs fonctions biologiques, mais aussi des lésions tissulaires (Pincemail *et al.*, 2002). Dans les membranes, l'oxydation des lipides et la réaction des produits d'oxydation avec les autres constituants membranaires vont altérer certaines fonctions biologiques cruciales telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'activité de récepteurs et d'enzymes (Cillard et Cillard, 2006).

#### **IV.4. Antioxydants et systèmes de défenses antioxydants**

L'organisme humain est équipé d'une variété d'antioxydants qui servent à lutter contre les effets du stress oxydant. Les mécanismes de défense endogènes reposent sur des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les principaux antioxydants enzymatiques sont: le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx) (Birben *et al.*, 2012). Ces systèmes sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Les systèmes antioxydants non enzymatiques regroupent quant à eux le glutathion et les protéines-thiols (dont l'albumine) contenant des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007).

En outre des antioxydants exogènes, essentiellement d'origine végétale, sont apportés par l'alimentation sous la forme de composés phénoliques, d'acide ascorbique et de caroténoïdes (Laguerre *et al.*, 2007). Les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons) (Pincemail *et al.*, 2002).



**Fig. 8:** Exemples d'antioxydants d'origine alimentaire.

$\alpha$ -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C),  $\beta$ -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols).

#### IV.5. Activité antioxydant des huiles essentielles

L'utilisation des antioxydants naturels est un domaine d'intérêt croissant. Ces antioxydants naturels peuvent être trouvés dans des légumes, des fruits, des épices et dans les extraits des plantes. En effet, les plantes sont connues pour être une source de divers composés antioxydants pouvant interagir avec les EROs.

Le potentiel antioxydant des HEs a été mis en évidence lors de nombreuses études (Emami *et al.*, 2011). Ce potentiel peut être attribué à leur teneur en composés terpéniques en plus des composés phénoliques. En effet, les terpènes sont considérés comme des antioxydants naturels à fort potentiel, qui pourraient être utilisés comme additifs dans les compléments alimentaires pour prévenir le stress oxydatif qui contribue à l'apparition de maladies dégénératives (Edris, 2007).

L'activité antioxydant des composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol est en relation avec leur structure 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 (Amorati *et al.*, 2013). L'activité antioxydant des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes:  $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène et l'  $\alpha$ -terpinolène (Edris, 2007).

## V. Potentiel allélopathique des huiles essentielles

### V.1. Connaissances sur l'allélopathie

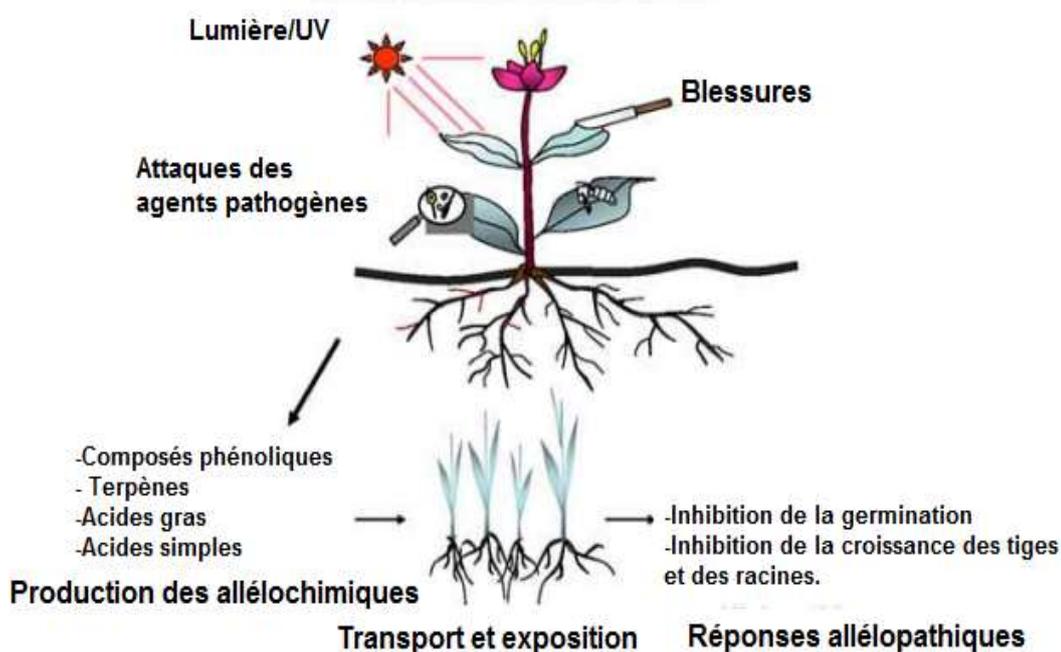
La manipulation massive des herbicides chimiques entraîne une contamination des sols et des eaux souterraines et augmente la résistance des mauvaises herbes (Abraham *et al.*, 2000). Actuellement, les effets néfastes sur la santé humaine et les préoccupations environnementales liées à l'utilisation irraisonnable de ces herbicides de synthèse font que la recherche de stratégies alternatives mettant en œuvre des composés biodégradables dans la gestion des mauvaises herbes est devenue une nécessité (Bich et Kato-Noguchi, 2012).

L'allélopathie est un phénomène connu depuis longtemps dont le rôle dans les écosystèmes naturels et les agroécosystèmes est très important (Saharkhiz *et al.*, 2016). C'est un mécanisme dans lequel une plante émet des substances dites «allélochimiques» dans l'environnement par le matériel végétal mort (litière) ou vivant. Ces substances influencent le développement des plantes voisines directement ou indirectement et leur effet est généralement négatif (Fitter, 2003).

### V.2. Place des plantes aromatiques dans l'allélopathie

Grâce à leur richesse en composés actifs, les plantes aromatiques peuvent jouer un rôle primordial dans les interactions plantes-plantes. Elles sont considérées comme une source d'allélochimiques naturels (Macias *et al.*, 2007).

Les substances susceptibles d'exercer une action allélopathique sont présentes dans presque toutes les plantes et leurs tissus, tels que les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs, les graines, l'écorce et les bourgeons (Scrivanti *et al.*, 2010). Elles appartiennent le plus souvent à la classe des métabolites secondaires (Ma *et al.*, 2012). Ces composés sont synthétisés en quantités souvent faibles par la plante, mais avec une variabilité très importante, ils regroupent les terpènes, les composés azotés ou alcaloïdes, ainsi que les composés phénoliques (Gallet et Pellissier, 2002). Les substances allélopathiques émises par les plantes s'accumulent dans le sol à des doses suffisamment importantes pour affecter directement la croissance des plantes voisines ou indirectement par l'altération des propriétés du sol y compris la structure de la communauté microbienne et les caractéristiques physico-chimiques (Weidenhamer et Callaway, 2010).



**Fig. 9:** L'allélopathie dans le système biologique (Amri *et al.*, 2013).

Les substances allélopathiques issues des plantes contribuent à réduire le recours aux herbicides de synthèse pour la gestion des mauvaises herbes. Il en résulte moins de pollution, des produits agricoles plus sûrs et atténuer les risques sur la santé humaine (Khan *et al.*, 2008).

### V.3. Phytotoxicité des huiles essentielles

Les HEs sont connues d'être impliquées dans les interactions allélopathiques inhibant la germination des graines et la croissance des plantes (Barbosa *et al.*, 2007). Ces propriétés ont été étudiées pour le développement d'herbicides. Dans ce contexte et compte tenu de la biodégradabilité favorable des composants des huiles essentielles, ils peuvent être considérés des outils alternatifs attrayants pour contrôler la croissance des mauvaises herbes (Isman, 2000).

Le potentiel des HEs à inhiber la germination et affecter la croissance des plantes a été démontré dans plusieurs études (Mahdavia et Saharkhiz, 2015; Saharkhiz *et al.*, 2016; Ibáñez et Blázquez, 2018). Ces propriétés allélopathiques inhibitrices ou stimulatrices sont attribuées à leur composition chimique, à la concentration et à l'espèce cible (Saharkhiz *et al.*, 2010).

Le degré d'interférence allélopathique diffère selon les espèces. Une telle toxicité sélective peut refléter une différence de résistance des plantes réceptrices et leurs capacités de détoxifier les phytotoxines (Li *et al.*, 2011). Les plantes cultivées se sont montrées plus sensibles comparées aux mauvaises herbes et leurs paramètres de germination et de croissance ont été sévèrement inhibés même à faible concentration (Mahdavia et Saharkhiz, 2015).

#### V.4. Modes d'action des allélochimiques

Les monoterpènes et les polyphénols exercent leur effet allélopathique par de multiples voies parmi lesquelles: l'altération de la photosynthèse et l'activité respiratoire (Singh *et al.*, 2006) et l'inhibition de la prolifération des cellules du méristème apical racinaire (Kaur *et al.*, 2010).

La mort des cellules racinaires peut survenir suite à l'action de quelques substances allélochimiques en facilitant la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dernières entraînent un déséquilibre hormonal pendant la germination des graines, la peroxydation des lipides et la désintégration des membranes (Mutlu *et al.*, 2011). Des effets synergiques ou additifs des constituants des HEs sont à l'origine de leur action allélopathique (Saharkhiz *et al.*, 2010).

#### V.5. Constituants des huiles essentielles à potentiel phytotoxique

Quelques auteurs se sont attachés à étudier le potentiel phytotoxique des constituants des HEs. L' $\alpha$ -pinène est capable d'inhiber la germination des graines et la croissance des racines primaires du maïs (Abraham *et al.*, 2000), du radis (De Feo *et al.*, 2002), de *Cassia occidentalis*, *Amaranthus viridis* et *Triticum aestivum* (Singh *et al.*, 2006), de *Raphanus sativus* et *Lepidium sativum* (De Martino *et al.*, 2010). Abraham *et al.* (2003) ont démontré que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le 1,8-cinéole et le camphre affectent l'activité respiratoire des mitochondries des axes hypocotyles du maïs et du soja.

Des effets phytotoxiques tels que l'inhibition de la germination, la vitesse de la germination, la croissance des plantules, la teneur en chlorophylle et l'activité respiratoire ont été rapportés pour le 1,8-cinéole (De Feo *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2006; De Martino *et al.*, 2010).

Il a été démontré que certaines huiles essentielles et leurs composés phénoliques: le carvacrol et le thymol, possèdent de puissants effets herbicides sur la germination des mauvaises herbes et croissance des plantules de différentes espèces de plantes (Angelini *et al.*, 2003).

## VI. Le docking moléculaire

### VI.1. Introduction

Grâce aux développements informatiques actuels, les recherches menées *in vitro* et *in vivo* dans les différents domaines sont renforcées par la modélisation moléculaire *in silico*. En biologie cet outil présente de nombreux avantages: réduire le nombre de tests *in vitro* et *in vivo*; améliorer un médicament déjà existant; comprendre le mécanisme d'action d'une substance d'intérêt thérapeutique et la création d'un nouveau médicament.

### VI.2. Le processus du docking

Le docking est une technique informatique dont le but est de prédire l'affinité entre deux molécules: le ligand (activateur ou inhibiteur) et la cible protéique (récepteur). L'étude des interactions probables entre la protéine cible et le ligand se fait par des logiciels qui recherchent les positions les plus favorables et ce en évaluant l'énergie d'interaction de chaque complexe protéine/ligand.

La structure des protéines est déterminée grâce à trois méthodes: la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X. Aujourd'hui, un nombre très important des structures protéiques sont disponibles dans une base de données accessibles gratuitement appelée la Protein Data Bank (PDB), dont la majorité sont déterminées par la cristallographie par rayons X (Berman *et al.*, 2000). Ceci a fait que la méthode du docking est de plus en plus utilisée dans la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

L'avantage de cette technique est de permettre des criblages en un temps limité et peu coûteux par rapport aux autres méthodes. De plus, le docking présente l'avantage de prendre en compte toutes les conformations possibles du ligand dans son milieu environnant complexe d'acides aminés. Par contre le point faible du docking est l'absence de la prise en compte de la structure dynamique de la protéine cible lors de la fixation du ligand (Rester, 2006).

Pour faire le docking, de nombreux logiciels sont actuellement disponibles. Ces logiciels diffèrent par la méthode utilisée: La première méthode consiste à explorer plusieurs positions du ligand (avec différentes conformations) à partir d'une position initiale aléatoire et pour chaque complexe ligand/protéine l'énergie d'interaction est

évaluée. Le complexe le plus stable (la meilleure position) est défini par l'interaction correspondant à la plus basse énergie. Dans la deuxième méthode: ajustement de fragments, le ligand est décomposé en plusieurs fragments puis reconstruit dans le site actif, en essayant de faire correspondre les géométries et les fonctions chimiques.

La performance du programme de docking est évaluée au moyen de la déviation quadratique moyenne (RMSD) (root-mean-square deviation). La valeur maximale de cette déviation ne doit pas dépasser 2 angströms sinon la prédiction est non adéquate (Vieth *et al.*, 1998).

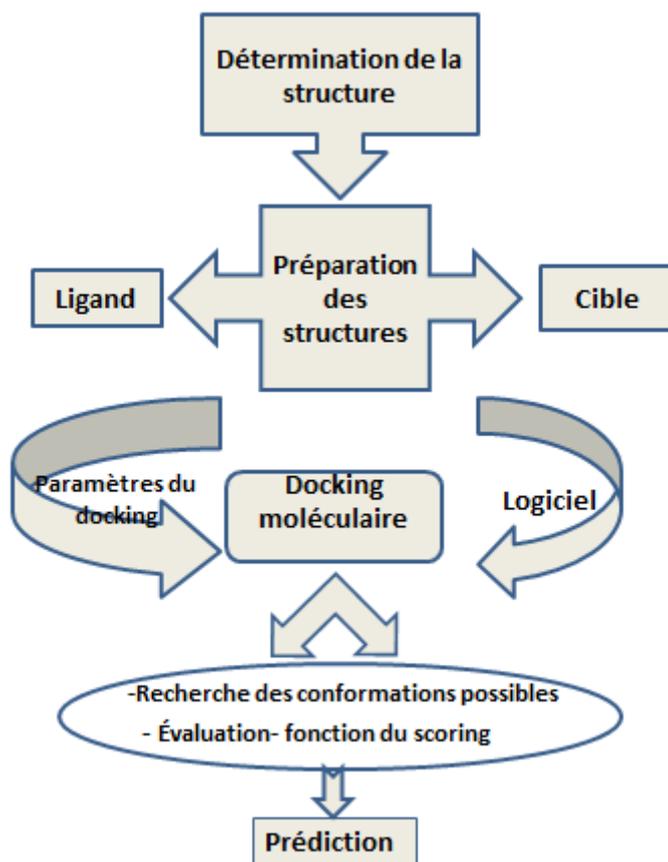
### VI.3. La fonction de scoring

Tous les programmes du docking comprennent deux étapes: rechercher toutes les conformations possibles du ligand; et évaluer ces conformations. Ils s'attachent donc, d'une part, à identifier les molécules capables de se lier au site actif du récepteur parmi toutes celles étudiées, mais aussi d'autre part, à déterminer les poses correctes de ces ligands lors de leur association avec la protéine cible (wodak et janin, 1978).

L'interprétation du docking se fait qualitativement par l'observation du ligand dans le site actif mais aussi quantitativement par la fonction du score. En effet, l'affinité entre la macromolécule et la petite molécule organique est quantifiée par le score. Cette fonction correspond à l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant: ( Kollman *et al.*, 2000).

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}}$$

Les solutions obtenues sont classées en fonction de l'énergie libre de la liaison ligand-protéine.



**Fig. 10:** Etapes du processus de docking.

#### VI.4. Approches du docking

Le ligand est défini comme étant une molécule chimique composée de plusieurs fragments, il peut être : un substrat, un coenzyme, un activateur ou un inhibiteur (Zsoldos *et al.*, 2006). La prise en compte de la flexibilité du ligand permet de distinguer deux approches de docking : l'approche à ligand rigide et l'approche à ligand flexible.

Le premier modèle de reconnaissance moléculaire auquel les premiers logarithmes du docking obéissaient était celui dit « clé-serrure » ou « lock-and-key » proposé par Fischer en 1894. Ce modèle propose une complémentarité géométrique entre le ligand et le site actif du récepteur en considérant les deux molécules comme étant rigides. Ce modèle a été amélioré conduisant à celui de Koshland 1958, qui propose la capacité du ligand et du récepteur à subir des changements de conformation qui conduisent à une adaptation des deux molécules l'une à l'autre. Ce dernier modèle a été par la suite adopté par les algorithmes du docking permettant ainsi la prise en compte de la flexibilité du ligand. Actuellement, la plupart des logiciels de docking utilisent l'approche à ligand flexible. Cette approche présente l'avantage de rendre possible le criblage de vastes bibliothèques de

molécules (Legler, 1984). Alors que l'approche du ligand rigide est utilisée comme premier filtre dans le docking car elle permet de supprimer les molécules aberrantes (absence de complémentarité avec le site actif, trop grandes...) (Watson *et al.*, 2001).

---

# *CHAPITRE II*

---

## *Matériel et Méthodes*

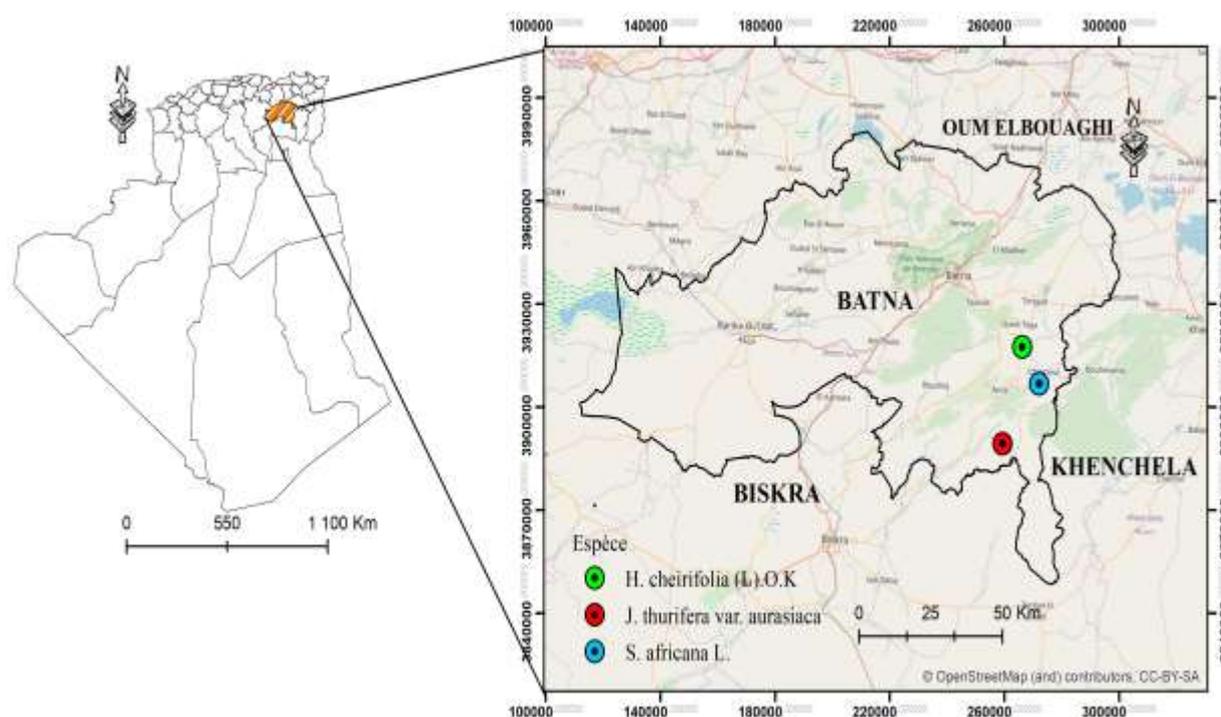
---

## I. Matériel

### I.1 Matériel Végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est composé des parties aériennes de *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* (L.) O.K collectées au stade de pleine floraison et les graines mûres de *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*.

Les plantes sélectionnées ont été récoltées de trois stations différentes de la wilaya de Batna (Figure 11), située au Nord-est de l'Algérie. Batna s'étend sur une superficie de 12.038,76 kms<sup>2</sup>. Le territoire de la wilaya est situé entre deux Atlas tellien et saharien. Les coordonnées géographiques des populations échantillonnées sont regroupées dans le tableau 4. L'identification des échantillons a été réalisée à l'aide de la flore de Quezel et Santa (1963) et confirmée par Dr. Zeraib A (Botaniste à l'université de Khenchela).



**Fig. 11:** Localités des plantes récoltées.

Les échantillons récoltés ont été séchés à température ambiante et à l'ombre, afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules. Les rameaux feuillés des espèces *S. africana* et *H. cheirifolia* ont été coupés en petits morceaux.

**Tableau 4 :** Coordonnées géographiques des populations échantillonnées.

Espèce	Stade phénologique	Localités	Coordonnées géographiques	Date de récolte
<i>S. africana</i> L.	Floraison	Ichmoul	35°16'50.11"N 6°29'38.22"E	Mai 2013
<i>H. cheirifolia</i> (L) O.K	Floraison	Ain tine	35°22'33.46"N 6°25'36.30"E	Avril 2013
<i>J. thurifera</i> var. <i>aurasiaca</i>	Fructification (Maturité)	T'kout	35° 7'14.30"N 6°21'33.71"E	Décembre 2015

## I.2. Souches bactériennes

L'effet antibactérien de nos huiles a été évalué sur quatre souches bactériennes de référence: deux Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332) et deux Gram– (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922).

## I.3. Antibiotiques

La sensibilité des quatre souches bactériennes a été testée vis-à-vis de trois antibiotiques: la Gentamicine (10µg/disque), l'Amoxicilline (25µg/disque), et la Céfazoline (30µg/disque).

## II. Méthodes

### II.1. Extraction des huiles essentielles

200g du matériel végétal séché de chaque espèce ont été utilisés pour l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur pendant au moins 3 heures en utilisant un appareil type Clevenger (Figure 12). Les huiles essentielles extraites ont été ensuite stockées à l'obscurité et à 4°C.



**Fig. 12:** Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

## II.2. Calcul de rendement

Le rendement en huile essentielle 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:

$$R = \frac{Ph}{Pmv} \times 100$$

**R:** Rendement en HE en % ;

**Ph:** Poids de l'HE en gramme ;

**Pmv:** Poids du matériel végétal sec en gramme.

## II.3. Analyse chimique des huiles essentielles

### II.3.1. Analyse par GC/MS

L'analyse des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Le chromatographe est du type BR5-MS (5% phenyl methyl siloxane) (30m x 0,32mm, épaisseur du film de 0,25 $\mu$ m) couplé à un spectromètre de masse (MS) de type DSQII (Thermo) avec détecteur d'électrons, 70 eV. Le gaz porteur est l'hélium à un débit de 1,2 ml/min. Chaque échantillon d'huile essentielle (1

microlitre) a été injecté en mode split 1:100. La température initiale de la colonne a été maintenue à 70°C pendant 1 min et programmée à 300°C à une vitesse de 10°C/ min et maintenue constante à 300°C pendant 5min. Le spectre de masse de chaque composé est enregistré entre 40 et 500Da (unité équivalente m/z).

### II.3.2. Identification des composants

Les constituants des huiles essentielles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse enregistrés avec ceux d'une bibliothèque informatique (NIST) fournis par le logiciel de l'instrument, et les spectres de masse de la littérature. Les indices de rétention (IR) ont été calculés par les temps de rétention d'une série de n-alcanes dans les mêmes conditions de fonctionnement. La quantité relative des composants individuels de chaque huile totale a été exprimée en pourcentage d'aire du pic par rapport à la zone de pic totale.

### II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### II.4.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion sur disque

Afin d'évaluer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles, la méthode de diffusion sur disque décrite par Dias *et al.* (2012) a été adoptée. Ce test est réalisé par dépôt d'un disque imprégné de l'HE à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé de la souche bactérienne. L'efficacité de l'huile essentielle testée *in vitro* se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition d'un diamètre facilement mesurable.

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des HEs est classée selon l'échelle de Ponce *et al.* (2003).

**Non sensible (-)** ou résistante: diamètre d'inhibition < 8mm.

**Sensible (+)** : diamètre d'inhibition compris entre 9 et 14mm.

**Très sensible (++)** : diamètre d'inhibition compris entre 15 et 19mm.

**Extrêmement sensible (+++)**: diamètre d'inhibition > 20mm.

#### ✓ Préparation de l'inoculum

Une mise en culture de la bactérie est réalisée dans la gélose nutritive à 37°C pendant 18 à 24h dans une étuve. 3 à 4 colonies bactériennes jeunes sont prélevées et

transférées dans 5ml d'eau physiologique (9%) stérile. La densité de la suspension bactérienne doit être équivalente au standard 0,5 de Mac-Farland. Elle devra ainsi contenir approximativement  $10^8$  CFU/ml (colony forming units/ml). Afin d'éviter l'augmentation de sa densité suite à la multiplication des bactéries, l'inoculum doit idéalement être utilisé dans les 15 à 30 minutes qui suivent sa préparation.

#### ✓ **Ensemencement des souches bactériennes**

Les boîtes de Pétri contenant 20 ml du milieu gélosé Muller Hinton Agar (MHA) sont ensemencées par l'inoculum bactérien préalablement préparé. Parallèlement, des séries de dilution successives selon une progression géométrique de raison 2 de chaque huile essentielle testée sont préparées dans le méthanol de façon à obtenir successivement les dilutions: 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16. Des disques de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 10 $\mu$ l de l'HE pure et chacune des différentes concentrations. Ensuite chaque disque est déposé à la surface de la boîte de Pétri déjà ensemencée.

#### ✓ **Incubation**

Les boîtes sont laissées 30 mn à température ambiante puis retournées et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Le méthanol est utilisé comme contrôle négatif et les tests sont effectués en triplicata pour chaque HE.

Après la période d'incubation, on procède à la mesure des diamètres des zones d'inhibitions produites autour de chaque disque en millimètre, disque inclus. Pour chaque huile essentielle, la concentration qui a donné le diamètre d'inhibition le plus faible sera utilisée dans le test de la combinaison des HEs avec les antibiotiques.

#### **II.4.2. Antibiogramme**

La même méthode décrite précédemment a été adoptée pour le test de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.

Trois antibiotiques ont été utilisés: la Gentamicine (10 $\mu$ g/disque), l'Amoxicilline (25 $\mu$ g/disque) et la Céfazoline (30 $\mu$ g/disque).

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface du milieu gélosé dans des boîtes ensemencées de chaque souche bactérienne. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h à 48h.

### II.4.3. Test de combinaison des HEs avec les antibiotiques

10µl de chaque concentration d'HE sélectionnée sont ajoutés aux disques d'antibiotiques. Ces derniers sont déposés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu MHA et ensemencées de chacune des souches bactériennes à tester. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h à 48h (Moussaoui et Alaoui, 2016).

Trois effets peuvent résulter de l'interaction entre l'HE et l'antibiotique :

-**Effet synergique** est produit lorsque le diamètre de la zone d'inhibition de l'association de l'HE et l'Ab est significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) à la somme des diamètres générés par les deux agents antibactériens pris séparément.

-**Effet additif** est observé lorsque le diamètre généré par l'association de l'HE et l'Ab est égale ( $p \geq 0,05$ ) à la somme des diamètres générés par les deux testés séparément.

- **Effet antagoniste** est observé lorsque la somme des diamètres des zones d'inhibitions de l'HE et l'Ab dépasse le diamètre produit par leur combinaison.

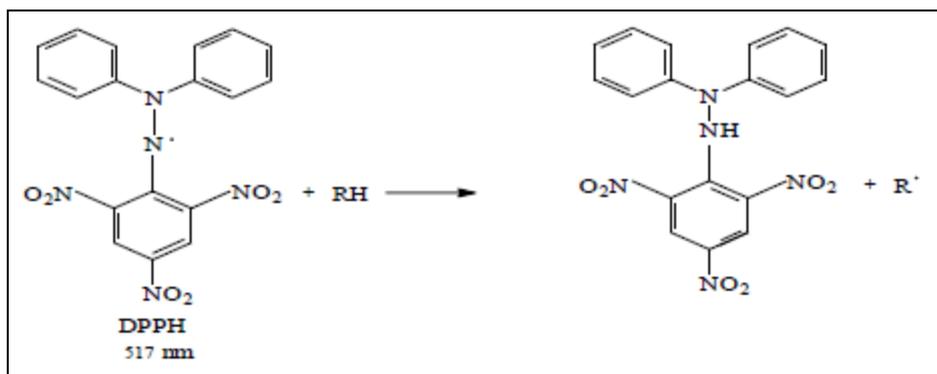
## II.5. Évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles

### II.5.1. Piégeage du radical DPPH (*Diphényl Picrylhydrazyle*)

#### ➤ Principe

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle est un radical libre très utilisé dans l'évaluation de l'activité antioxydant. Une solution de DPPH est colorée en violet. Mise en présence d'antioxydant (donneurs de proton) capable de réduire le radical DPPH à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (Figure 13), sa couleur tire vers le jaune. La diminution de la coloration est proportionnelle à l'activité antioxydant de l'extrait testé, elle est suivie par spectrophotométrie UV à 517nm.

L'équation de la réaction du DPPH avec une molécule donneuse de protons (RH) peut s'écrire:



**Fig. 13:** Réduction du radical DPPH par une molécule donneuse de protons.

### ➤ Mode opératoire

L'activité de piégeage des radicaux DPPH des huiles essentielles a été mesurée comme décrit par Doshi *et al.* (2015). Brièvement, 100µl de chaque huile essentielle solubilisée dans le méthanol a été ajoutée à 900 µl de solution de DPPH (0,1µM) fraîchement préparée. Après agitation, le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un blanc (mélange sans huile essentielle). L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant standard. Il a été préparé dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I%) a été calculé selon la formule:

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Avec :

I% : Le pourcentage d'inhibition

A<sub>0</sub>: Absorbance du blanc.

A: Absorbance de l'échantillon contenant une dose d'huile testée.

### II.5.2. Test de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

#### ➤ Principe

La méthode de FRAP est utilisée pour investiguer l'activité antioxydant d'un extrait par l'évaluation de son pouvoir réducteur vis-à-vis du cation ferrique Fe<sup>3+</sup>.

Le pouvoir réducteur de l'extrait à tester se traduit par sa capacité à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> présent dans un complexe de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> de

couleur jaune en fer ferreux  $Fe^{2+}$  de couleur bleu. La variation de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700nm. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait.

### ➤ Mode opératoire

225 $\mu$ l de chaque HE à différentes concentrations sont ajoutés à 225 $\mu$ l du tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 225 $\mu$ l de  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. Après agitation, le mélange est incubé pendant 20 mn dans un bain marie à 50°C. Par la suite, 225 $\mu$ l de l'acide trichloroacétique TCA à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés pendant 10mn à 3000 rpm. 375 $\mu$ l du surnageant recueilli sont mélangés avec 375 $\mu$ l d'eau distillée et 75 $\mu$ l de chlorure ferrique à 0,1%. Le blanc est identiquement préparé sauf que l'HE est remplacée par le méthanol. L'absorbance est lue à 700nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif (Tundis *et al.*, 2013).

## II.6. Tests de phytotoxicité

### II.6.1. Test de la germination

Les graines saines (sans anomalies) de blé dur (*Triticum durum*) et de la laitue (*Lactuca sativa*) ayant presque la même taille, sont désinfectées par de l'eau de javel (15%) pendant 10min puis rincées au moins 3 fois à l'eau distillée. Après la désinfection, 10 graines de blé dur et 30 graines de laitue ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur un tapis en papier filtre stérile Whatman N°1, imbibés avec 5 ml de chaque huile essentielle à différentes concentrations (100, 200, 400, 800 et 1600 $\mu$ l/l) préparées dans une solution de Tween 20 dans l'eau distillée (0,84%, V/V).

Les boîtes de Pétri fermées et scellées avec un ruban adhésif sont maintenues à température ambiante (environ 25°C). Un témoin est réalisé en utilisant la solution de Tween 20 dans l'eau distillée. La germination a été suivie directement dans les boîtes de Pétri. Le nombre de graines germées est comptabilisé toutes les 24h. On considère qu'une semence est germée lorsque la radicule saillit à travers l'enveloppe de la graine d'environ 2mm (Mahdavia et Saharkhiz, 2015).

Les essais ont été disposés aléatoirement avec trois répétitions y compris le témoin. Le taux de germination de chaque échantillon, issu de triplicata, est ensuite comparé à celui du témoin.

Trois paramètres de germination ont été calculés :

✓ **Taux de germination**

$$TG = n \cdot 100 / N$$

Où **n** est le nombre de graines germées, **N** est nombre de graines semées (Jalaei *et al.*, 2015).

✓ **Vitesse de germination**

$$VG = N_1 + (1/2)N_2 + (1/3)N_3 + \dots + (1/T)N_t, \text{ Où}$$

$N_t$  est le nombre de graines germées entre le jour  $t$  et  $t-1$  (Graña *et al.*, 2013).

## II.6.2. Test de croissance

A la fin de l'essai, c'est-à-dire le 7<sup>ème</sup> jour, la longueur de la racicule et de la partie aérienne des plantules traitées ainsi que celles témoins sont mesurées, et les rapports entre ces longueurs sont calculés. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type d'allongement de la racicule et de la partie aérienne.

## II.7. Analyses statistiques

Tous les résultats des tests biologiques ont été présentés en moyenne  $\pm$  écart type des trois répétitions. Pour les différences statistiques l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur et les tests post hoc ont été effectués en utilisant le logiciel STATISTICA 8.0 (Hill et Lewicki, 2007). La différence est considérée comme statistiquement significative quand  $P < 0,05$ .

## II.8. Docking moléculaire

Afin d'atteindre le double objectif de rechercher les constituants des HEs étudiées responsables de l'activité antibactérienne d'une part et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces constituants, nous avons procédé à la méthode du docking moléculaire «*in silico*».

### II.8.1. Structures des ligands

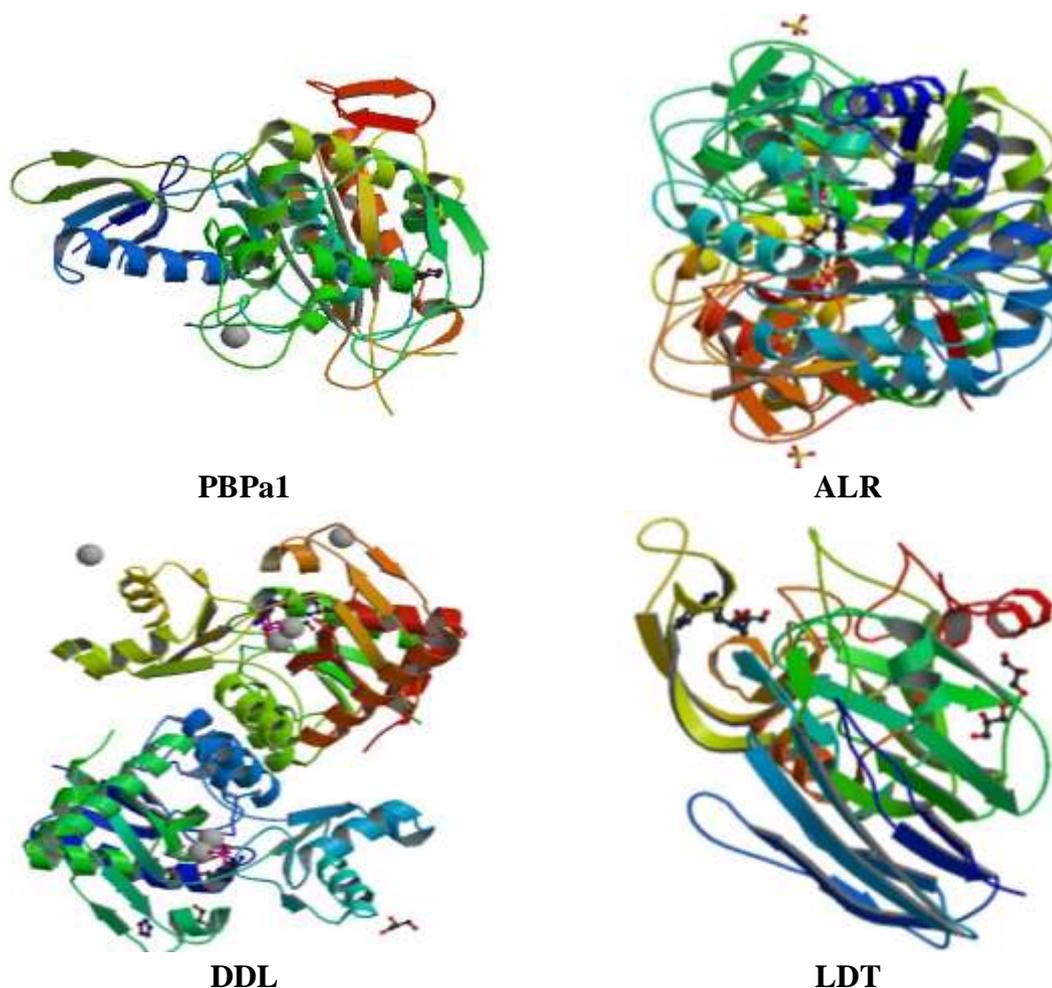
Au total, 83 composés des HEs étudiées ont été téléchargés sous format SDF de la banque de données PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Annexe 1).

## II.8.2. Structures des protéines cibles

Les protéines utilisées dans cette études sont tirées de la PDB Banque de dépôt de structures biologiques cristallographiques «Protein Data Bank» sous forme de complexes (protéine-ligand).

En s'appuyant sur les résultats du test de la combinaison des HEs étudiées avec les antibiotiques, nous avons choisi de nous focaliser sur les cibles des antibiotiques de la classe des B-lactames, classe à laquelle appartiennent la céfazoline et l'amoxicilline.

Les cibles protéiques des B-lactames choisies sont : Penicillin-Binding Proteins-a1 (PBP-a1) (Job *et al.*, 2008), Alanine Racémase (ALR), D-Alanyl-D-Alanine ligase (DDL) (Batson *et al.*, 2017), et L, D-Transpeptidase 2(LDT) (Kumar *et al.*, 2017). Les données relatives aux protéines cibles choisies sont présentées dans le tableau 5.



**Fig. 14:** Structure cristallographique des protéines cibles choisies pour le test *in silico*. **PBP-a1:** Penicillin-Binding Proteins-a1. **ALR:** Alanine Racémase. **DDL:** D-Alanyl-D-Alanine ligase. **LDT:** L, D-Transpeptidase 2.

**Tableau 5:** Protéines cibles utilisées dans le docking moléculaire.

Protéine	ID PDB	Classification	Chaîne	Résolution
PBP <sub>a1</sub>	2V2F	Transférase	A	1.9 Å
ALR	4WR3	Isomérase	A, B, C, D	1.9 Å
DDL	4C5B	Ligase	A, B	1.5 Å
LDT	5K69	Transférase/inhibiteur de transférase.	A, B	2.001 Å

### II.8.3. Processus du docking

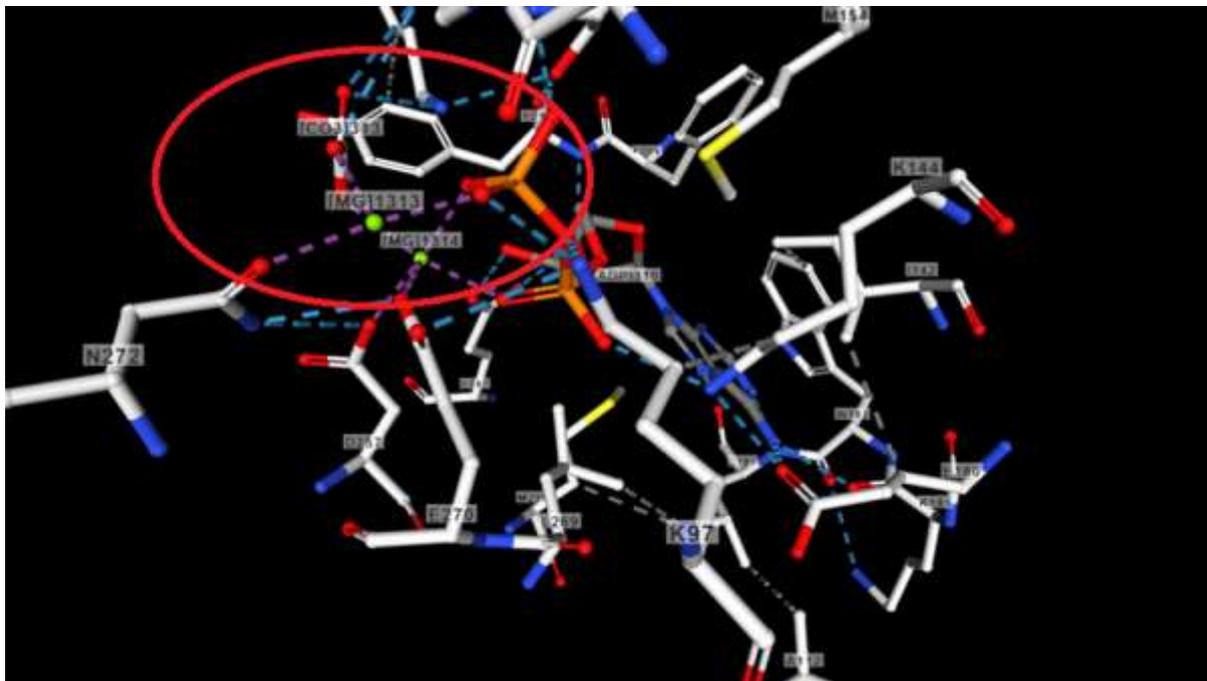
Les docking effectués dans cette étude ont été assistés par le logiciel MOE. Notre choix a porté sur ce logiciel pour les nombreux avantages qu'il présente: Interface simplifiée pour la conception de ligand, détection et analyse de sites actifs, visualisation des interactions, conception interactive de ligand dans la poche, diagrammes d'interaction protéine-ligand, préparation automatisée des structures protéine et ligand et calcul de l'énergie libre (<https://www.chemcomp.com/Products.htm>).

Après avoir téléchargé les complexes protéine-ligand dans le format pdb à partir de la banque de données en introduisant leur codes ID, on a procédé à la préparation des deux structures ligand et protéine avant de les soumettre au docking.

Les molécules d'eau ont été retirées pour la stabilité des protéines, des atomes d'hydrogène polaires ont été ajoutés. Certains résidus qui ne sont pas impliqués dans la réaction catalytique de l'enzyme sont éliminés (sels et métaux). Le site actif de chaque protéine est identifié en utilisant le localisateur du site «MOE site finder». Après la sélection du site actif, l'énergie des deux structures protéine et ligand est minimisée sous les conditions suivantes: Température égale à 300°K et pH égal à 7. La géométrie a été déterminée en utilisant les forces de champ dans le MMFF94x implanté dans le MOE et hamiltonien AM1.

Après quelques secondes à quelques minutes, selon la taille du ligand, nous pouvons observer sur l'écran le ligand qui vient se placer dans le site actif de l'enzyme. La meilleure énergie d'interaction est alors donnée directement sur l'écran ainsi que le temps de calcul. Le RMSD est déterminé en sélectionnant en même temps le ligand de référence et le ligand arrimé et en choisissant l'option «calcul du RMSD».

**Remarque:** Pour la DDL on a supprimé les atomes d'eau et les métaux à l'exception de CO3 (molécule 313) et deux atomes de Mg (molécules 1313 et 1314) qui font partie de site actif de la protéine (Figure 15).



**Fig. 15:** Illustration du site actif de la DDL.

«Le cercle en rouge montre les atomes Mg1313, Mg1314 et CO<sub>3</sub>313».

---

# *CHAPITRE III*

---

## *Résultats et Discussion*

---

## I. Composition chimique des huiles essentielles

### I.1. Huile essentielle de *Santolina africana*

#### I.1.1. Rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation de la partie aérienne de *S. africana* récoltée durant la période de floraison a donné une huile jaunâtre avec une agréable et forte odeur dont le rendement est de 0,76%.

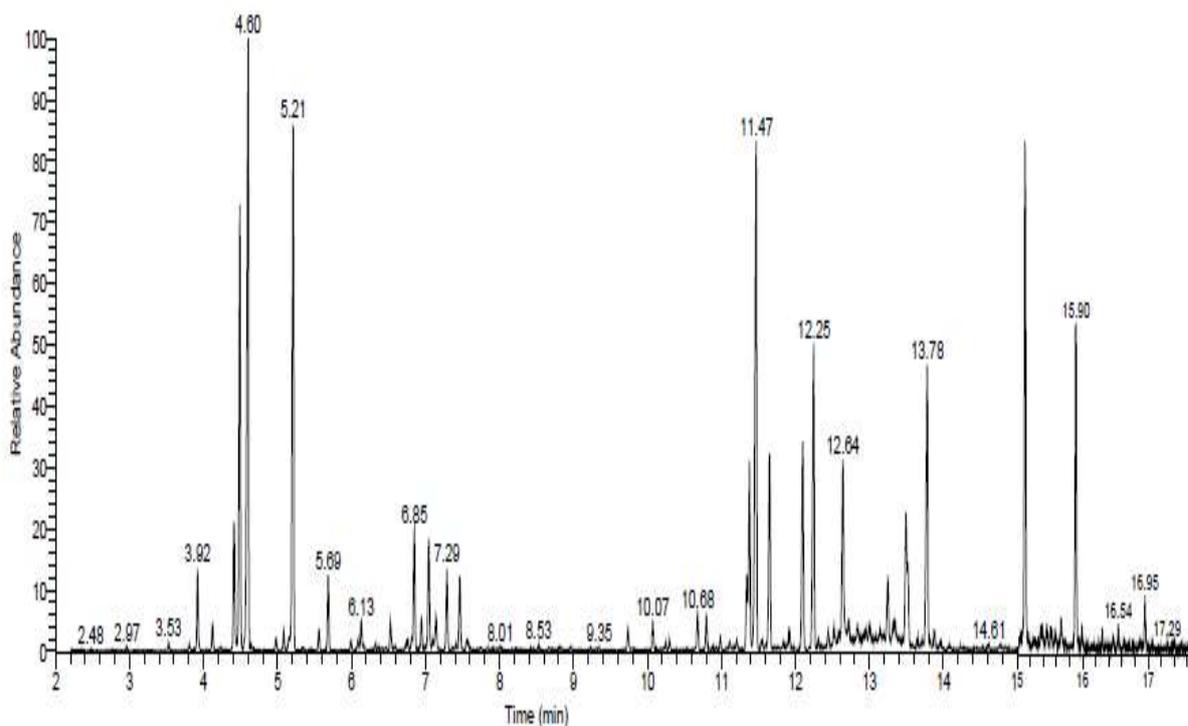
Pour *S. africana* de l'Algérie, Zaiter *et al.* (2015) ont rapporté que la partie aérienne a fourni un rendement de 0,8% qui est similaire à celui obtenu au cours de cette étude, alors que Derouiche *et al.* (2013) ont enregistré un rendement nettement supérieur qui est de 2,25% à partir des fleurs de la même espèce. D'autre part, la partie aérienne de l'espèce voisine *S. chamaecyparissus* collectée à Alger a donné un rendement faible qui est de 0,21% (Djeddi *et al.*, 2012).

Pour les huiles essentielles issues de *S. africana* du Maroc, Fdil *et al.* (2011) ont rapporté un rendement similaire à notre résultat qui est de 0,75% pour les feuilles. Les mêmes auteurs ont obtenu des rendements différents pour les fleurs (0,93%) et pour les tiges (0,11%). L'hydrodistillation de la partie aérienne de la même espèce de la Tunisie a fourni un rendement en huile essentielle de 0,5% (Attia *et al.*, 2012) contre 0,86% obtenu à partir de la même partie de *S. africana* du Maroc (Lmachraa *et al.*, 2014).

De nombreux facteurs peuvent être à l'origine des différences dans le rendement en huiles essentielles comme l'origine géographique et les facteurs climatiques (température et humidité) (Almas *et al.*, 2019), le site et la période de récolte (Vuerich *et al.*, 2019), le stade de croissance et l'organe végétal (Yuan *et al.*, 2016), la période de conservation (Ali et Jumma, 2019), la méthode et les conditions d'extraction des huiles (Tran *et al.*, 2019). Des différences dans le rendement en HE entre les plantes exposées à la lumière et d'autres cultivées à l'ombre ont été rapportées (Mambri *et al.*, 2018).

#### I.1.2. Composition chimique de l'HE de *S. africana*

L'analyse de l'huile essentielle obtenue par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) (Figure 16), a permis l'identification de 46 composants représentant 91,98% de l'huile totale (Tableau 6).



**Fig. 16:** Chromatogramme de l'huile essentielle de *S. africana*.

Le  $\beta$ -pinène (11,65%), le germacrène-D (10,33%) et le 1,8-cinéole (9,46%), constituent les composés majoritaires de cette huile, ces trois composés constituent à eux seuls 31,44% du total de l'essence. D'autres composés sont présents avec des taux importants, le sabinène (7,18%), l'hédycaryol (5,79%) et l' $\alpha$ -bisabolol (5,63%) (Figure 17).

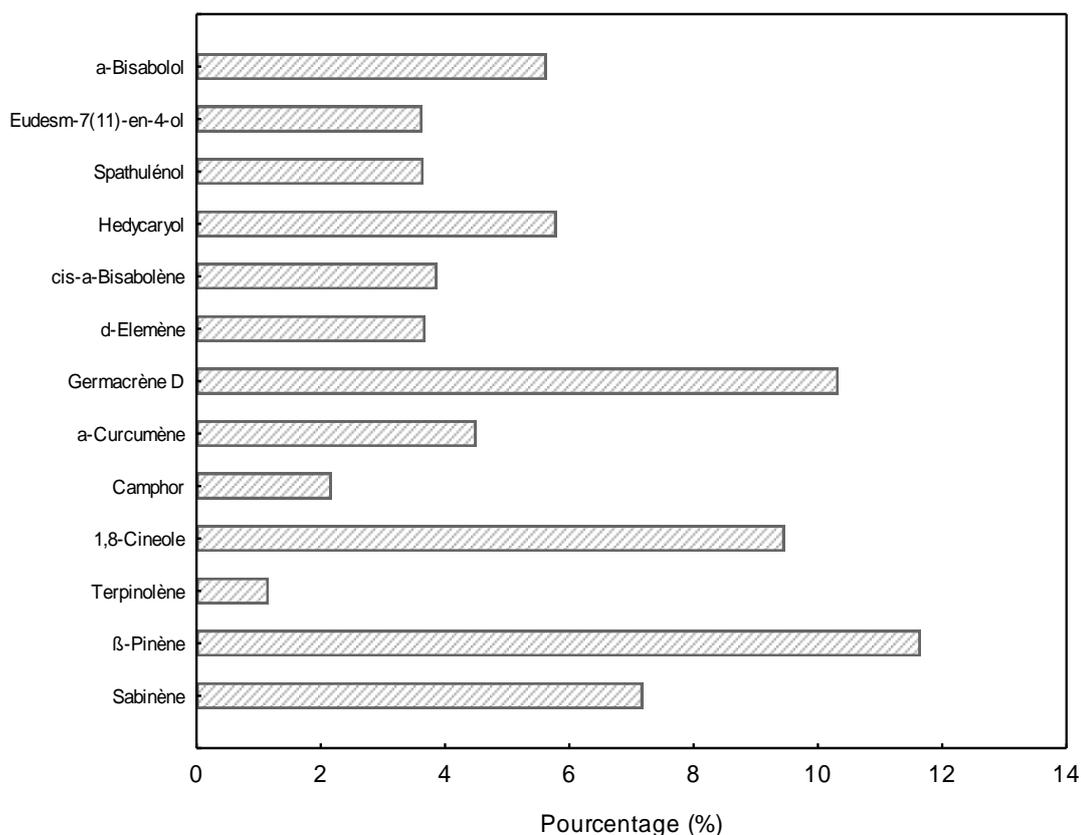
La composition chimique de notre huile présente des similitudes avec celle de la même espèce récoltée à Constantine en Algérie par Zaiter *et al.* (2015) qui ont trouvé comme composants majoritaires le  $\beta$ -pinène (12,78%), le 1,8-cinéol (10,02%), le curcumène (7,96%) et le myrcène (6,94%). Par contre, la composition de notre huile diffère de celle des fleurs de la même espèce décrite par Derouiche *et al.* (2013), dont les composés dominants étaient l'acénaphthane (25,23%), le calarène (21,54%), l'ocimène (17,44%), l' $\alpha$ -farnesène (5,35%) et le tricyclo 5,1,0,0,2,4octane-5-carboxylic acid, 3,3,8,8, tetramethyl-,méthyl ester (8,17%).

**Tableau 6:** Composition chimique de l'huile essentielle de *S. africana*.

N°	KI	Composé	Pourcentage (%)
1	857	(Z)-hex-3-en-1-ol	0,08
2	908	Santolinatriène	0,11
3	924	$\alpha$ -thujène	0,11
4	932	$\alpha$ -pinène	1,23
5	946	Camphène	0,42
6	948	Verbinène	2,23
7	968	<b>Sabinène</b>	<b>7,18</b>
8	978	<b><math>\beta</math>-pinène</b>	<b>11,65</b>
9	1021	$\alpha$ -terpinène	0,2
10	1022	<i>o</i> -cymène	0,28
11	1062	$\gamma$ -terpinène	0,32
12	1086	Terpinolène	1,16
13	1031	<b>1,8-cinéole</b>	<b>9,46</b>
14	1092	(z)-p-menth-2-en-1-ol	0,76
15	1124	Chrysanthénone	0,48
16	1140	Camphor	2,17
17	1140	cis- $\beta$ -terpinéol	0,49
18	1140	cis-verbénol	1,97
19	1147	Bornéol	0,9
20	1151	terpinène-4-ol	1,35
21	1161	$\alpha$ -terpinéol	1,33
22	1198	Myrténol	0,27
23	1324	Myrtényl acétate	0,1
24	1325	p-mentha-1,4-dièn-7-ol	0,13
25	1360	Eugénol	0,39
26	1374	$\alpha$ -copaène	0,5
27	1408	(Z)caryophyllène	0,64
28	1411	cis- $\alpha$ -bergamotène	0,56
29	1415	$\alpha$ -caryophyllène	0,2
30	1437	$\alpha$ -guaiène	0,25
31	1470	$\alpha$ -curcumène	<b>4,5</b>
32	1480	<b>Germacrène D</b>	<b>10,33</b>
33	1335	$\delta$ -elemène	3,68
34	1478	$\gamma$ -muurolène	0,18
35	1523	$\delta$ -cadinène	0,49
36	1527	<b>cis-<math>\alpha</math>-bisabolène</b>	<b>3,87</b>
37	1540	<b>Hedycaryol</b>	<b>5,79</b>
38	1578	Spathuléol	3,65
39	1582	caryophyllène oxide	0,78

40	1579	Isoaromadendrène époxide	0,31
41	1590	Globulol	0,32
42	1640	$\alpha$ -epi-cadinol	0,32
43	1645	Cubénol	0,28
44	1665	$\beta$ -eudesmol	1,30
45	1667	Non identifié	0,94
46	1672	Eudesm-7(11)-en-4-ol	3,63
47	1685	<b><math>\alpha</math>-bisabolol</b>	<b>5,63</b>
48	1799	Non identifié	1,32
49	1911	Non identifié	0,84
<b>Total identifié</b>			<b>91,98</b>
<b>Hémiterpènes</b>			<b>0,08</b>
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>			<b>24,89</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>			<b>19,8</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>			<b>25,2</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>			<b>22,01</b>

KI: indice de Kovats, les composés majoritaires sont représentés en gras.



**Fig. 17:** Principaux composés chimiques de l'HE de *S. africana*.

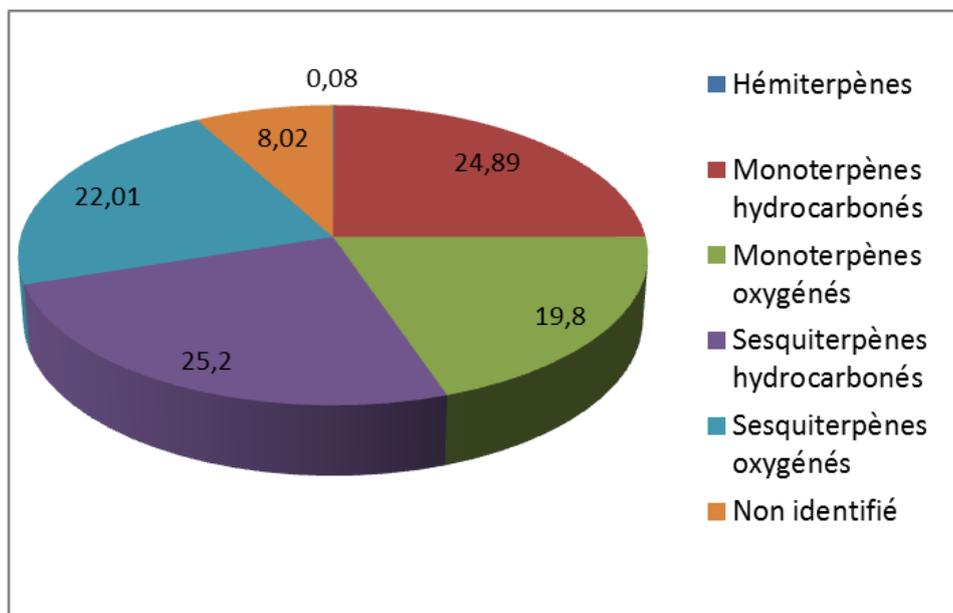
La composition chimique de notre huile est différente par rapport aux profils chimiques rapportés dans la littérature de la même espèce récoltée en Tunisie et au Maroc. Les constituants dominants dans l'huile essentielle des échantillons tunisiens sont: le terpinèn-4-ol (54,96%), l' $\alpha$ -terpinéol (14,06%), le bornéol (8,37%), le trans-chrysanthénol (3,65%), le camphor (3,61%), et le 1,8-cinéole (3,59%) (Attia *et al.*, 2012a). Les huiles des tiges, feuilles et fleurs de *S. africana* de la vallée de Tahanaout au Maroc sont dominées par le camphor (69,14%, 71,37% et 80,44% respectivement) suivi par le bornéol (20,33%, 18,13% et 12,34% respectivement) et l'acétate de bornyl (7,08%, 8,12% et 3,50% respectivement) (Fdil *et al.*, 2011). Les mêmes composés majoritaires ont été rapportés par Lmachraa *et al.* (2014) à partir de la partie aérienne de *S. africana* du Maroc: le camphor (54,30%), le bornéol (17,24%), le bornyl acétate (8,61%) et le 1,8-cinéole (5,27%).

Les huiles essentielles de *S. chamaecyparissus* de l'Algérie sont composées essentiellement de l'artémisia ketone (40,33%), le Z-thujone (9,82%), le limonène (6,87%), le camphène (3,14%) et le  $\beta$ -pinène (2,67%) (Nouasri *et al.*, 2015). L'essence de la même espèce analysée par Djeddi *et al.* (2012) est dominée par le camphor (31,1%) et le cubéol (17,0%).

Des profils chimiques différents ont été décrits pour les huiles essentielles des autres espèces du genre *Santolina*. Celles de *S. corsica*, originaire de Sardaigne se caractérisent par la présence du camphre (18,5%), d'artémisia cétone (12,9%) et du bornéol (7,4%) alors que les huiles corses se composent d'artémisia cétone (20,0%), de  $\beta$ -phéllandrène (14,4%), de myrcène (11,7%) et de santolina triène (8,2%) (Poli *et al.*, 1997).

D'après Fdil *et al.* (2011), les espèces du genre *Santolina* et ses variétés présentent manifestement une variabilité remarquable de la composition chimique de leurs huiles essentielles. Cette variation d'ordre qualitatif et quantitatif, peut être attribuée à plusieurs facteurs: les conditions climatiques, les variations saisonnières, la période de récolte, la localisation géographique et le stade de croissance (El-Alam *et al.*, 2019).

La majorité des constituants de l'huile essentielle de *S. africana* identifiés sont des monoterpènes et des sesquiterpènes qui sont présents en quantités équivalentes (monoterpènes: 44,69%, sesquiterpènes: 47,21%), tandis que la concentration de la fraction hydrocarbonée est supérieure à celle de la fraction oxygénée (50,09% et 41,81% respectivement) (Figure 18).



**Fig. 18:** Répartition des familles de composés chimiques de l'HE de *S. africana*.

Onze hydrocarbures monoterpéniques représentant 24,89% de l'huile essentielle ont été identifiés. Le  $\beta$ -pinène (11,65%), le sabinène (7,18%) et le verbinène (2,23%) sont les composés majoritaires de cette classe chimique à côté de l' $\alpha$ -pinène (1,23%) et le terpinolène (1,16%). Les monoterpènes oxygénés (19,8%) sont représentés majoritairement par le 1,8-cinéole (9,46%), le camphor (2,17%), le cis-verbénol (1,97%), le terpinene-4-ol (1,35%) et l' $\alpha$ -terpinéol (1,33%).

Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont présents avec un taux de 25,2%. Le principal composé de cette fraction est le germacrène-D (10,33%) suivi par l' $\alpha$ -curcumène (4,5%), le cis- $\alpha$ -bisabolène (3,87%) et l' $\delta$ -élémente (3,68%). Dix constituants sont des sesquiterpènes oxygénés (22,01%), représentés principalement par l'hedycaryol (5,79%), l' $\alpha$ -bisabolol (5,63%), le spathulenol (3,65%) et l'eudesm-7(11)-en-4-ol (3,63%).

Des études ont confirmé la prévalence de la fraction hydrocarbonnée dans les HES extraites des espèces du genre *Santolina* (Liu *et al.*, 2007; Derouiche *et al.*, 2013; Nouasri *et al.*, 2015; Zaiter *et al.*, 2015).

## I.2. Huile essentielle de *Hertia cheirifolia*

### I.2.1. Rendement en huile essentielle

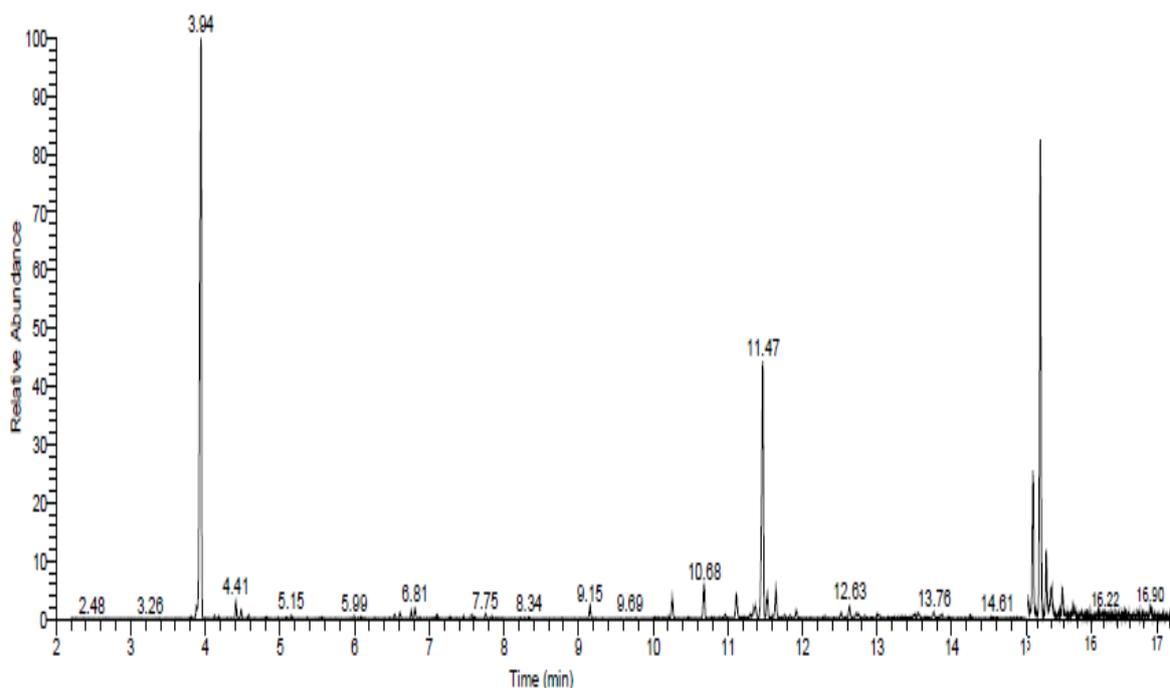
L'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de *Hertia cheirifolia* est de couleur jaunâtre à odeur forte et fétide.

Le rendement déterminé par rapport à la matière sèche est de 0,68%. Il est similaire à celui obtenu à partir des feuilles de la même espèce collectée à Oum el-bouaghi (0,7%) (Segueni *et al.*, 2017) et de la partie aérienne collectée en Tunisie (T-ejrouine) (0,7%) (Attia *et al.*, 2012).

### I.2.2. Composition chimique de l'HE de *H. cheirifolia*

L'analyse de l'huile essentielle de *H. cheirifolia* par CPG/SM a permis d'identifier 34 constituants représentant 95,64% de l'huile essentielle totale (Figure 19 et Tableau 7).

L' $\alpha$ -pinène (48,38%), le germacrène D (20,91%), le drimenin (3,44%) et le  $\beta$ -caryophyllène (2,48%) sont les composés majoritaires de cette huile (Figure 20).

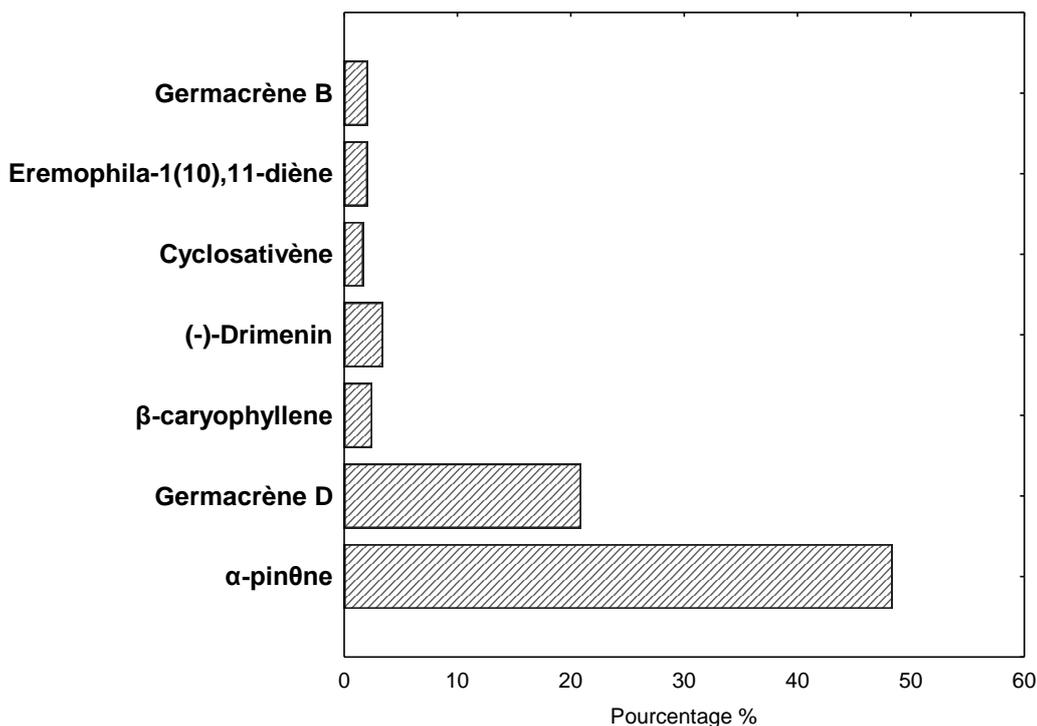


**Fig. 19:** Chromatogramme de l'huile essentielle de *H. Cheirifolia*.

**Tableau 7:** Composition chimique de l'huile essentielle de *H. cheirifolia*.

N°	KI	Composé	Pourcentage (%)
1	927	<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>48,38</b>
2	937	Camphène	0,16
3	954	Sabinène	1,01
4	958	$\beta$ -pinène	0,52
5	963	$\beta$ -myrcène	0,22
6	995	Limonène	0,25
7	1043	$\alpha$ -terpinène	0,22
8	1049	Linalool	0,11
9	1074	$\alpha$ -campholénal	0,26
10	1087	4(10)thujèn-3-ol	0,38
11	1090	cis-verbénol	0,72
12	1118	Terpinène-4-ol	0,14
13	1136	Myrténol	0,32
14	1147	Verbénone	0,31
15	1152	trans-carveol	0,19
16	1236	Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	0,82
17	1312	$\beta$ -elemène	1,55
18	1342	<b><math>\beta</math>-caryophyllène</b>	<b>2,48</b>
19	1362	$\alpha$ -guaïène	0,24
20	1374	$\alpha$ -humulène	1,84
21	1392	Cyclosativène	1,7
22	1399	<b>Germacrène D</b>	<b>20,91</b>
23	1404	<b>Eremophila-1(10),11-diène</b>	<b>2,06</b>
24	1413	<b>Germacrène B</b>	<b>2,09</b>
25	1422	Guaïa-10(14),11-diène	0,23
26	1434	$\delta$ -cadinène	0,57
27	1490	Spathuléol	1,06
28	1497	Caryophyllène oxide	0,76
29	1549	$\alpha$ -cadinol	0,29
30	1562	$\gamma$ -himachalène	0,54
31	1703	Anthracène, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9,10-diméthyl	1,11
32	1771	<b>(-)-Drimenin</b>	<b>3,44</b>
33	1776	3-éicosyne	0,43
34	1781	Phénylthioacetic acid, 4-méthoxyphényl ester	0,33
<b>Total identifié</b>			<b>95,64</b>
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>			<b>50,76</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>			<b>3,25</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>			<b>35,32</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>			<b>2,11</b>
<b>Sesquiterpènes lactones</b>			<b>3,44</b>
<b>Autres</b>			<b>0,76</b>

KI: indice de Kovats, les composés majoritaires sont représentés en gras.



**Fig. 20:** Composés majeurs de l'huile essentielle de *H. cheirifolia*.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Majouli *et al.* (2016b) qui ont révélé la dominance de l' $\alpha$ -pinène dans les HEs de *H. cheirifolia* récoltée de la région de Thala en Tunisie. Les principaux composés de l'huile essentielle des fleurs sont l' $\alpha$ -pinène (70,4%), le germacrène D (6,7%), l' $\alpha$ -cadinol (3,2%) et le sabinène (2,3%) (Majouli *et al.*, 2016b, 2017). Tandis que l'essence de la partie aérienne est dominée par l' $\alpha$ -pinène (62,5%), le germacrène D (9,5%), l' $\alpha$ -cadinol (2,7%), le sabinène (2,1%) et le  $\beta$ -caryophyllène (1,7%) alors que les racines contiennent principalement l' $\alpha$ -pinène (22,1%), le valencène (13,2%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,8%), le germacrène A (7,6%), le  $\alpha$ -terpinyl acétate (6,9%) et le germacrène D (5,9%) (Majouli *et al.*, 2016b).

Les huiles essentielles des feuilles, boutons floraux, fleurs et fruits de *H. cheirifolia* collectée en Sousse contiennent principalement l' $\alpha$ -pinène (12,67-35,63%), le germacrène D (5,25-13,18%), type drimane sesquiterpène lactone (13,81-34,08%) et drimenin (27,29-32,55%) (Rahali *et al.*, 2017).

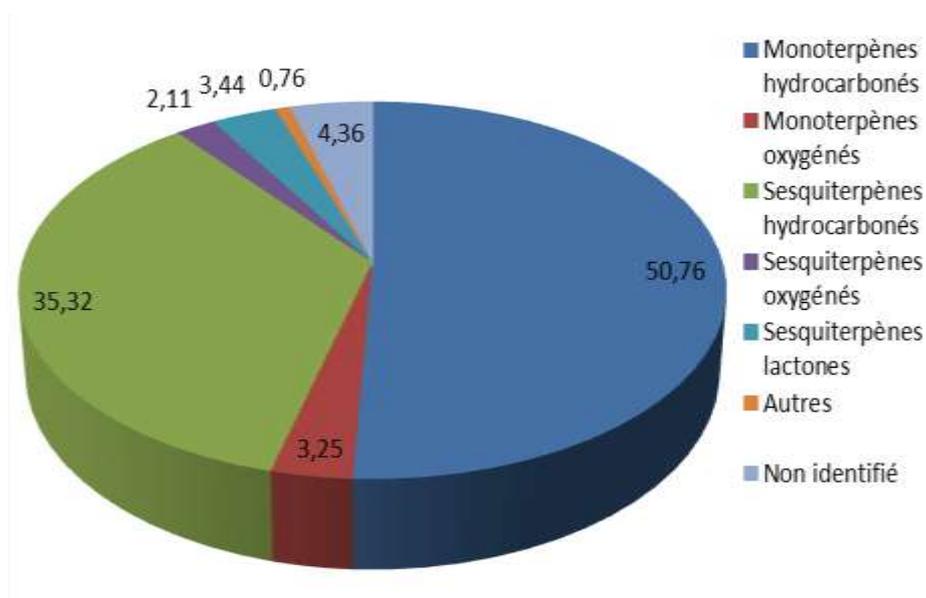
A la différence de nos résultats, Attia *et al.* (2012) ont rapporté le thymol (61,0%) et le 2,6-diméthoxyphénol (12,83%) comme composés majeurs de l'HE de la partie aérienne (feuilles et tiges) de *H. cheirifolia* collectée à Tégorouine en Tunisie. Le thymol est

totallement absent dans notre huile, alors que le 2,6-diméthoxyphénol ne représente que 0,33%.

Les composés dominants l'huile des fleurs de *H. cheirifolia* d'Oum El Bouagui analysée par Seguni *et al.* (2017) étaient l'acide 1,2-benzenedicarboxylique, le mono (2-ethylhexyl ester) (33,71%), le valéranone (6,9%), le (-)-drimenin (6,71%) et le benzène, tert-butyl (3,06%). Ceux des feuilles de *H. cheirifolia* de la même région récoltées au stade végétatif contiennent une forte teneur en (-) drimenin (67,5%), 1,2-di (2-pyridinyl)-1,2-ethanediol (11,2%), globulol (1,7%) et cycloheptane, 4-méthylène-1-2-(2-méthyl-1-propenyl)-1-vinyl-(1,5%) (Zellagui *et al.*, 2012).

Notre huile essentielle est dominée par les composés monoterpéniques hydrocarbonés avec un taux de 50,76%. Le principal composant est l' $\alpha$ -pinène qui représente à lui seul 48,38% de l'huile totale. Pour les monoterpènes oxygénés, neuf composés ont été identifiés représentant 3,25% de l'huile.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont bien représentés dans notre huile avec onze composés représentant 35,32% de l'huile totale. Les composés majeurs de cette fraction sont: le germacrène-D (20,91%) et le  $\beta$ -caryophyllène (2,48%). Les sesquiterpènes oxygénés sont présents à 2,11%, tandis que les sesquiterpènes lactones sont représentés par un seul composé: le drimenin (3,44%) (Figure 21).



**Fig. 21:** Répartition des familles de composés chimiques de l'huile essentielle de *H. cheirifolia*.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la classe majoritaire dans les huiles essentielles des fleurs et la partie aérienne de *H. cheirifolia* récoltée à Thala en Tunisie. Alors que les sesquiterpènes hydrocarbonés étaient dominants dans les racines (Majouli *et al.*, 2016b).

Rahali *et al.* (2017), ont rapporté que les huiles essentielles des feuilles, boutons floraux, fleurs et fruits de *H. cheirifolia* poussant dans la région de Sousse en Tunisie se sont révélées riches en lactones sesquiterpéniques (41,10-66,61%) suivies par les hydrocarbures monoterpéniques (13,61-38,61%) et les hydrocarbures sesquiterpéniques (5,51-17,92%).

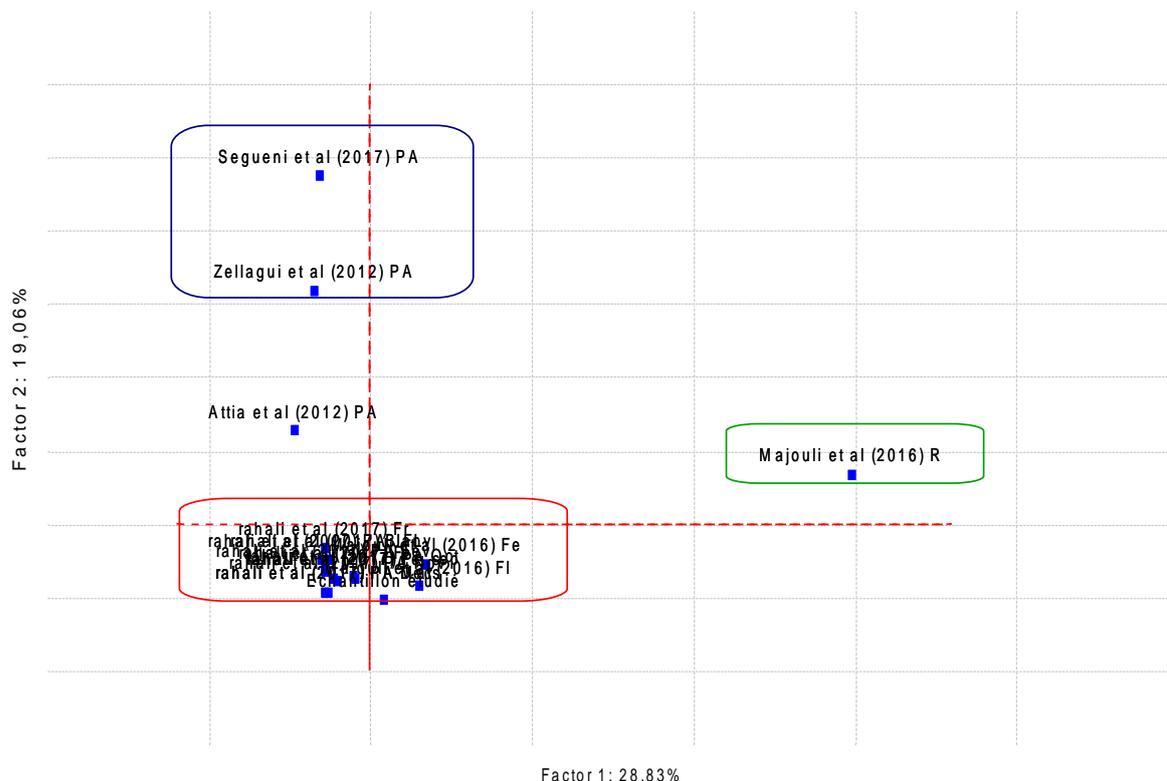
Il est à signaler que les huiles essentielles de *Hertia cheirifolia* rapportées dans la littérature présentent une très grande variabilité chimique. Majouli *et al.* (2016b) ont attribué cette variation à plusieurs facteurs tels que les conditions agro-climatiques (climatiques, saisonnières, géographiques) de la région, le stade phénologique, le métabolisme adaptatif des plantes, les conditions de l'extraction et la partie de la plante analysée.

Selon l'étude menée par Rahali *et al.* (2017), une variation significative dans la composition chimique des huiles des feuilles de *H. cheirifolia* selon le stade phénologique a été détectée. Les hydrocarbures monoterpéniques dominent le stade végétatif, les sesquiterpènes lactones caractérisent le stade de pleine floraison et le début de la fructification, alors que l'accumulation la plus importante des sesquiterpène hydrocarbonés a été enregistrée dans les feuilles collectées au stade de fructification.

Arneth *et al.* (2008) et Schnitzler *et al.* (2010) ont signalé l'impact significatif des changements climatiques au cours des saisons (température, humidité, rayonnement UV-B, CO<sub>2</sub> atmosphérique, etc.) sur la synthèse des terpènes. En effet, les effets climatiques pourraient être traduits directement sur l'activité de plusieurs enzymes, telles que l'isopentényl diphosphate isomérisé et prényltransférases, qui catalysent la synthèse de nombreux terpènes, ou indirectement par la diminution ou altération du métabolisme primaire il en résulte une insuffisance des métabolites photosynthétiques impliqués dans la biosynthèse des terpènes.

Pour bien situer l'HE analysée dans cette étude par rapport aux huiles essentielles de la même espèce provenant de différentes régions en Algérie et en Tunisie, nous avons opté pour une analyse en composantes principales (ACP) suivie par une analyse par classification ascendante hiérarchisée (CAH).

Dans l'analyse en composantes principales, nous avons pris en considération les trois premiers axes qui expliquent 63,3% de la variabilité observée (Figures 22-24).

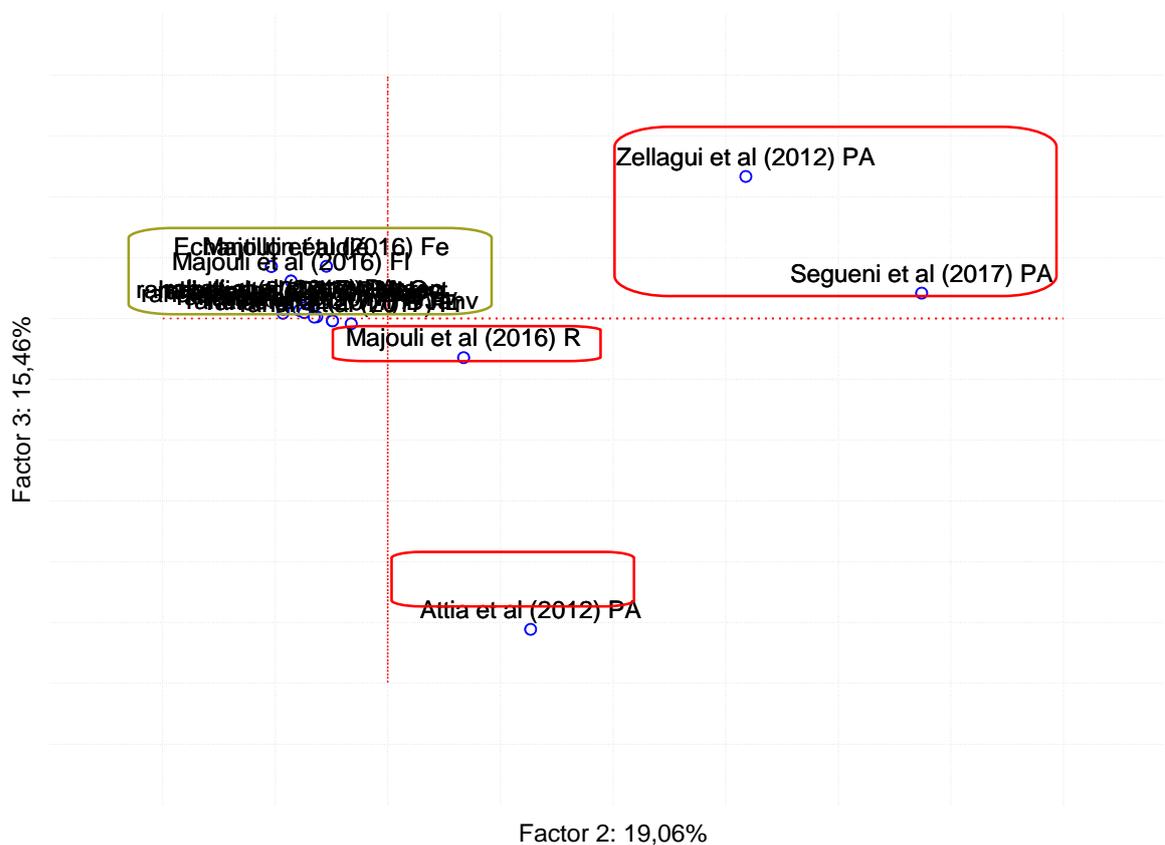


**Fig. 22:** ACP des huiles essentielles de *H. cheirifolia* rapportées dans la littérature et l'huile essentielle étudiée (axe1 et 2).

L'échantillon de Majouli *et al* (2016b) racines situé dans la partie positive de l'axe 1 est caractérisé principalement par des teneurs élevées en Valencène,  $\alpha$ -terpinyl acétate,  $\beta$ -élémane,  $\beta$ -caryophyllène et germacrène-A.

La partie positive de l'axe 2 est occupée par les HES de Zellagui *et al.* (2012) et Segueni *et al.* (2017) qui présentent un faible taux de l' $\alpha$ -pinène et du germacrène D. en outre, l'échantillon de Segueni *et al.* (2017) est riche en monoéthylhexyl phthalate, valéranone et T-butylbenzène. Tandis que l'HE de Zellagui *et al.* (2012) est riche en drimenin (67,5%).

L'HE d'Attia *et al.* (2012) située dans la partie négative de l'axe 3, a la particularité d'être la seule huile contenant le thymol (61%), le 2,6-dimethoxy-phenol (12,83%), le camphor (5,82%), le 1,-8-cineole (1,29%), le 6-méthyl-alpha-ionone (1,27%) et un taux élevé de 4-Terpineol (5,84%) et  $\alpha$ -terpinéol (3,58%) par rapport aux autres huiles.

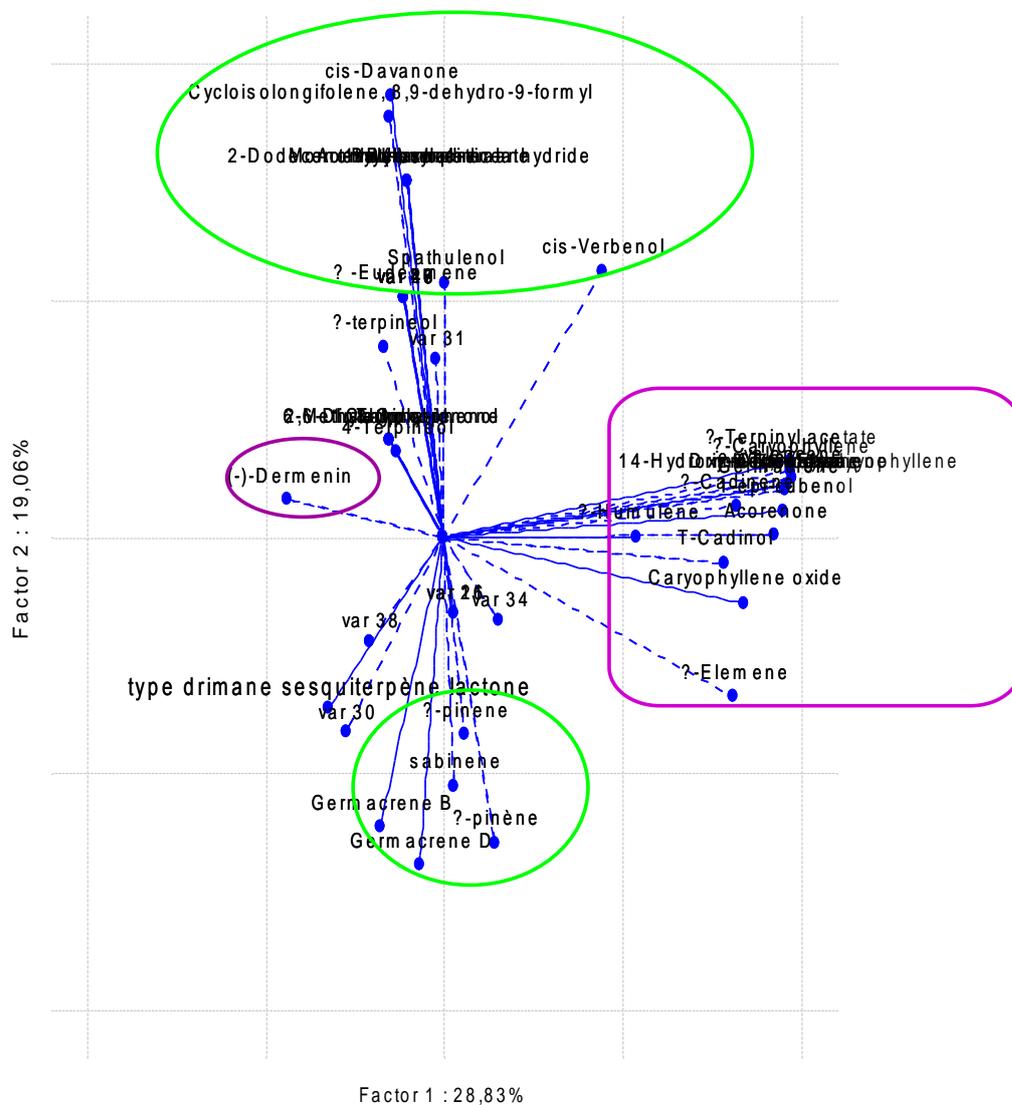


**Fig. 23:** ACP des huiles essentielles de *H. cheirifolia* rapportées dans la littérature et l'huile essentielle étudiée (axe2 et 3).

Le reste des HES y compris notre HE forment ensemble un groupe bien distinct dont la principale caractéristique est leur richesse en  $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\beta$ -pinène, germacrène D et germacrène B. A l'intérieur de ce grand groupe, on peut distinguer trois sous-groupes :

Notre échantillon qui se caractérise par sa plus forte teneur en germacrène D (20,91%) et la présence du Eremophila-1(10),11-diène (2,06%).

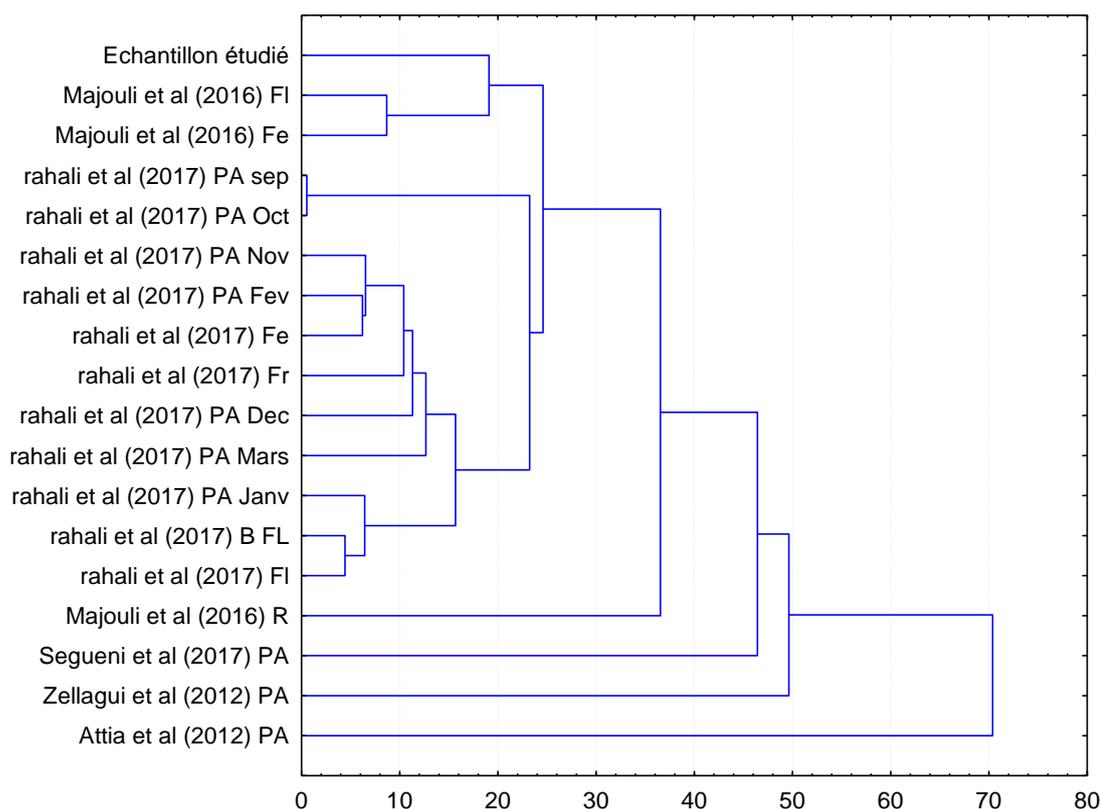
Le deuxième sous-groupe incluant les HEs de Majouli *et al.* (2016b) extraites des feuilles et des fleurs qui diffèrent principalement des autres HEs par des concentrations plus fortes en  $\alpha$ -pinène (70,4% et 48,38%).



**Fig. 24:** ACP des composés chimiques des huiles essentielles de *H. cheirifolia* rapportées dans la littérature et l’huile essentielle étudiée (axe1 et 2).

Le dernier sous-groupe correspond aux échantillons de Rahali (2017) qui ont la particularité de renfermer le Drimane type sesquiterpene (27,19% à 34,08%) et le Drimenin (27,29% à 32,55%) comme composés majoritaires.

L’analyse par classification ascendante hiérarchisée (CAH) a permis de bien visualiser les différents groupes mis en évidence par l’ACP (Figure 25).



**Fig. 25:** Dendrogramme des échantillons des HEs de *H. cheirifolia* rapportées dans la littérature et l'HE étudiée en fonction de leurs compositions chimiques.

L'ACP et la CHA ont permis de mettre en évidence une variabilité importante des HEs de *H. cheirifolia*. Les résultats ont montré que la composition chimique de notre huile riche en  $\alpha$ - pinène et germacrène D est plus proche des échantillons tunisiens et diffère largement des échantillons algériens analysés par Zellagui *et al.* (2012) et Segueni *et al.* (2017) et celui de Attia *et al.* (2012). Pour mieux caractériser les huiles essentielles de cette espèce, des études ultérieures couvrant toute son aire de répartition s'avèrent être nécessaires.

### I.3. Huile essentielle de *Juniperus thurifera*

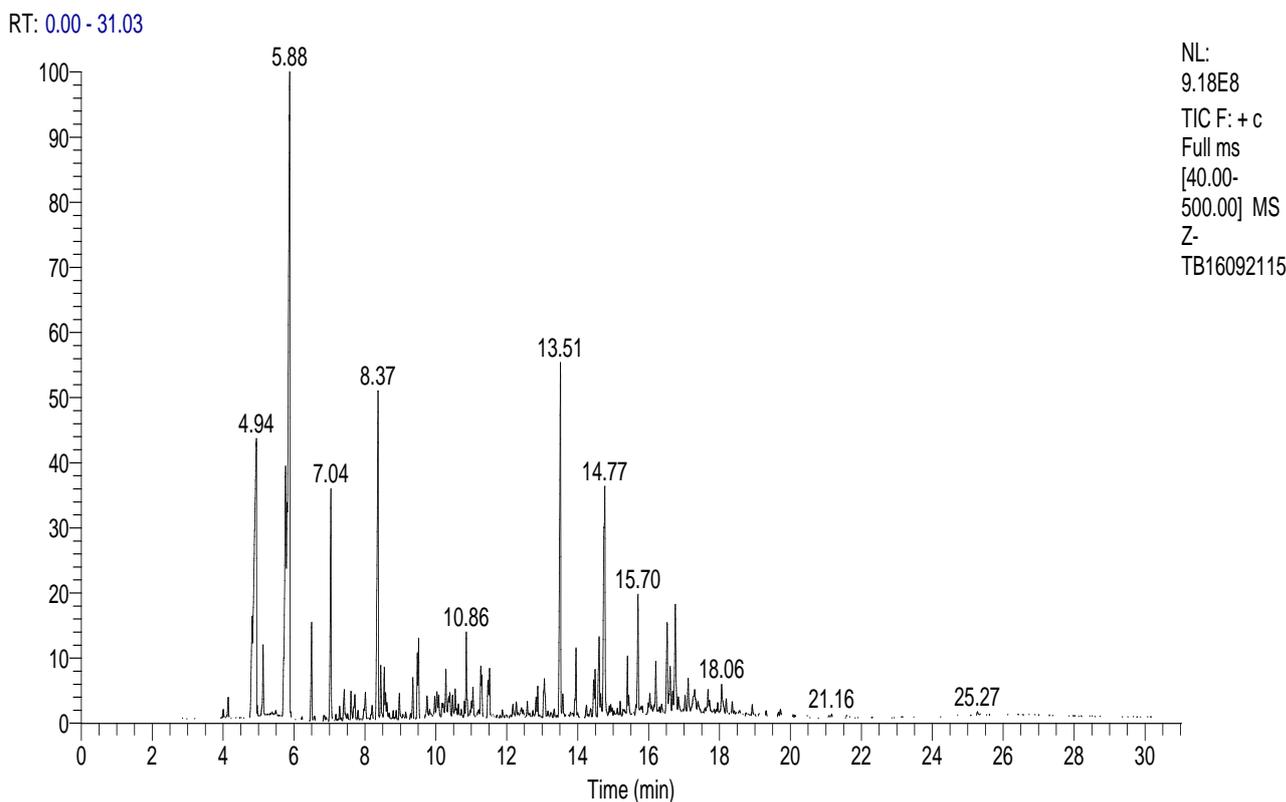
#### I.3.1. Rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation des graines de *Juniperus thurifera* a donné une huile de couleur vert pâle à odeur forte.

Le rendement en huile essentielle obtenu est de 1,38%. Un rendement similaire a été obtenu par Mansouri *et al.* (2010) et Satrani *et al.* (2015) à partir des rameaux de *J. thurifera* collectées au Moyen Atlas oriental du Maroc (1,32%). Zeraïb *et al.* (2014) ont rapporté des rendements faibles allant de 0,40% à 0,53% à partir des feuilles de la même espèce récoltée en Algérie. De même, des rendements plus faibles ont été rapportés par Hernandez *et al.* (1987) à partir des graines de *J. thurifera* var. *hispanica* (0,13%) et des feuilles de *J. thurifera* du Maroc (0,68-0,73%) (Achak *et al.*, 2008).

### I.3.2. Composition chimique de l'HE de *J. thurifera*

L'analyse par CPG/MS de l'huile essentielle de *J. thurifera* var. *aurasiaca* nous a permis d'identifier trente-cinq composés représentant 86,93% de l'ensemble des composés de l'huile analysée (Figure 26 et Tableau 8).



**Fig. 26:** Chromatogramme de l'huile essentielle de *J. thurifera*.

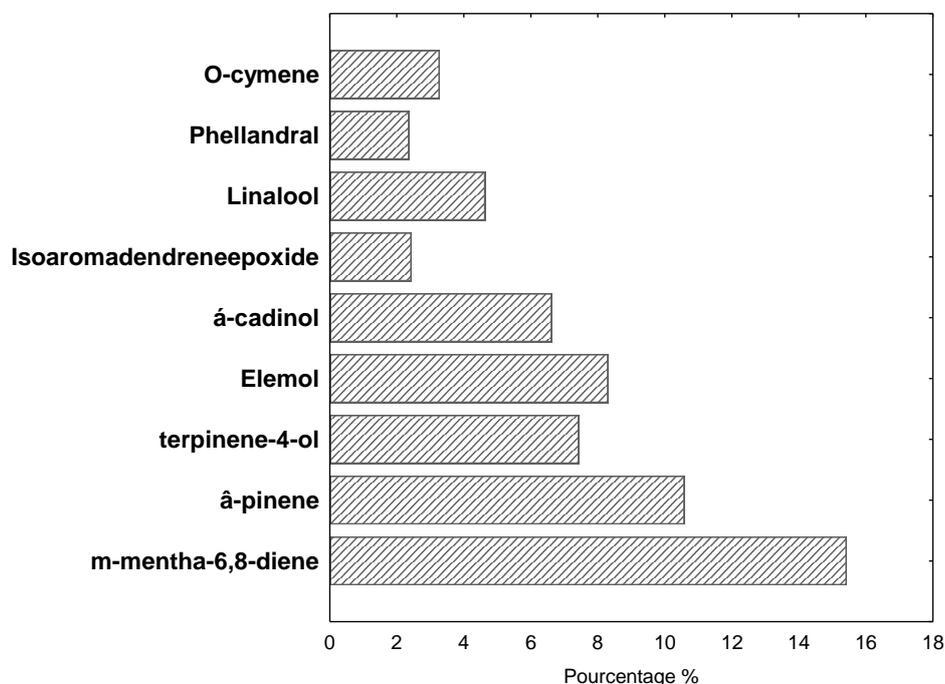
L'huile essentielle extraite des graines de *J. thurifera* comprend comme composés majoritaires le m-mentha-6,8-diène (15,43%), le  $\beta$ -pinène (10,59%), l'elémol (8,31%), le terpinène-4-ol (7,44%), l' $\alpha$ -cadinol (6,63%) et le linalool (4,64%) (Figure 27).

**Tableau 8:** Composition chimique de l'HE des graines de *J. thurifera* var. *aurasiaca*.

N°	KI	Composé	Pourcentage %
1	940	$\alpha$ -pinène	0,41
2	977	Sabinène	0,98
3	983	<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<b>10,59</b>
4	994	$\beta$ -myrcene	1,29
5	1028	O-cymene	3,28
6	1033	<b>m-mentha-6,8-diène</b>	<b>15,43</b>
7	1071	cis-sabinene hydrate	1,96
8	1104	<b>Linalool</b>	<b>4,64</b>
9	1125	cis-p-menth-2-en-1-ol	0,79
10	1138	cis-limoneneoxide	0,58
11	1145	Camphor	0,74
12	1163	Sabina ketone	0,8
13	1182	<b>Terpinène-4-ol</b>	<b>7,44</b>
14	1190	p-cymen-8-ol	1,1
15	1196	$\alpha$ -terpeneol	1,15
16	1249	Carvone	0,79
17	1259	Phellandral	2,37
18	1305	Myrtenylacetate	0,42
19	1354	$\alpha$ -terpinylacetate	1,57
20	1369	2R,4R-p-mentha-1(7),8-diene-2-hydroperoxide	0,71
21	1386	Nerolidylacetate	1,44
22	1399	$\beta$ -elemene	0,75
23	1402	Non identifié	0,93
24	1505	$\alpha$ -amorphene	0,55
25	1525	$\gamma$ -muurolène	1,24
26	1559	<b>Elemol</b>	<b>8,31</b>
27	1567	E-nerolidol	0,48
28	1598	Caryophylleneoxide	1,37
29	1643	(-)-spathulenol	0,74
30	1646	$\beta$ -gurjunene	0,86
31	1654	t-muurolol	1,84
32	1668	<b><math>\alpha</math>-cadinol</b>	<b>6,63</b>
33	1727	Junipercamphor	1,3
34	1752	Non identifié	2,38
35	1801	8- $\alpha$ -acetoxyelemol	1,19
36	1828	Non identifié	1,95
37	1841	Non identifié	0,98
38	1855	Isoaromadendreneepoxide	2,44
39	1908	$\alpha$ -copaen-11-ol	0,75
<b>Total identifié</b>			<b>86,93</b>

<b>Monoterpènes hydrocarbures</b>	<b>31,98</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	<b>26,5</b>
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>	<b>3,4</b>
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>	<b>25,05</b>

KI: indice de Kovats, les composés majoritaires sont représentés en gras.



**Fig. 27:** Principaux composés chimiques de l'huile essentielle de *J. thurifera*.

A notre connaissance, cette étude est la première à s'intéresser à la composition chimique de l'huile essentielle des graines de *J. thurifera* var. *aurasiaca* de l'Algérie. La seule étude menée sur l'essence des graines est celle de Hernandez *et al.* (1987) qui se sont intéressés au taxon européen. Les mêmes auteurs ont rapporté le limonène (84,32%), le  $\beta$ -myrcène (3,82%), l' $\alpha$ -pinène (3,48%) et l' $\alpha$ -terpinolène (1,39%) comme composés majoritaires.

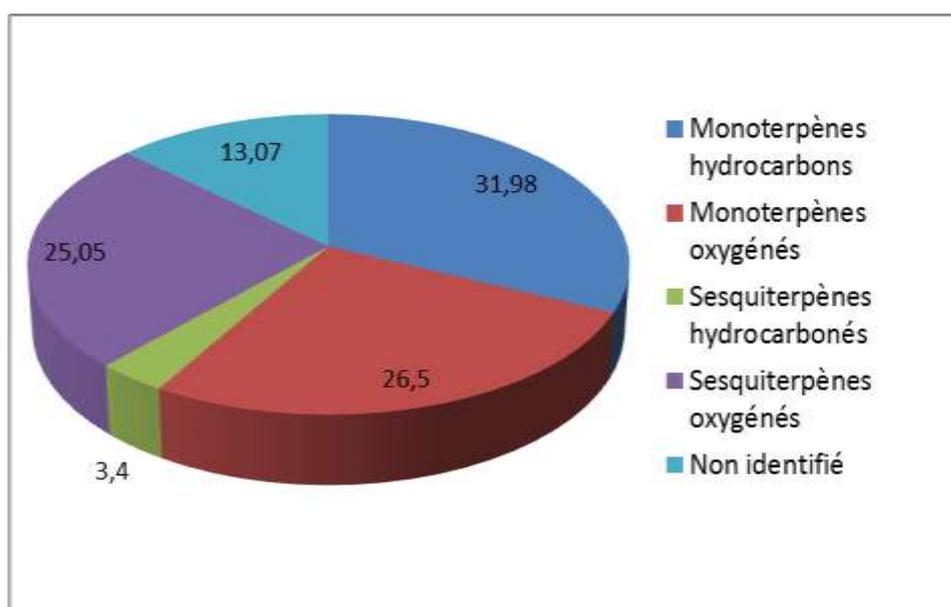
La composition chimique des HEs issues des feuilles du genévrier thurifère algérien a été décrite pour la première fois par Zeraib *et al.* (2014a,b). Les principaux composés étaient le sabinène (5,2-17,9%), l' $\alpha$ -cadinol (5,5-15,7%), le terpinène-4-ol (5,4-9,4%), l'elemol (0,7-7,6%), le  $\delta$ -cadinène (3,3-6,1%) et le linalool (0,3-4,6%). En comparant cette composition avec celle de l'huile des graines analysée au cours de notre étude, nous pouvons constater qu'il existe des différences dans les concentrations des composés majoritaires. En effet, le sabinène figure parmi les constituants minoritaires de notre huile avec 0,98%, alors qu'il est dominant dans les huiles des feuilles. Par contre, le  $\beta$ -pinène est présent en très faible quantité (0,4%) dans les huiles essentielles des feuilles

contre 10,59% dans l'HE des graines. D'autre part, le m-mentha-6,8-diène formant 15,43% de l'huile étudiée est totalement absent dans l'HE des feuilles, tandis que l' $\delta$ -cadinène est absent dans l'HE des graines et présent dans les feuilles.

La composition chimique de notre huile présente une différence quantitative et qualitative par rapport à celle de *J. thurifera* du Maroc. Mansouri *et al.* (2010) et Satrani *et al.* (2015) ont montré que les huiles essentielles des rameaux sont dominées par le  $\beta$ -pinène (36,3%), le terpin-4-ol (12,8%), le pinène  $\alpha$ -oxide (10,9%), le piperitone (10%), le  $\beta$ -E-ocymène (4,4%) et le myrcène (3,1%). Les principaux constituants des HEs des feuilles provenant de différentes régions du Maroc sont le sabinène (12,2% à 45,8%), l' $\alpha$ -pinène (4% à 17,1%) et le terpinène-4-ol (2,6% à 16,9%) (Adams *et al.*, 2003; Achak *et al.*, 2008; 2009; Bahri *et al.*, 2013).

Nos résultats de la composition chimique sont en accord avec ceux rapportés par Adams (1998) qui a souligné que les pinènes sont généralement abondants dans les huiles essentielles du genre *Juniperus*. Ces composés constituent des molécules importantes de discrimination des espèces du genre *Juniperus* (Adams, 1998).

Notre huile est un mélange complexe d'hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques et de composés oxygénés mono-et sesquiterpéniques (Figure 28).



**Fig. 28:** Répartition des familles de composés chimiques de l'HE de *J. thurifera* var *aursiaca*.

La fraction monoterpénique y représente à elle seule 58,39%. Les hydrocarbures monoterpéniques sont représentés par six composés faisant 31,98% de l'HE totale, les plus abondants parmi lesquels sont le m-mentha-6,8-diène (15,43%) et le  $\beta$ -pinène (10,59%). Les monoterpènes oxygénés sont présents avec un taux de 26,5%, le terpinène-4-ol (7,44%) et le linalool (4,64%) sont les composés dominants de cette classe. Les sesquiterpènes oxygénés font 25,05% de notre huile. Les principaux représentants de cette fraction sont: l'élémol (8,31%) et l' $\alpha$ -cadinol (6,63%). L'huile essentielle de *J. thurifera* contient également des hydrocarbures sesquiterpéniques avec un taux de 3,4%.

La dominance des monoterpènes a été enregistrée dans les huiles essentielles extraites des feuilles (29,39%) (Zeraib *et al.*, 2014b) et des rameaux (97,09%) (Mansouri *et al.*, 2010; Satrani *et al.*, 2015) de *J. thurifera*. De même, des études réalisées sur d'autres espèces du genre *Juniperus* ont montré la dominance de la fraction monoterpénique : *J. oxycedrus* (Cavaleiro *et al.*, 2006; Satrani *et al.*, 2015), *J. phoenicea* (Ramdani *et al.*, 2013; Satrani *et al.*, 2015), *J. foetidissima* (Asili *et al.*, 2010), *J. communis* (Cavaleiro *et al.*, 2006; Marongiu *et al.*, 2006) et *J. excelsa* (Asili *et al.*, 2008; Emami *et al.*, 2011).

## II. Etude de l'activité antibactérienne

### II.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles seules

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque sur quatre germes pathogènes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *B. subtilis*. La gentamicine, la céfazoline et l'amoxicilline ont été utilisés comme témoins positifs.

#### II.1.1. Activité antibactérienne de l'HE de *S. africana*

La croissance des quatre souches bactériennes testées s'avèrent affectée par l'HE brute de *S. africana* en produisant des diamètres d'inhibition allant de 13,33mm à 29,67mm. L'effet inhibiteur le plus prononcé a été enregistré contre *E. coli* et *S. aureus* qui ont manifesté le même degré de sensibilité avec des diamètres d'inhibition de 29,67mm et 29mm respectivement. Quant aux deux souches: *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, elles se sont révélées moins sensibles à l'HE avec des diamètres d'inhibitions de 13,33mm et 15mm respectivement (Tableau 9).

**Tableau 9:** Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *S. africana*.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>S. africana</i>	1/1	29,67±0,58 <sup>b</sup>	29±1 <sup>c</sup>	13,33±0,58 <sup>b</sup>	15±1 <sup>c</sup>
	1/2	25±1 <sup>d</sup>	24,33±0,58 <sup>d</sup>	7,67±0,57 <sup>c</sup>	14±1 <sup>c</sup>
	1/4	21,67±0,58 <sup>e</sup>	15±1 <sup>e</sup>	6±0 <sup>d</sup>	11,67±0,58 <sup>d</sup>
	1/8	11,67±1,52 <sup>f</sup>	12,33±0,58 <sup>f</sup>	6±0 <sup>d</sup>	8±1 <sup>e</sup>
	1/16	10±1 <sup>f</sup>	8,67±0,57 <sup>g</sup>	6±0 <sup>d</sup>	6±0 <sup>e</sup>
Antibiotiques	Gent	28±1 <sup>b,c</sup>	32±1 <sup>b</sup>	19,67±0,58 <sup>a</sup>	22,83±0,29 <sup>b</sup>
	Amx	26±1 <sup>c,d</sup>	29,67±0,58 <sup>c</sup>	6±0 <sup>d</sup>	15,33±0,58 <sup>c</sup>
	Cef	42±1 <sup>a</sup>	40,67±0,58 <sup>a</sup>	6±0 <sup>d</sup>	28±1 <sup>a</sup>
ANOVA	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	F	357,63	625,38	614,10	312,79

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ).

**Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline

Les diamètres d'inhibition générés par les antibiotiques varient entre 15 à 42 mm pour les souches bactériennes *E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis* témoignant une sensibilité de ces souches aux trois antibiotiques mais à des degrés différents. Par contre, la souche *P. aeruginosa* soumise à l'action de l'amoxicilline et la céfazoline a montré une résistance à ces deux antibiotiques.

L'action inhibitrice de l'HE de *S. africana* sur *E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis* est significativement moins importante que celle exercée par la céfazoline qui a engendré des diamètres d'inhibitions allant de 28 à 42mm. D'autre part, les diamètres d'inhibition induits par l'huile de *S. africana* sur *S. aureus* et *B. subtilis* sont significativement plus petits (29mm et 15mm) que ceux produits par la gentamicine (32mm et 22,83mm), alors que la souche *E. coli* a présenté le même degré de sensibilité ( $p < 0,001$ ) vis-à-vis de l'HE et de la gentamicine.

L'effet inhibiteur exercé par l'huile brute sur *S. aureus* et *B. subtilis* est significativement égal ( $p < 0,001$ ) à l'effet produit par l'amoxicilline. Par contre, le diamètre d'inhibition engendré par l'HE (29,27mm) contre *E. coli* est supérieur à celui trouvé pour l'amoxicilline (26mm) avec une différence statistiquement significative ( $p < 0,001$ ), ce qui confirme l'efficacité de cette huile.

Les diamètres d'inhibition les plus faibles ont été enregistrés contre *P. aeruginosa*. Cette souche n'a montré aucune sensibilité à l'égard de la céfazoline et l'amoxicilline. Par contre, sa croissance a été affectée par la gentamicine qui a généré un diamètre d'inhibition égal à 19,67mm alors que l'HE de *S. africana* à l'état pur et à l'état dilué (1/2) ont produit des diamètres d'inhibition de 13,33mm et 7,67mm respectivement.

Des différences significatives ont été enregistrées entre les dilutions 1/2, 1/4 et 1/8 de l'huile essentielle de *S. africana* vis-à-vis des souches *E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Les diamètres d'inhibition générés varient entre 8mm et 24,33mm traduisant la sensibilité des bactéries à ces doses. Néanmoins, cette sensibilité diminue en diminuant la dose appliquée de l'HE. Les dilutions 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 n'ont pas eu d'effet sur la croissance de *P. aeruginosa*. De même, la souche *B. subtilis* s'est révélée résistante à l'HE diluée 16 fois.

Selon la recherche bibliographique que nous avons effectuée, l'activité antibactérienne de *S. africana* a fait l'objet d'une seule étude qui est celle Derouiche *et al.* (2013). Contrairement à nos résultats, les auteurs ont montré que la souche *B. subtilis* est la plus sensible à l'action de l'HE des fleurs de *S. africana* en enregistrant un diamètre d'inhibition de 20,15mm, alors que *P. aeruginosa* n'a pas été affectée ce qui est en accord avec nos résultats.

La résistance de *P. aeruginosa* et la sensibilité de *S. aureus* (17mm) et *E. coli* (13mm) vis-à-vis de l'huile de *S. chamaecyparissus* cultivée en Algérie ont été également notées par Nouasri *et al.* (2015).

Liu *et al.* (2007) ont rapporté que l'HE de *S. corsica* exerce une activité antibactérienne importante à l'égard de *S. aureus*, alors qu'elle est inactive sur *E. coli* et *P. aeruginosa*. D'autre part, les HEs de *S. rosmarinifolia* (Chibani *et al.*, 2013) et *S. chamaecyparissus* (Fatnassi *et al.*, 2017) ont affecté la croissance de *E. coli* en produisant des diamètres d'inhibition de 25mm et 15mm respectivement.

Par rapport aux bactéries à Gram négatif, celles appartenant au genre *Pseudomonas* se manifestent comme étant les moins sensibles à l'action des HEs (Mayaud *et al.*, 2008), ce qui est en accord avec nos résultats.

Les effets induits par l'huile essentielle de *S. africana*, sur les souches bactériennes testées semblent être attribuées à sa composition chimique. La richesse de notre huile en composés oxygénés ; 1,8-cineole (9,46%),  $\alpha$ -bisabolol (5,63%), Hedycaryol (5,79%), Eudesm-4-ol (3,63%), laisse supposer que ces composés sont en grande partie responsables de son activité antibactérienne. En effet, les composés oxygénés sont connus pour leur pouvoir antibactérien très important dépassant celui des molécules hydrocarbonées connues pour leurs faibles propriétés antibactériennes (Kalemba et Kunicka, 2003). La classe des composés oxygénés est très bien représentée dans notre HE avec un pourcentage de 41,81% de l'huile totale.

De plus, le 1,8-cinéol figurant parmi les composés majoritaires de notre HE, a été rapporté comme très actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif dans plusieurs travaux. Il semble affecter la membrane cellulaire en causant une perte des métabolites cytoplasmiques et des acides nucléiques (Derwich *et al.*, 2009).

**II.1.2. Activité antibactérienne de l'HE de *Hertia cheirifolia***

Les résultats du test de l'activité antibactérienne de l'HE de *H. cheirifolia* vis-à-vis des souches bactériennes testées sont représentés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *H. cheirifolia*.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>H. cheirifolia</i>	1/1	17,67±0,58 <sup>d</sup>	30,67±1,15 <sup>c</sup>	6±0 <sup>b</sup>	6±0 <sup>d</sup>
	1/2	15,33±0,58 <sup>e</sup>	17,33±0,58 <sup>d</sup>	6±0 <sup>b</sup>	6±0 <sup>d</sup>
	1/4	<b>08,33±0,58<sup>f</sup></b>	<b>11,33±0,58<sup>f</sup></b>	6±0 <sup>b</sup>	6±0 <sup>d</sup>
	1/8	6±0 <sup>g</sup>	6±0 <sup>g</sup>	6±0 <sup>b</sup>	6±0 <sup>d</sup>
	1/16	6±0 <sup>g</sup>	6±0 <sup>g</sup>	6±0 <sup>b</sup>	6±0 <sup>d</sup>
Antibiotiques	Gent	28±1 <sup>b</sup>	32±1 <sup>b</sup>	19,67±0,58 <sup>a</sup>	22,83±0,29 <sup>b</sup>
	Amx	26±1 <sup>c</sup>	29,67±0,58 <sup>c</sup>	6±0 <sup>b</sup>	15,33±0,58 <sup>c</sup>
	Cef	42±1 <sup>a</sup>	40,67±0,58 <sup>a</sup>	6±0 <sup>b</sup>	28±1 <sup>a</sup>
ANOVA	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	F	<b>964,38</b>	<b>1149,39</b>	<b>1681,00</b>	<b>1366,11</b>

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ).

**Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline

L'action de l'huile essentielle de *H. cheirifolia* sur les quatre souches bactériennes a permis d'avoir des zones d'inhibition uniquement sur *S. aureus* et *E. coli*. La souche de *S. aureus* s'est montrée extrêmement sensible à l'huile de *H. cheirifolia* avec un diamètre de 30,67mm suivie par *E. coli* avec un diamètre de 17mm. Aucune activité n'a été exercée contre *P. aeruginosa* et *B. subtilis*.

Les plus faibles dilutions (1/2 et 1/4) ont inhibé la croissance de *S. aureus* (17,33mm et 11,33mm respectivement) et *E. coli* (15,33mm et 8mm respectivement), alors que les plus fortes dilutions (1/8 et 1/16) n'ont montré aucun effet sur les quatre bactéries testées.

Généralement les diamètres d'inhibition générés par l'HE de *H. cheirifolia* sont significativement inférieurs à ceux produits par les antibiotiques, à l'exception de *P. aeruginosa* vis-à-vis de laquelle la céfazoline et l'amoxicilline ainsi que l'HE à l'état pur et

dilué n'ont eu aucun effet. Par contre une bonne activité inhibitrice sur cette souche a été démontrée par la gentamicine (19,67mm).

La sensibilité des deux souches *S. aureus* et *E. coli* et la résistance de *P. aeruginosa* aux huiles de *H. cheirifolia* a été déjà observée par Segueni, (2017). De même, nos résultats concordent avec ceux trouvés par Majouli *et al.* (2016b) qui ont rapporté une activité plus prononcée des HEs des fleurs et des parties végétatives (feuilles et tiges) sur *S. aureus* et *E. coli*, alors qu'une activité faible a été enregistrée vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

*S. aureus* est une bactérie à Gram positif commune pouvant provoquer des affections pathogènes, notamment des maladies d'origine alimentaire et des infections, allant de perturbations cutanées mineures localisées à des maladies des tissus profonds et des maladies du système mettant la vie en danger (Chouhan *et al.*, 2017). Il est bien connu que par rapport aux bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HEs (Azhdarzadeh et Hojjati, 2016). Cela peut être attribué au fait que les bactéries Gram négatif ont une membrane externe rigide, riche en lipopolysaccharide (LPS) et plus complexe, limitant ainsi la diffusion de composés hydrophobes à travers elle, alors que cette membrane extra complexe est absente chez les bactéries Gram positif (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Le pouvoir antibactérien modéré de l'huile de *H. cheirifolia* peut être lié à sa composition chimique riche en composés hydrocarbonés (86,08 %). Il a été établi que l'activité antibactérienne des huiles essentielles est attribuée aux terpènes oxygénés, mais quelques terpènes hydrocarbonés pourraient également exercer des effets antibactériens (Burt, 2004). Parmi les composés hydrocarbonés, l' $\alpha$ -pinène est présent à 48,38% dans notre huile. Des études (Simic *et al.*, 2002; Bakkali *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011) ont rapporté que les huiles essentielles contenant ce composé sont douées de pouvoir antibactérien. Néanmoins, on ne doit pas exclure la possibilité que des effets synergiques ou antagonistes entre les différents constituants des huiles essentielles puissent expliquer leurs propriétés antibactériennes (Burt, 2004).

**II.1.3. Activité antibactérienne de l'HE de *Juniperus thurifera***

L'effet antibactérien de l'HE de *J. thurifera* à l'état brut et dilué a permis d'avoir des diamètres d'inhibition variables selon la souche bactérienne et la dose appliquée (Tableau 11).

Au vu des résultats du tableau 11, il apparaît que l'HE de *J. thurifera* n'a été active que sur *S. aureus* et *E. coli* qui se sont montrées sensibles aux concentrations 1/1, 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v dans le méthanol) avec des diamètres d'inhibition allant de 8mm à 27mm. Quant à la plus faible concentration (1/16), elle n'a montré aucune activité à l'égard de ces deux souches. Toutes les concentrations de l'huile de *J. thurifera* se sont avérées inactives vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *B. subtilis*.

**Tableau 11:** Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *J. thurifera*.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>J. thurifera</i>	<b>1/1</b>	24,33±0,58 <sup>c</sup>	27,0±1,0 <sup>d</sup>	<b>7,33±0,58<sup>b</sup></b>	6,0±0 <sup>c</sup>
	<b>1/2</b>	12,67±0,58 <sup>d</sup>	24,67±0,58 <sup>e</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>
	<b>1/4</b>	<b>10,33±0,58<sup>d</sup></b>	15,0±1,0 <sup>f</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>
	<b>1/8</b>	8,00±0,58 <sup>e</sup>	<b>12,67±0,58<sup>g</sup></b>	6,0±0 <sup>c</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>
	<b>1/16</b>	6,0±0,0 <sup>e</sup>	7,0±1,0 <sup>h</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>
Antibiotiques	<b>Gent</b>	28±1 <sup>b</sup>	32±1 <sup>b</sup>	19,67±0,58 <sup>a</sup>	22,83±0,29 <sup>b</sup>
	<b>Amx</b>	26±1 <sup>b,c</sup>	29,67±0,58 <sup>c</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>	15,33±0,58 <sup>c</sup>
	<b>Cef</b>	42±1 <sup>a</sup>	40,67±0,58 <sup>a</sup>	6,0±0 <sup>c</sup>	28±1 <sup>a</sup>
ANOVA	<b>P</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<b>F</b>	<b>639,96</b>	<b>885,71</b>	<b>825,07</b>	<b>1366,11</b>

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ).

**Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline

Des résultats similaires ont été trouvés par Zeraib *et al.* (2014b) qui ont mis en évidence que les HEs des feuilles de *J. thurifera* sont plus actives sur *S. aureus* (17mm) et *E. coli* (16mm) et n'ont pas d'effet sur *P. aeruginosa*. Nos résultats concordent également avec ceux de Bahri *et al.* (2013), qui ont rapporté la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'action des huiles de *J. thurifera* extraites par trois méthodes différentes.

Mansouri *et al.* (2010), ont rapporté que l'huile de *J. thurifera* a affecté la croissance de *E. coli* et *S. aureus*, ce qui est en accord avec nos résultats. Les mêmes auteurs ont également montré que *B. subtilis* a manifesté une sensibilité à l'huile testée, ce qui n'est pas le cas dans notre étude.

Il est fort probable que l'efficacité de l'huile de *J. thurifera* sur *S. aureus* et *E. coli* soit attribuable à sa composition chimique riche en composés oxygénés qui font 40,65% de cette huile. D'autre part, on ne peut pas négliger le fait que les composés majoritaires des huiles essentielles sont souvent responsables de leur activité biologique (Dorman et Deans, 2000; Kalemba et Kunicka, 2003). En effet, l'activité antibactérienne des HEs contenant le terpinène-4-ol (faisant 7,44% de notre huile) a été rapporté dans la littérature. L'huile essentielle de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), dominée par le terpinène-4-ol inhibe la croissance de nombreuses bactéries Gram positif et Gram négatif. Elle agit sur *S. aureus* et *E. coli* en augmentant la perméabilité de leur membrane plasmique, entraînant une perte d'ions potassium (Cox *et al.*, 2001). De même, le taux important du  $\beta$ -pinène qui fait 10,59% de l'huile des graines de *J. thurifera* pourrait justifier son activité inhibitrice remarquable. A cause de son pouvoir biocide, ce composé est utilisé comme désinfectant et insecticide (Nagalakshmi *et al.*, 2001).

D'après Oussou *et al.* (2008), l'activité d'une huile pourrait résulter des possibles effets synergiques entre ses constituants. Cha *et al.* (2007) ont trouvé que les huiles essentielles exercent un effet antibactérien supérieur à celui de ses composés majoritaires pris séparément. De même, les composés présents à l'état de traces peuvent être responsables de l'effet antibactérien des HEs qui les contiennent (Delaquis *et al.*, 2002).

En résumé, nos résultats indiquent que les trois HEs étudiées exercent une action inhibitrice importante sur *S. aureus* et *E. coli*. Ces deux agents pathogènes dont le taux de résistance aux antibiotiques est en augmentation (Mubita *et al.*, 2008; Chambers et De Leo, 2009) sont responsables de graves problèmes sanitaires. L'effet le plus intéressant a été exercé par l'huile de *S. africana* qui, en plus de *S. aureus* et *E. coli*, a pu affecter la croissance de *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Cette dernière souche est connue pour sa résistance aux agents antibactériens.

**II.2. Résultats de la combinaison des HEs avec les antibiotiques****II.2.1. Combinaison de l'HE de *S. africana* avec les ATBs**

L'HE de *S. africana* combinée à la gentamicine a produit un effet additif contre *E. coli* et synergique sur *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. Sa combinaison avec l'amoxicilline a donné un effet additif à l'égard de *E. coli* et *S. aureus* et antagoniste vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. L'effet antagoniste a été produit par HE/céfazoline sur toutes les souches et HE/amoxicilline vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *B. subtilis* (Tableau 12 et Figure 29).

**Tableau 12:** Résultats de la combinaison de l'HE de *S. africana* avec les antibiotiques.

		<b>Diamètres des zones d'inhibition (mm) † (Moyenne±SD)</b>				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>Santolina africana</i>	<b>Gent</b>	28±1	32±1	19,67±0,58	22,83±0,29	
	<b>Amx</b>	26±1	29,67±0,58	6±0	15,33±0,58	
	<b>Cef</b>	42±1	40,67±0,58	6±0	28±1	
	<b>Gent + HE</b>	34,67±0,58	49,33±0,58	24,67±0,58	28,33±0,58	
	<b>Amx+ HE</b>	31,67±0,58	36,67±0,58	6±0	15,33±0,58	
	<b>Cef+ HE</b>	38,33±0,58	38,67±0,58	6±0	25,67±0,58	
	<b>Valeurs de P</b>					
	<b>HE/Gent</b>	0,46 ns	0,027 *	0,002 **	0,0118 *	
	<b>HE/Amx</b>	1,0 ns	0,39 ns	0,007 **	0,013 *	
	<b>HE/Cef</b>	0,0006 ***	0,0002 ***	0,007 **	0,025 *	
	<b>Effet de la combinaison</b>					
	<b>HE/Gent</b>	Additif	synergique	Synergique	Synergique	
<b>HE/Amx</b>	Additif	Additif	Antagoniste	Antagoniste		
<b>HE/Cef</b>	Antagoniste	Antagoniste	Antagoniste	Antagoniste		

ns, non significatif; \*, significatif (P≤0.05); \*\*, hautement significatif (P≤0.01); \*\*\*; très hautement significatif (P≤0.001). **Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline; **HE**, huile essentielle.

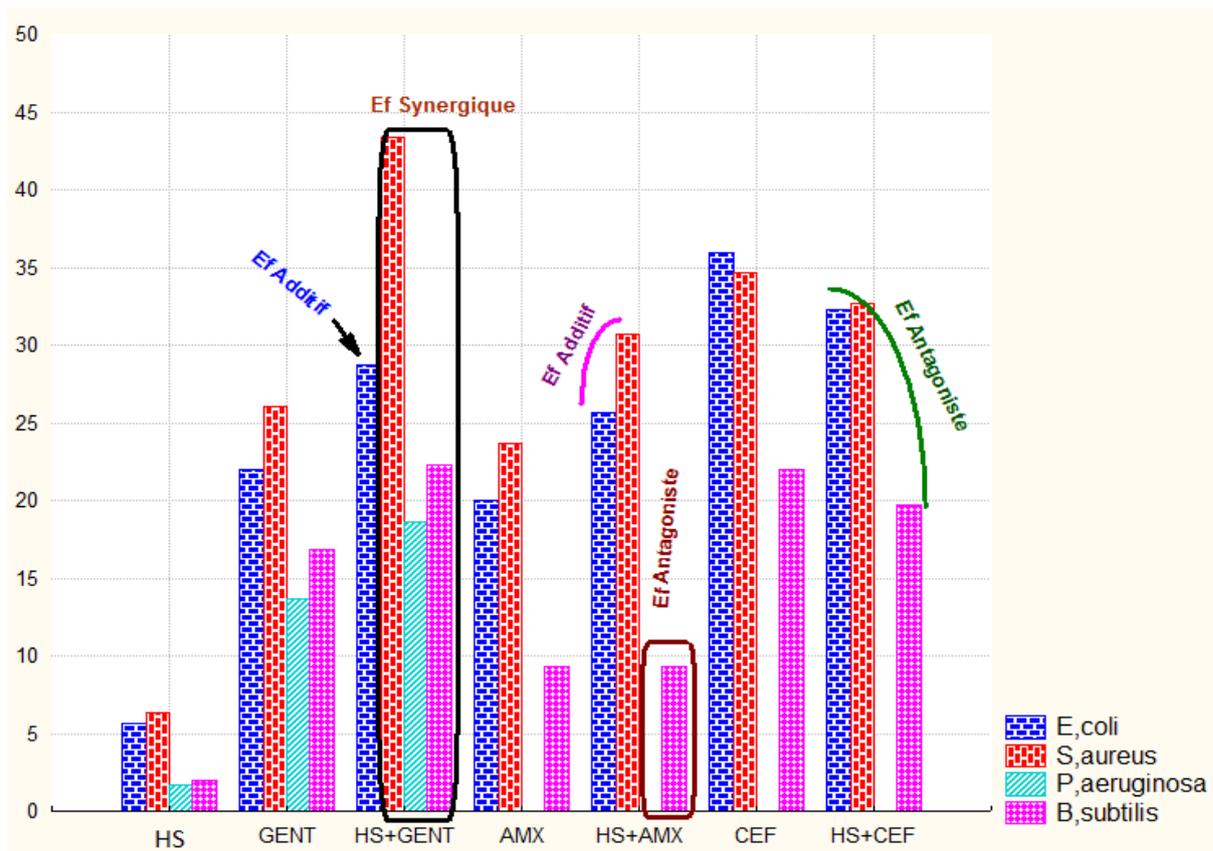


Fig. 29 : Effets de la combinaison de l'HE de *S. africana* avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.

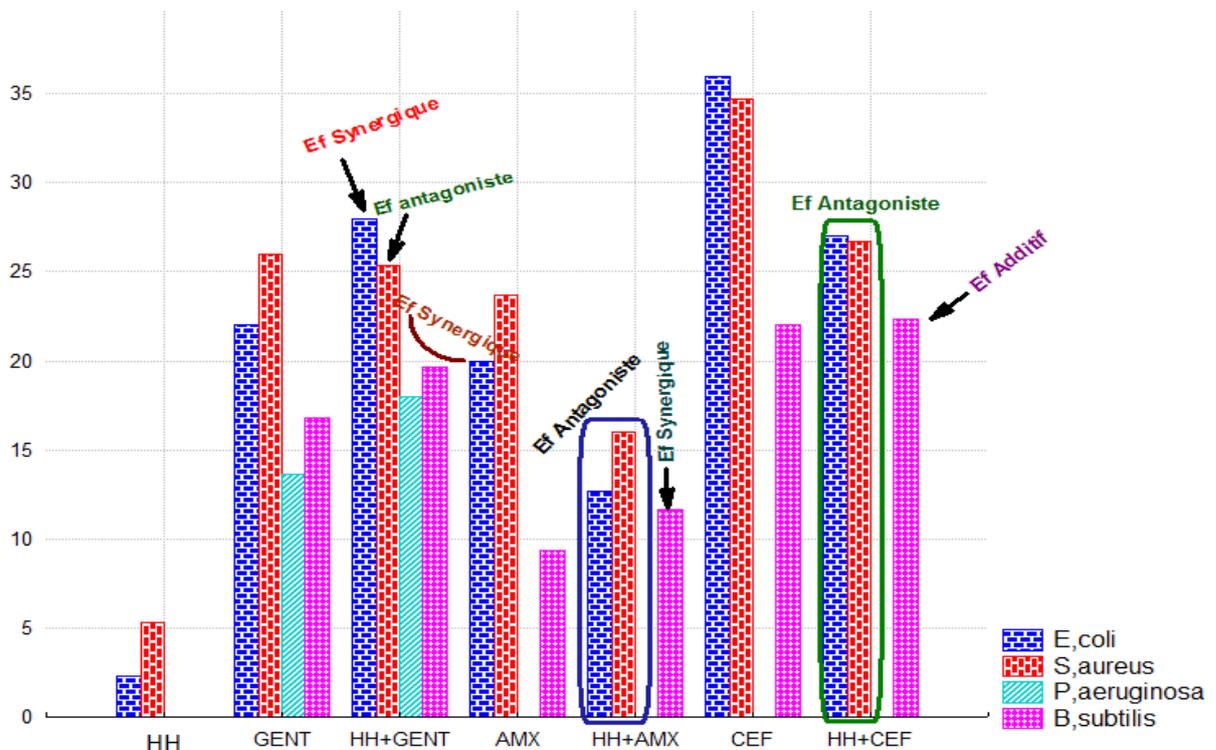
### II.2.2. Combinaison de l'HE de *H. cheirifolia* avec les ATBs

Les résultats montrent que l'HE de *H. cheirifolia* associée à l'amoxicilline et à céfazoline donne un effet antagoniste vis-à-vis de *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. La combinaison HE/amoxicilline a donné un effet synergique sur *B. subtilis* alors que l'effet additif a été exercé par l'HE/céfazoline contre la même souche. D'autre part, l'huile associée à la gentamicine a donné un effet synergique en provoquant une réduction marquée de la croissance de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. et un effet antagoniste sur *S. aureus* (Tableau 13 et Figure 30).

**Tableau 13:** Résultats de la combinaison de l'HE de *H. cheirifolia* avec les antibiotiques.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm) † (Moyenne±SD)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>Hertia cheirifolia</i>	<b>Gent</b>	28±1	32±1	19,67±0,58	22,83±0,29	
	<b>Amx</b>	26±1	29,67±0,58	6±0	15,33±0,58	
	<b>Cef</b>	42±1	40,67±0,58	6±0	28±1	
	<b>Gent + HE</b>	34 ±1	31,33±0,58	24±1	25,67±0,58	
	<b>Amx + HE</b>	18,67±0,58	22±1	6±0	17,67±0,58	
	<b>Céf + HE</b>	33±1	32,67±0,58	6±0	28,33±1,15	
	<b>Valeurs de P</b>					
	<b>HE/Gent</b>	0,002**	0,003 **	0,0028 **	0,0016 *	
	<b>HE/Amx</b>	0,0005 ***	0,00009 ***	ns	0,007 *	
	<b>HE/Cef</b>	0,00007 ***	0,000008 ***	ns	0,72 ns	
<b>Effet de la combinaison</b>						
<b>Gent</b>	synergique	antagoniste	synergétique	synergique		
<b>Amx</b>	antagoniste	antagoniste	indéterminé	synergique		
<b>Céf</b>	antagoniste	antagoniste	indéterminé	additif		

ns, non significatif; \*, significatif (P≤0.05); \*\*, hautement significatif (P≤0.01); \*\*\*; très hautement significatif (P≤0.001). **Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline; **HE**, huile essentielle.



**Fig. 30:** Effets de la combinaison de l'HE de *H. cheirifolia* avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.

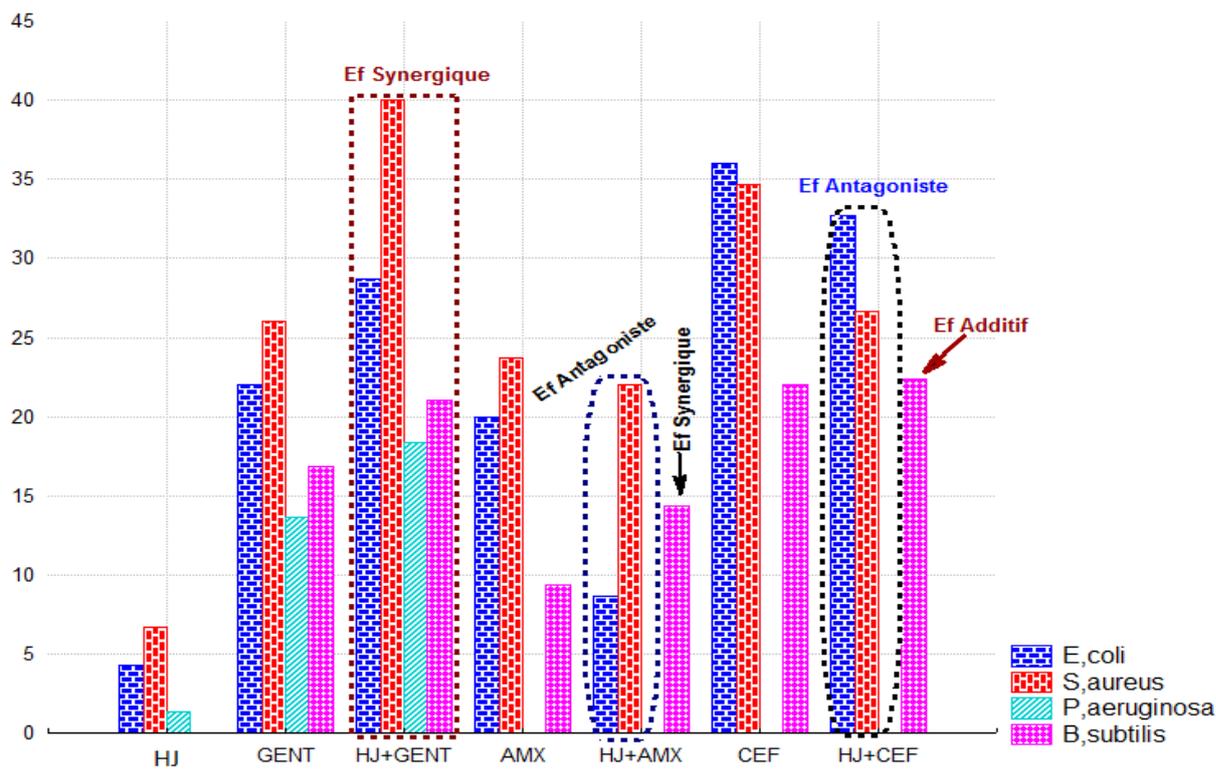
**II.2.3. Combinaison de l'HE de *J. thurifera* avec les ATBs**

L'huile de *J. thurifera* combinée avec la gentamicine a donné un effet synergique vis-à-vis des quatre souches bactériennes. Son association avec l'amoxicilline et la céfazoline a provoqué un effet antagoniste sur les trois souches: *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Un effet additif a été enregistré sur *B. subtilis* lors de la combinaison de l'HE avec la céfazoline, alors que sa combinaison avec l'amoxicilline donne un effet synergique à l'égard de la même souche (Tableau 14 et Figure 31).

**Tableau 14:** Résultats de la combinaison de l'HE de *J. thurifera* avec les antibiotiques.

		<b>Diamètres des zones d'inhibition (mm) † (Moyenne±SD)</b>				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>Juniperus thurifera</i>	<b>Gent</b>	28±1	32±1	19,67±0,58	22,83±0,29	
	<b>Amx</b>	26±1	29,67±0,58	6±0	15,33±0,58	
	<b>Cef</b>	42±1	40,67±0,58	6±0	28±1	
	<b>Gent+ HE</b>	34,67 ± 0,58	46 ± 1,0	24,33 ± 0,58	27 ± 1,0	
	<b>Amx + HE</b>	14,67 ± 0,58	28 ± 1,0	6,0 ± 0,0	20,33 ± 0,58	
	<b>Cfz+ HE</b>	38,67 ± 0,58	32,67 ± 0,58	6,0 ± 0,0	28,33 ± 0,58	
	<b>Valeurs de P</b>					
	<b>Gent+ HE</b>	0,007**	0,00038***	0,0074 **	0,0022 **	
	<b>Amx + HE</b>	0,000005***	0,00023***	0,016 *	0,00044***	
	<b>Cef + HE</b>	0,000084***	0,00003 ***	0,016 *	0,643 ns	
	<b>Effet de la combinaison</b>					
	<b>Gent+ HE</b>	Synergique	synergique	synergique	synergique	
<b>Amx + HE</b>	antagoniste	antagoniste	antagoniste	synergique		
<b>Cfz+ HE</b>	antagoniste	antagoniste	antagoniste	additif		

ns, non significatif; \*, significatif (P≤0.05); \*\*, hautement significatif (P≤0.01); \*\*\*, très hautement significatif (P≤0.001). **Gent**, gentamicine; **Amx**, amoxicilline; **Cef**, céfazoline; **HE**, huile essentielle.



**Fig. 31 :** Effets de la combinaison de l’HE de *J. thurifera* avec les antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.

La combinaison de substances médicinales en général, et antibiotiques en particulier est d’un grand intérêt en permettant la réduction des éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (Rosato *et al.*, 2007). De nombreuses études se sont intéressées à cette stratégie (Rosato *et al.*, 2007; Ravula *et al.*, 2012; Djouahri *et al.*, 2014; Moussaoui et Alaoui, 2016).

L’association des antibiotiques avec les huiles essentielles permet d’augmenter leurs effets à de faibles doses et ainsi de diminuer la toxicité de plusieurs antibiotiques (Rosato *et al.*, 2007). En raison de leur composition bioactive complexe, les HEs interagissent avec plusieurs cibles en même temps, empêchant les agents pathogènes d’acquérir une résistance (Chouhan *et al.*, 2017). En effet, l’interaction entre l’HE et les antibiotiques peut produire trois types d’effets, à savoir: synergique, additif ou antagoniste. Un effet synergique peut être produit si les constituants d’un mélange affectent différentes cibles. En revanche, la combinaison de produits agissant sur la même cible du microorganisme conduit à des effets antagonistes ou additifs (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009).

Les combinaisons synergiques présentent une efficacité supérieure et une toxicité inférieure à celles de leurs composants; du fait d’une activité sur plusieurs cibles, de telles

associations peuvent empêcher l'émergence d'une résistance aux antibiotiques et peut être efficace contre les souches microbiennes multi-résistantes (Van Vuuren *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent que l'effet synergique a été enregistré avec presque toutes les combinaisons des HEs de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* avec la gentamicine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les HEs et la gentamicine agissent sur des cibles différentes. L'huile essentielle pénètre dans la cellule microbienne, en raison de son caractère hydrophobe et modifie les fonctions cellulaires (Lopez-Romero *et al.*, 2015), elle augmente la perméabilité de la membrane (Nazzaro *et al.*, 2013) conduisant à une pénétration accrue de la gentamicine. Une fois à l'intérieur, la gentamicine interrompt la synthèse des protéines en bloquant la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Rosato *et al.*, 2010).

L'effet synergique produit par les HEs en combinaison avec les antibiotiques est permis grâce à leur caractère hydrophobe mais aussi par leur composition chimique très complexe (Rodrigues *et al.*, 2009). Les sesquiterpènes oxygénés et les phénols terpéniques sont capables de provoquer la rupture de la paroi bactérienne facilitant ainsi la pénétration des antibiotiques (Hilmer *et al.*, 2011). En outre, des HEs riches en monoterpènes oxygénés associées à la gentamicine ont montré un effet synergique ; les HEs de *Satureja kitaibelii*, *Aniba rosaeodora*, *Pelargonium graveolens*, *Melaleuca alternifolia* (Rosato *et al.*, 2010) et l'HE du romarin (Barreto *et al.*, 2014). Dans le cas de cette étude, la synergie observée en combinant les HEs de *S. africana* et *J. thurifera* avec la gentamicine pourrait être favorisée par leur richesse en composés oxygénés sesquiterpéniques et monoterpéniques.

Les interactions antagonistes et additives observées en associant nos HEs avec la céfazoline et l'amoxicilline pourraient être expliquées par le fait que les HEs et ces antibiotiques agissent sur la même cible de la cellule bactérienne (par exemple, la membrane cellulaire). Bien qu'ignorées dans de nombreuses études, les interactions antagonistes sont également importantes, car elles pourraient prédire une réduction de l'efficacité antimicrobienne (Van Vuuren et Viljoen, 2011; Basri *et al.*, 2014).

### II.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles *in-silico* par le Docking moléculaire

A titre de rappel, nous avons observé précédemment que les combinaisons des trois huiles étudiées avec la céfazoline et l'amoxicilline ont donné des effets additifs ou antagonistes, alors que la synergie a été observée lors des combinaisons des HEs avec la gentamicine. Ceci nous a mené à conclure que nos huiles agissent sur les mêmes cibles que celles de la céfazoline et de l'amoxicilline. En s'appuyant sur ces résultats et dans le but de mieux comprendre l'activité antibactérienne des HEs étudiées, on a opté pour l'amarrage (docking) moléculaire de leurs constituants avec des protéines cibles des B-lactamines. Nous avons choisi de nous focaliser sur les cibles des antibiotiques de la classe des B-lactames, classe à laquelle appartiennent la céfazoline et l'amoxicilline.

#### II.3.1. Tests de fiabilité du protocole

Nous avons utilisé le logiciel MOE (version 2015) pour le docking moléculaire. Avant d'entamer l'étude de l'inhibition des cibles de  $\beta$ -lactames par les constituants des huiles essentielles étudiées, nous avons jugé utile d'évaluer la fiabilité du logiciel utilisé dans cette étude en utilisant deux critères différents: l'écart quadratique moyen, ou le RMSD (Root Mean Square Déviation) et l'analyse visuelle des positions de ligand avant et après le docking par le MOE.

##### II.3.1.1. L'écart quadratique moyen

Le calcul de la déviation quadratique moyenne (RMSD) permet de déterminer l'aptitude du logiciel à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à la protéine.

Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne position d'une mauvaise. Au-delà de ce seuil la prédiction est considérée comme non adéquate (Patel *et al.*, 2005). Le test sur la fiabilité de programme MOE a été réalisé sur quatre protéines: Penicillin-Binding Proteins (PBP), Alanine Racémase (ALR), D-Alanyl-D-Alanine Synthétase (DDL), et L, D-Transpeptidase (LDT). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Valeurs de RMSD des quatre complexes étudiés.

Protéine	ID PDB	Ligand	Score	RMSD
PBP <sub>a1</sub>	2V2F	MES	-7,2042	0,914
ALR	4WR3	PLP	-7,20	0,141
DDL	4C5B	ADP	-30,7796	2,04
LDT	5K69	Carbapenem drug T224	-7,03	1,58

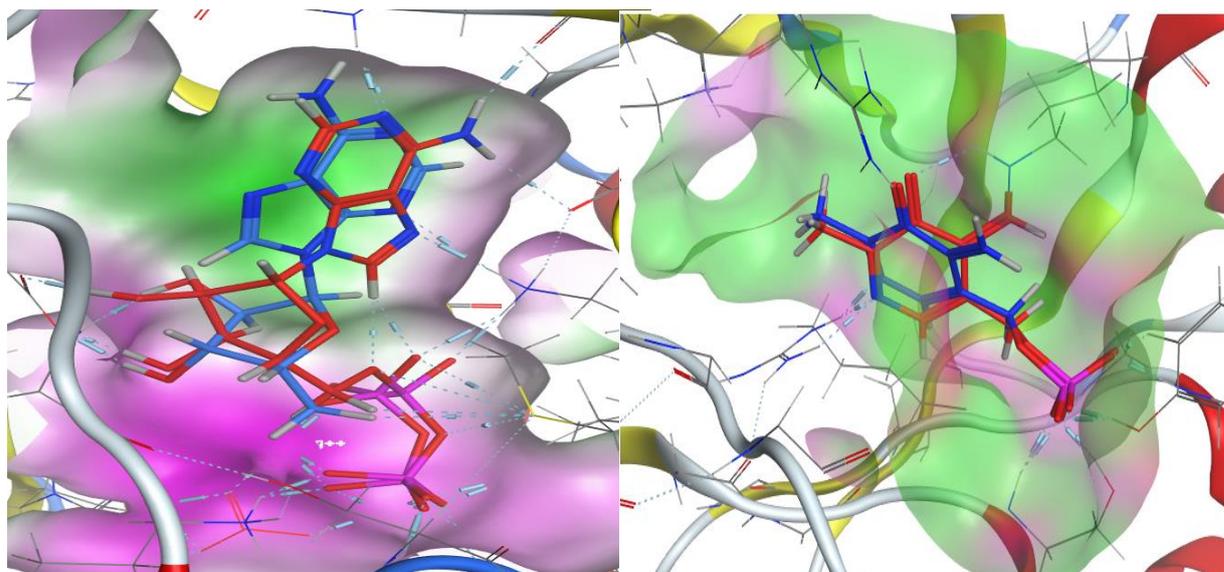
Les résultats de ce premier test nous permettent de dire que le programme MOE est un outil de modélisation bien adapté à l'étude *in-silico* de l'inhibition des cibles d'antibiotiques qui nous intéressent ici.

### II.3.1.2 L'analyse visuelle

Le test de l'RMSD a été suivi d'une visualisation de quelques complexes obtenus après docking afin de lier la valeur du RMSD calculée et l'emplacement du modèle simulé par le MOE par rapport au ligand original.

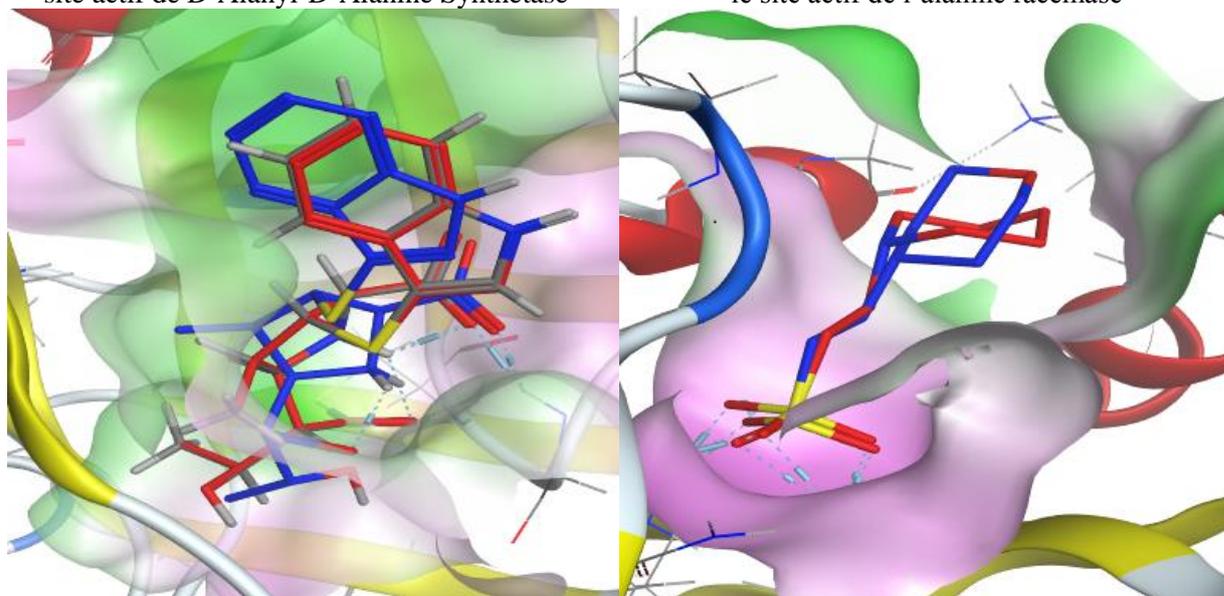
Dans la figure 32, nous pouvons observer la superposition des ligands après docking et des ligands co-cristallisés. L'analyse visuelle par le MOE réalisée sur les cibles d'antibiotiques, montre que les modèles des ligands simulés par le MOE sont correctement placés dans le site actif de ces protéines. Ils présentent des conformations spatiales très proches voir même superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie déposées dans la PDB.

Donc à partir de ces résultats nous pouvons conclure que MOE est un logiciel qui fonctionne avec une fiabilité acceptable. Il peut donc être utilisé, sans trop de risque d'erreurs, dans l'étude de l'interaction des protéines et les divers inhibiteurs.



**A.** Emplacement de ligand co-cristallisé (en rouge) et le ligand après docking (en bleu) dans le site actif de D-Alanyl-D-Alanine Synthétase

**B.** Emplacement de ligand co-cristallisé (en rouge) et le ligand après docking (en bleu) dans le site actif de l'alanine racémase



**C.** Emplacement de ligand co-cristallisé (en rouge) et le ligand après docking (en bleu) dans le site actif de L, D-Transpeptidase

**D.** Emplacement de ligand co-cristallisé (en rouge) et le ligand après docking (en bleu) dans le site actif de Penicillin-Binding Proteins

**Fig. 32:** Emplacements des ligands co-cristallisés et après docking sur les sites actifs des cibles protéiques.

### II.3.2. Docking des diverses molécules sur les cibles d'antibiotiques $\beta$ -lactames

Au total, 83 molécules en plus de l'amoxicilline et la céfazoline ont été soumis à des études d'amarrage pour l'inhibition de Penicillin-binding proteins (PBP), Alanine racémase (ALR), D-alanyl-D-alanine synthétase (DDL) et L, D-Transpeptidase (LDT).

#### II.3.2.1. Docking des molécules sur la protéine PBPa1

Les PBPs sont des enzymes intervenant dans la biosynthèse de la paroi bactérienne, elles sont incorporées dans la membrane bactérienne et agissent dans la phase finale de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries Gram- et Gram+ (Goffin et Ghuysen, 1998). Nous avons réalisé le docking des 83 molécules sur la protéine PBP a1. Les composés qui ont donné les meilleurs scores sont présentés dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Meilleurs scores d'interaction avec la protéine PBPa1.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-33255	Céfazoline	-7,3314
CID-33613	Amoxicilline	-5,6478
CID-549159	3-Eicosyne	-6,4282
CID-6431124	8- $\alpha$ -Acetoxyelemol	-5,9117
CID-532515	Phénylthioacétique acide, 4-methoxyphenyl ester	-5,7222

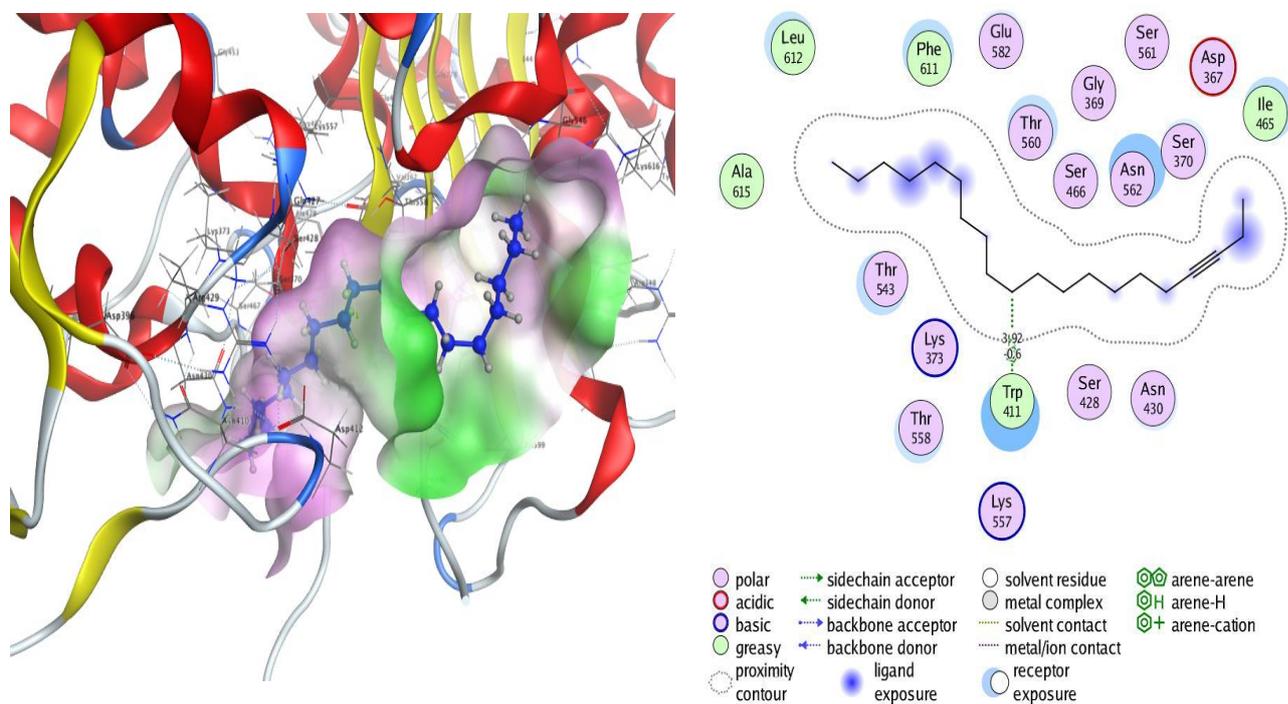


Composé de l'huile de *H. cheirifolia*

Dans cette étude, l'amoxicilline et la céfazoline ont été choisis pour comparer leurs énergies d'affinité avec celles des constituants des HEs. Nous avons obtenu des énergies d'interaction avec la PBP égale à -5,6478Kcal/mol pour l'amoxicilline et -7,3314Kcal/mol pour céfazoline. Ces énergies seront utilisées comme des énergies de référence pour les comparer avec les autres ligands.

Pour rappel, les scores d'affinité les plus négatifs indiquent une plus forte interaction entre le ligand et la protéine. A la lumière des résultats du tableau 16, il ressort que le meilleur complexe est formé par le 3-eicosyne avec une énergie d'interaction de -6,4282Kcal/mol suivi par 8- $\alpha$ -acétoxyélémol avec -5,9117Kcal/mol et le Phénylthioacétique acide, 4-methoxyphenyl ester avec -5,7222Kcal/mol. Ces trois composés ont donné des énergies d'affinité plus basses que celle de l'amoxicilline. Ceci nous mène à dire que de point de vue énergétique, ces composés forment avec la PBP des

complexes plus stables par rapport à l'amoxicilline. D'autre part, l'affinité de ces composés pour la PBP est proche à celle de la céfazoline.



**Fig. 33:** Complexe Eicosyne-PBP $\alpha$ 1 issu de docking

En complément de l'examen des résultats obtenus; une analyse visuelle des interactions des composés avec les cibles protéiques a été réalisée. La figure 33 montre que l'eicosyne effectue un pont hydrogène avec le Trp411 d'une distance égale à  $3,92\text{\AA}$  et une énergie égale à  $-0,6\text{Kcal}$ . Plus la liaison hydrogène est importante plus la liaison entre l'enzyme et le ligand est forte (Kortemme *et al.*, 2003). De plus, le complexe est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus Phe611, Leu612, Ala615, Ile465.

Il convient de noter que les meilleures énergies d'affinité pour la protéine PBP $\alpha$ 1 ont été observées avec des composés appartenant à la classe des sesquiterpène. En plus, nous notons que l' $\beta$ -eicosyne ainsi que le phénylthioacétique acide, 4-méthoxyphényl ester sont présents dans l'HE de *Hertia cheirifolia* avec des pourcentages très faibles 0,43% et 0,33% respectivement. A côté desquels, il y a le drimenin qui forme 3,44% de l'HE de *H. cheirifolia*. D'autres composés ont montré une bonne affinité pour la PBP, parmi lesquels figurent des constituants de l'huile de *Santolina africana*: le sabinène (7,18%), l' $\alpha$ -bisabolol (5,63%), le  $\alpha$ -curcumène (4,5%), le cis- $\alpha$ -bisabolène (3,87%), le  $\delta$ -élémente (3,68%), le spathulenol (3,65%) et l'eudesm-7(11)-en-4-ol (3,63%). Le germacrène B bien

représenté dans l'huile de *Hertia* (2,09%) a fourni également une bonne énergie d'affinité. Quatre constituants de l'huile du genévrier ont démontré un potentiel d'inhibition intéressant (Tableau 17).

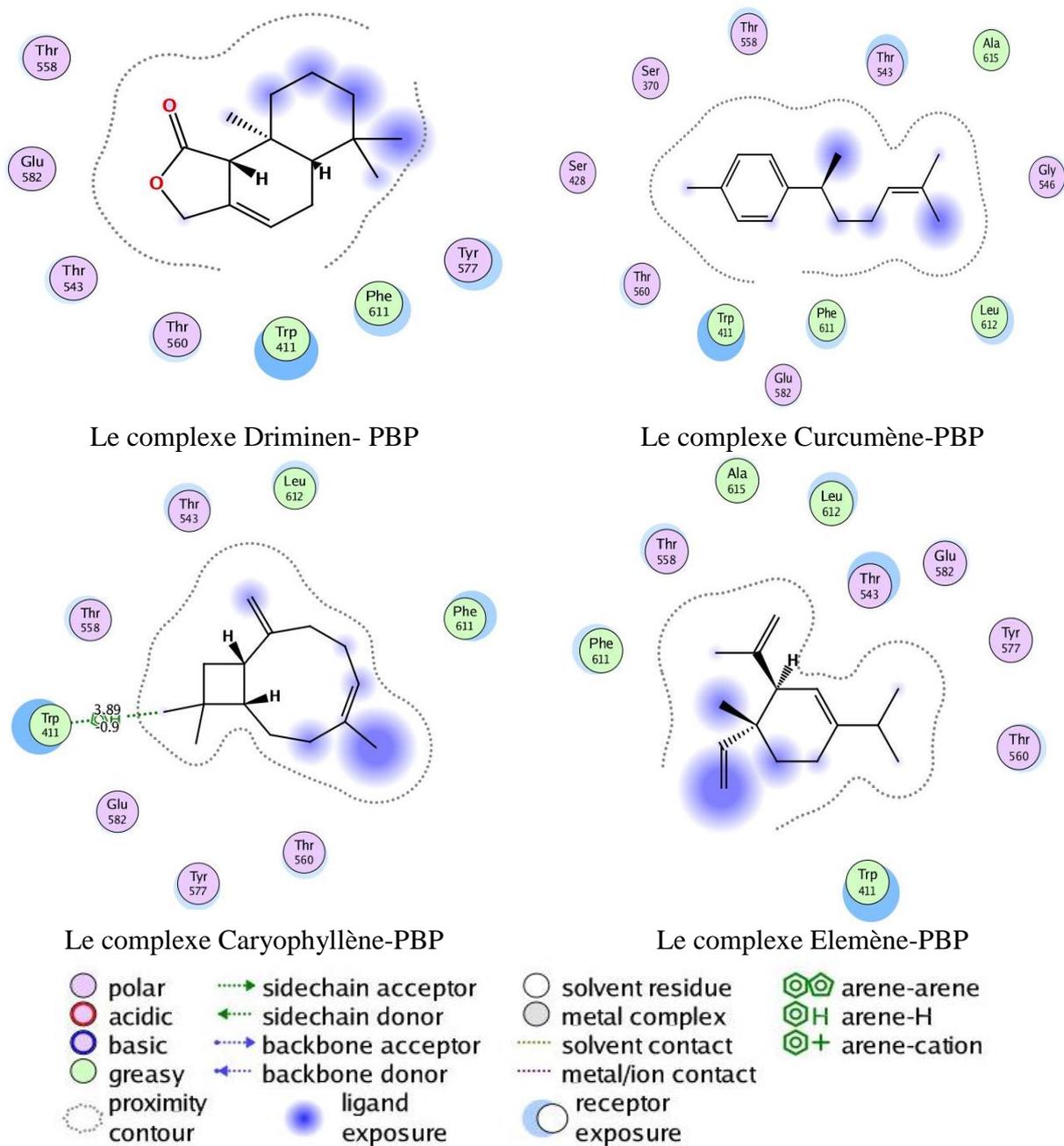
**Tableau 17:** Meilleurs scores d'interaction entre les composés des HEs de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera*.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-442202	(-)-Drimenin	-5,2044
CID-92139	$\alpha$ -Curcumene	-5,123
CID-6429301	(Z) Caryophyllène	-4,9276
CID-12309449	$\delta$ -Elemene	-4,9177
CID-5281519	Germacrene B	-4,9073
CID-89488	Phellandral	-4,8655
CID-534398	Isoaromadendrene epoxide	-4,825
CID-5352653	cis- $\alpha$ -bisabolene	-4,7687
CID-10398656	$\alpha$ -cadinol	-4,7327
CID-92231	Spathulenol	-4,7299
CID-1549992	$\alpha$ -Bisabolol	-4,682
CID-6549	Linalool	-4,5701
CID-18818	sabinene	-4,4462
CID-14896	$\beta$ -Pinene	-4,4033
CID-6432454	Eudesm-7(11)-en-4-ol	-4,3266

-  Composé de l'huile de *S. africana*
-  Composé de l'huile de *H. cheirifolia*
-  Composé de l'huile de *J. thurifera*
-  Composé des huiles de *S. africana* et *J. thurifera*

De manière générale, nous remarquons que parmi les principaux inhibiteurs de la PBP, les constituants de l'huile de *Santolina* sont les mieux représentés comparativement aux deux autres huiles.

L'analyse visuelle des composés montrant une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de la PBP1 permet de constater que ces composés interagissent avec les résidus du site actif de la cible par des liaisons de type hydrophobique. Le caryophyllène établit une liaison hydrogène d'une distance de 3,89Å et une énergie d'interaction qui s'évalue à -0,9Kcal/mol (Figure 34).



**Fig. 34 :** Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible PBP1.

### II.3.2.2. Docking des molécules sur la protéine ALR

Les meilleurs scores du docking des 83 molécules avec la protéine ALR sont présentés dans le tableau 18.

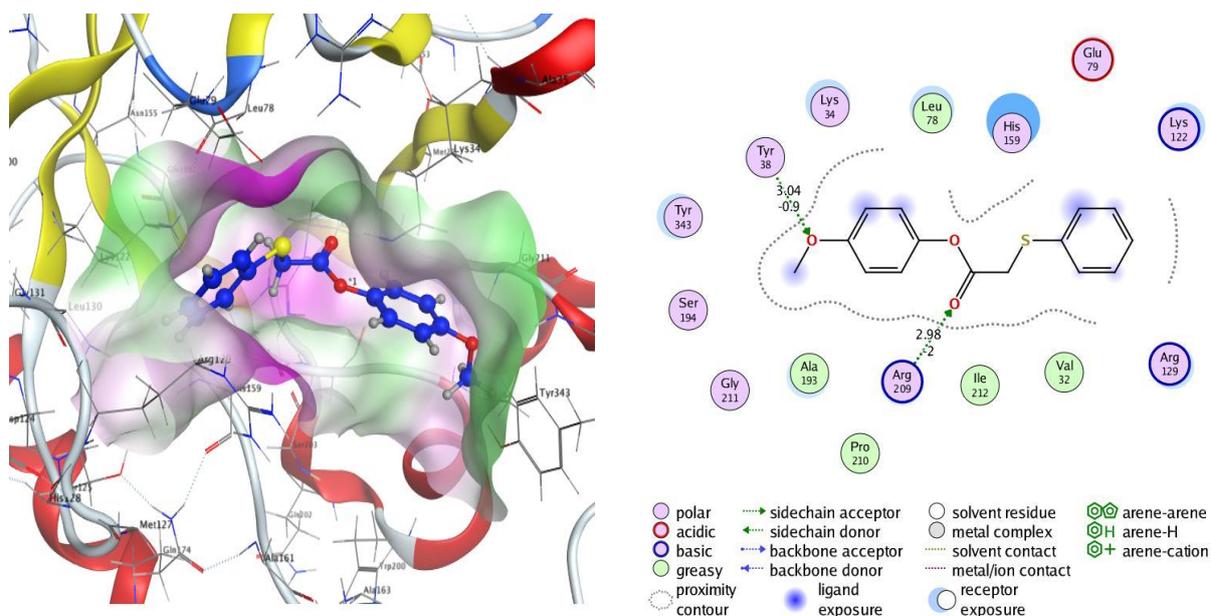
**Tableau 18:** Meilleurs scores d'interaction avec la protéine ALR.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-33255	Céfazoline	-2,8235
CID-33613	Amoxicilline	-5,2609
CID-532515	Phenylthioacetic acid, 4-methoxyphenyl ester	-6,7292
CID-608117	Anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9,10-dimethyl	-5,3982
CID-549159	3-Eicosyne	-5,334

△ Composé de l'huile de *H. cheirifolia*

L'alanine racémase est l'enzyme initiale dans la voie de biosynthèse de l'uridine diphosphate (UDP)-N-Acétilmuramyl-pentapeptide, précurseur du peptidoglycane de la paroi cellulaire (Shaw *et al.*, 1997).

Les résultats indiquent que le meilleur score est celui fourni par le phenylthioacetic acid, 4-methoxyphenyl ester avec une énergie d'interaction égale à -6,7292Kcal/mol suivi par l'anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9,10-dimethyl (-5,3982Kcal/mol) et le 3-eicosyne (-5,334Kcal/mol). Les énergies d'affinité de ces trois composés sont plus basses que celle enregistrée avec l'amoxicilline et la céfazoline. L'énergie du complexe phenylthioacetic-ALR résulte de la mise en place de deux liaisons hydrogène avec les acides aminés Tyr38 et Arg209 d'une distance de 3,04Å et 2,98Å respectivement en plus de nombreuses interactions hydrophobiques (Figure 35).



**Fig. 35:** Complexe Phenylthioacetic-ALR de docking

Dans le tableau 19 sont consignés les composés présentant des énergies d'interaction importantes avec la cible ALR et ayant un pourcentage  $\geq 2\%$ . Au vu de ces résultats, l' $\alpha$ -curcumène, le camphor, l'eudesm-7(11)-en-4-ol et le 1,8-cinéole faisant partie de l'HE de *S. africana* se sont révélés être de bons inhibiteurs de l'ALR. Le phellandral, le terpinène-4-ol et l'elemol, constituants de l'HE de *Juniperus thurifera* ont également montré un potentiel inhibiteur intéressant. Ces composés possèdent les scores d'affinités les plus négatifs, traduisant une plus forte affinité pour la protéine ALR.

**Tableau 19:** Meilleurs scores d'interaction entre les composés des HES étudiées ayant un pourcentage  $\geq 2\%$  et la protéine ALR.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-89488	Phellandral	-4,9018
CID-92139	$\alpha$ -Curcumene	-4,8038
CID-2537	Camphor	-4,778
CID-6432454	Eudesm-7(11)-en-4-ol	-4,7112
CID-2758	1,8-Cineole	-4,6415
CID-11230	Terpinene-4-ol	-4,2427
CID-92138	Elemol	-4,1146



Composé de l'huile de *S. africana*

Composé de l'huile de *J. thurifera*

Il apparait que les complexes formés sont stabilisés par des interactions hydrophobiques et des liaisons hydrogène. L'activité inhibitrice (stabilité du complexe) est améliorée par l'augmentation des interactions entre l'inhibiteur et les résidus du site actif. La figure 36 montre que le curcumène effectue une liaison hydrogène avec le résidu Arg129 d'une distance de 3,26Å. De même, une liaison hydrogène est observée entre le camphor et le Gly195 (3,28Å).

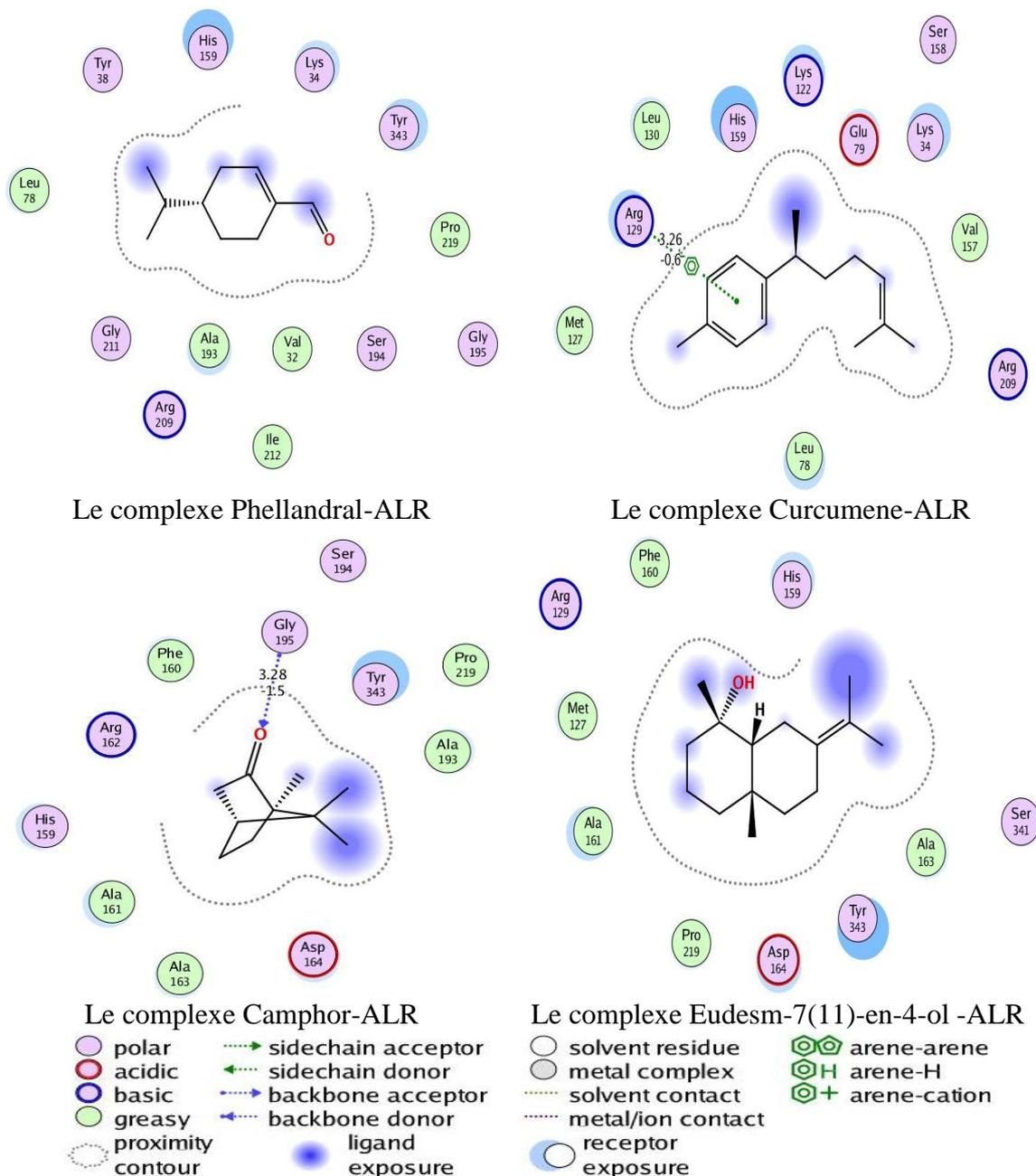


Fig. 36: Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible ALR.

### II.3.2.3. Docking des molécules sur la protéine DDL

Les protéines cibles (PBP1a, ALR et DDL) sont impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire. La D-alanine-D-alanine ligase (DDL) catalyse un précurseur essentiel (le dipeptide D-alanine-D-alanine) dans la biosynthèse du peptidoglycane (Neuhaus, 1962) et constitue une cible remarquable pour les antibiotiques. Il catalyse la formation de dipeptide D-alanine-D-alanine avant son addition à la chaîne peptidique du peptidoglycane, qui est un composant crucial de la paroi cellulaire. En conséquence, des efforts considérables ont été déployés pour découvrir de nouveaux inhibiteurs du DDL (Sova *et al.*, 2009).

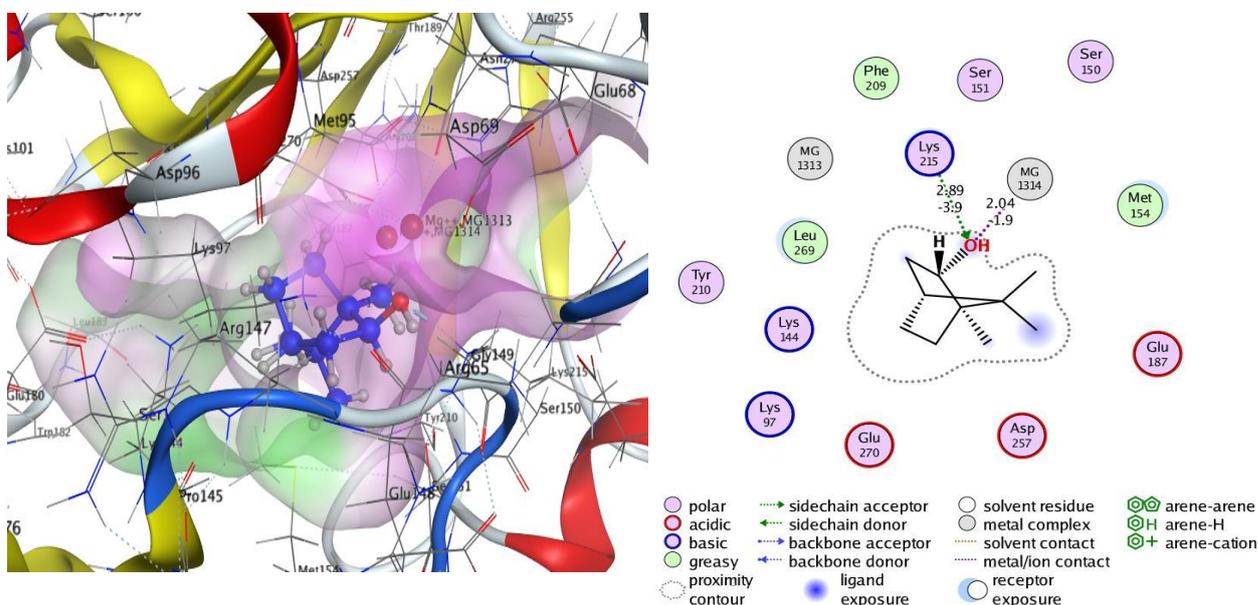
Les composés qui ont donné les meilleurs scores vis-à-vis du DDL sont présentés dans le tableau 20.

**Tableau 20:** Meilleurs scores d'interaction avec la protéine DDL.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-33255	Céfazoline	-7,3314
CID-33613	Amoxicilline	-5,6478
CID-64685	Borneol	-13,7531
CID-8748	Cis- $\beta$ -terpineol	-10,7761
CID-442202	(-)-Drimenin	-8,6961
CID-2537	Camphor	-8,2694

-  Composé majeur de l'huile de *S. africana*
-  Composé majeur de l'huile de *H. cheirifolia*

Les résultats montrent que parmi les 83 composés, 4 composés présentent une meilleure affinité pour la cible DDL que l'amoxicilline, et 4 composés ont montré une affinité pour la même cible supérieure à celle de la céfazoline. Le bornéol semble être le meilleur inhibiteur de la DDL avec une énergie d'interaction égale à -13,7531Kcal/mol qui est largement inférieure à celle de l'amoxicilline (-5,6478Kcal/mol) et céfazoline (-7,3314 Kcal/mol).



**Fig. 37:** Complexe Bornéol-DDL

L'analyse visuelle montre que le bornéol est bien placé dans la cavité du site actif grâce à de nombreuses interactions hydrophobiques et deux liaisons hydrogène établies avec les résidus Lys215 (2,89Å) et le Mg1334 (2,04Å) (Figure 37).

Le cis- $\beta$ -terpineol (-10,7761Kcal/mol), le (-)-drimenin (-8,6961Kcal/mol) et le comphor (-8,2694Kcal/mol) se sont montrés également de bons inhibiteurs.

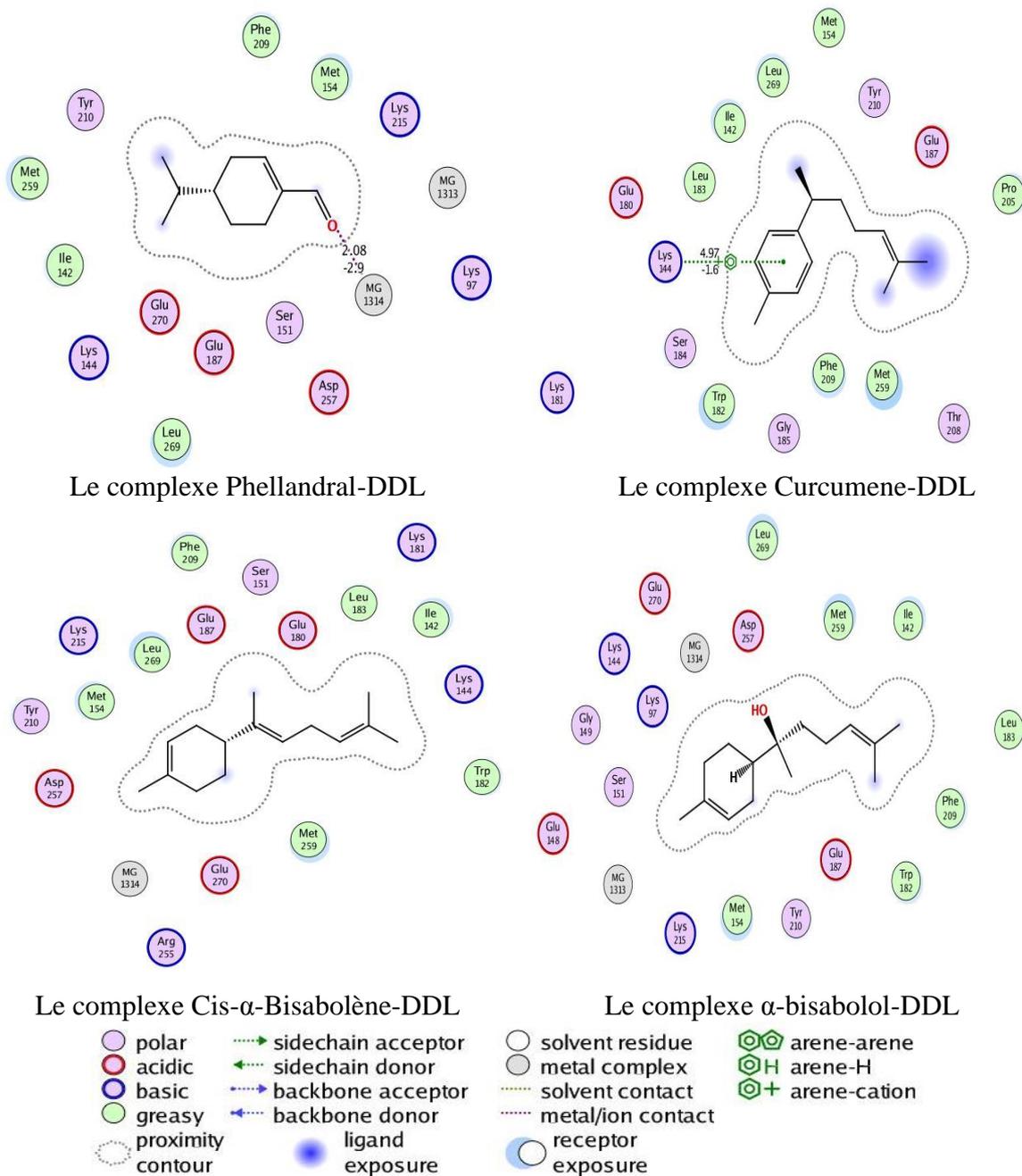
Le bornéol et le cis- $\beta$ -terpineol sont des composés mineurs de l'huile de *S. africana*, ils forment 0,9% et 0,49% respectivement de cette huile. Ils sont totalement absents dans les huiles de *Hertia* et *Juniperus*. Le comphor est présent dans les trois huiles mais en quantité plus importante (2,17%) dans l'HE de *S. africana*. Le (-)-drimenin, composé de l'huile de *Hertia* (3,44%) est un des principaux inhibiteurs de la PBP, il l'est aussi pour la DDL.

**Tableau 21:** Meilleurs scores de l'interaction entre les composés des HES testées ayant un pourcentage  $\geq 2\%$  et la protéine DDL.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-89488	Phellandral	-5,8881
CID-92139	$\alpha$ -Curcumene	-5,1277
CID-5352653	cis- $\alpha$ -Bisabolene	-5,0983
CID-1549992	$\alpha$ -Bisabolol	-5,049
CID-5281519	Germacrene B	-4,6444
CID-92138	Elemol	-4,5146
CID-11230	terpinene-4-ol	-4,4527
CID-5317570	Germacrene D	-4,4265
CID-102625	m-Mentha-6,8-diene	-4,2444

-  Composé de l'huile de *S. africana*
-  Composé de l'huile de *H. cheirifolia*
-  Composé de l'huile de *J. thurifera*

Dans le tableau ci-dessus, sont représentés les composés des HES ayant de bonnes valeurs énergétiques d'interaction traduisant une bonne affinité pour la protéine DDL. Cette affinité résulte essentiellement d'interactions hydrophobiques en plus de liaisons hydrogène (H bond) avec les résidus du site actif de la cible (Figure 38). L'activité inhibitrice du phellandral est due à une liaison hydrogène établie avec le Mg avec une  $H_{\text{bond}}$  score équivalent à -2,9Kcal/mol. De même, une liaison hydrogène effectuée avec la Lys144 (-1,6Kcal/mol) a été détectée pour le curcumène.



**Fig. 38:** Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible DDL.

#### II.3.2.4. Docking des molécules sur la protéine LDT

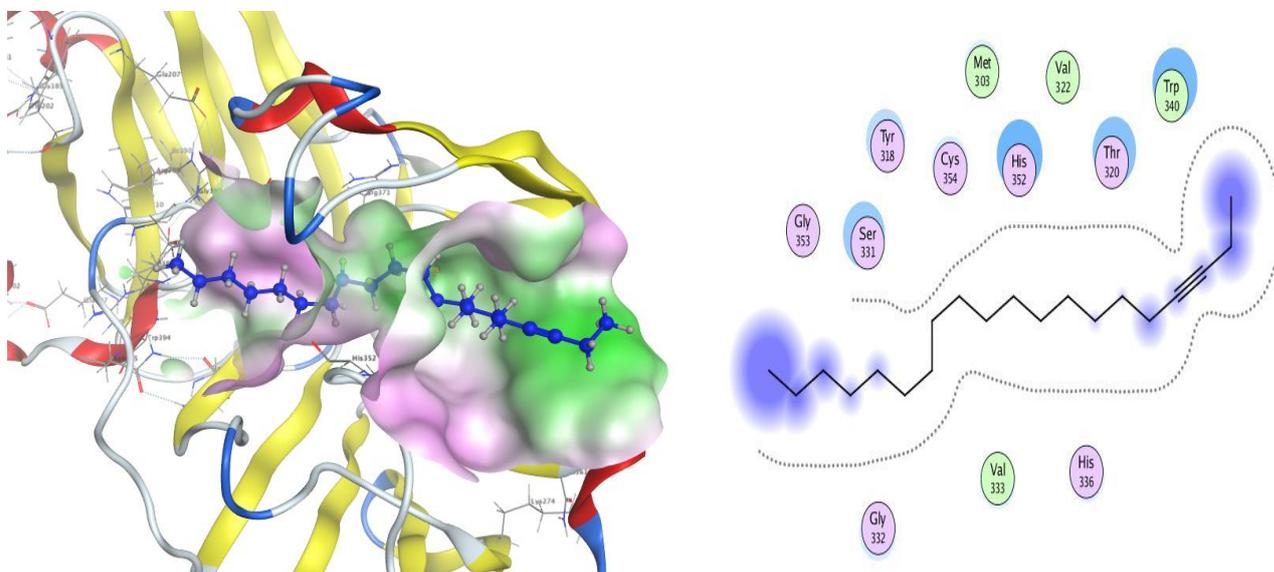
Les meilleurs résultats du docking des 83 molécules avec la protéine LDT sont représentés dans le tableau 22.

**Tableau 22:** Meilleurs scores d'interaction avec la protéine LDT.

Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-33255	Céfazoline	-7,3565
CID-33613	Amoxicilline	-5,1806
CID-549159	3-Eicosyne	-6,0466
CID-6429303	cis- $\alpha$ -Bergamotene	-5,9247
CID-5363426	Nerolidylacetate	-5,5979
CID-11770062	Cubenol	-5,2578

-  Composé de l'huile de *S. africana*
-  Composé de l'huile de *H. cheirifolia*
-  Composé de l'huile de *J. thurifera*

La meilleure interaction avec la L, D-Transpeptidase a eu lieu avec le 3-eicosyne qui a fourni une énergie d'interaction égale à -6,0466Kcal/mol suivi par le cis- $\alpha$ -bergamotène (-5,9247Kcal/mol), le nerolidylacétate (-5,5979 Kcal/mol) et le cubénol (-5,2578 Kcal/mol). Ces énergies d'interaction sont plus basses que celle de l'amoxicilline (-5,1806 Kcal/mol) mais supérieures à celle obtenue avec la céfazoline (-7,3565Kcal/mol). Le complexe LDT- 3-Eicosyne est stabilisé par des interactions de type hydrophobiques établies avec le Met 303, le Val 322 et Trp 340 (Figure 39).

**Fig. 39:** Complexe LDT- 3-Eicosyne

D'autres composés ont montré une bonne affinité pour cette cible, parmi lesquels nous citons:  $\alpha$ -bisabolol (-4,9056Kcal/mol), le terpinene-4-ol (-4,7983Kcal/mol), le camphor (-4,7850 Kcal/mol) et le sabinène (-4,7290 Kcal/mol) (Tableau 23).

**Tableau 23:** Meilleurs scores d'interaction entre les composés des HEs testées ayant un pourcentage  $\geq 2\%$  et la protéine LDT.

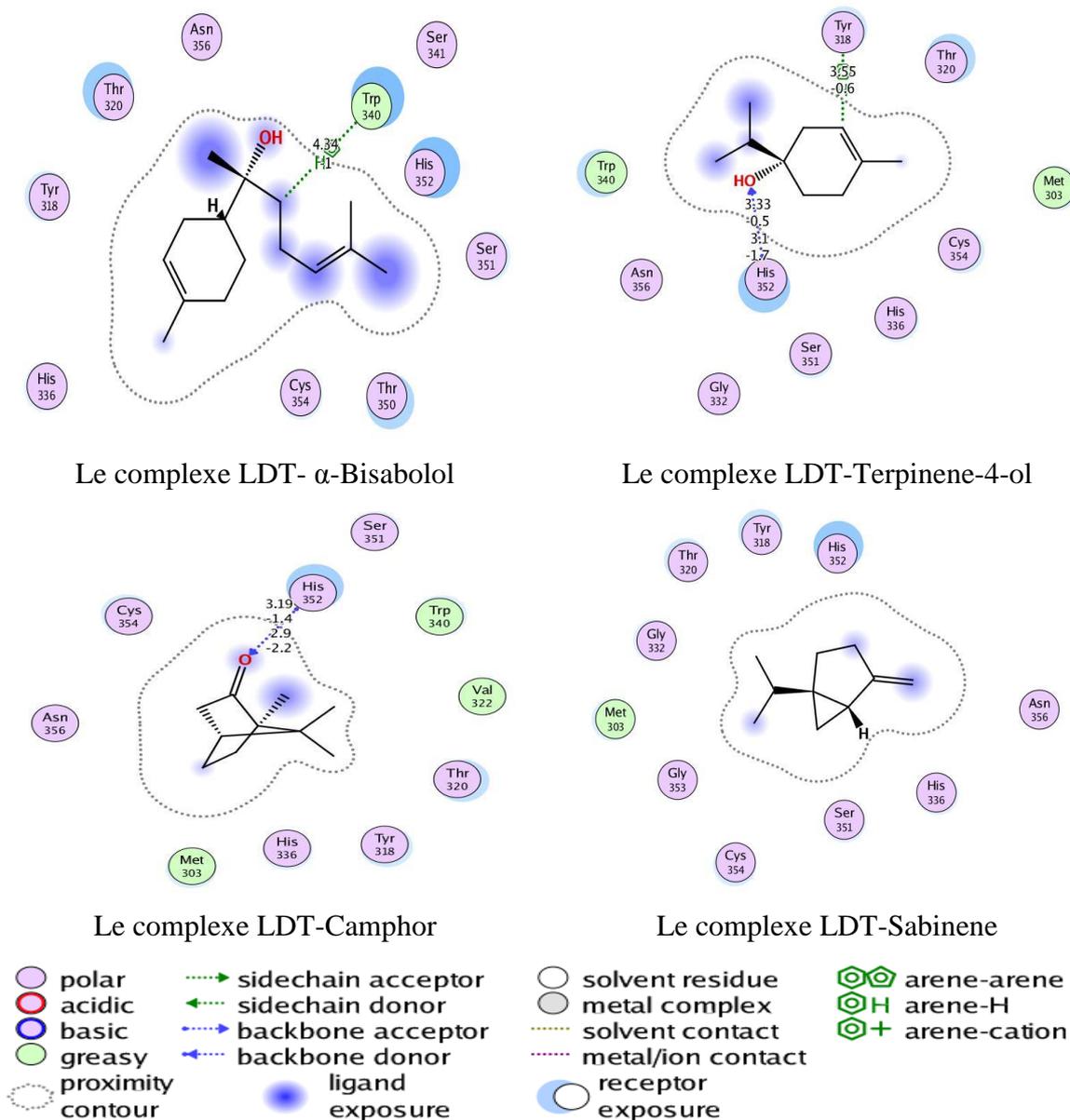
Code PubChem	Composé	Energie (-Kcal/mol)
CID-1549992	$\alpha$ -Bisabolol	-4,9056
CID-11230	Terpinene-4-ol	-4,7983
CID-2537	Camphor	-4,7850
CID-18818	Sabinène	-4,7290
CID-2758	1,8-Cineole	-4,6257
CID-92231	Spathulenol	-4,5037
CID-5281519	Germacrene B	-4,5000
CID-6549	Linalool	-4,4766
CID-442202	(-)-Drimenin	-4,4179
CID-92138	Elemol	-4,2933
CID-89488	Phellandral	-4,2458

-  Composé de l'huile de *S. africana*
-  Composé de l'huile de *H. cheirifolia*
-  Composé de l'huile de *J. thurifera*

La L,D- transpeptidase est présente dans la plupart des bactéries, elle joue un rôle dans la synthèse du peptidoglycane (Erdemli *et al.*, 2012). Actuellement, les B-lactames est la classe des médicaments la plus largement utilisée conçue pour cibler les liaisons 3-4 peptidiques en agissant comme substrats de L,D-transpeptidase (Sauvage *et al.*, 2008).

Les résultats du tableau 23 indiquent que parmi les composés susceptibles de former les complexes les plus stables avec la protéine L,D-transpeptidase, les constituants de l'huile de *Santolina* montrent plus d'affinité pour la LDT. Cela peut encore expliquer l'activité antibactérienne importante mis en évidence lors du test *in vitro*.

La figure 40 montre que les composés inhibiteurs établissent des interactions hydrophobiques avec la cible LDT. Les résidus Trp 340, Met 303 et Val 322 sont impliqués dans ces interactions. Des liaisons hydrogènes ont été observées entre l' $\alpha$ -bisabolol et le Trp 340 dont le score est égale à -1 Kcal/mol et une distance de 4,34Å. De même, le terpinene-4-ol établit deux liaisons hydrogène avec l'His 352 et une troisième liaison avec le Tyr 318. L'His352 est impliqué dans deux autres liaisons hydrogène détectées avec le camphor.



**Fig. 40:** Schémas des interactions de quelques constituants des HEs avec la cible LDT.

Les études du docking moléculaires des constituants des huiles essentielles sont rares. Sripathi et Ravi (2017) ont réalisé une étude du docking des constituants de l'HE de *Plectranthus hadiensis* vis-à-vis des protéines bactériennes présentes dans murD ligases 1UAG, 2X5O, 3UDI et 3TYE une enzyme dihydropteroate synthase. Le Caryophyllène, le germacrène et le cubebene se sont révélés les plus efficaces comme agents antibactériens en agissant sur plusieurs cibles protéiques. Singh *et al.* (2018) ont testé l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Juniperus communis* L. par le docking moléculaire contre trois cibles bactériennes; DNA gyrase Subunit B, Penicillin-binding

proteïn 2x et DNA topoisomerase 4 Subunit B. l' $\alpha$ -cadinol a donné le meilleur score avec la PBP 2x (-6,6 Kcal/mol) suivi par DNA gyrase Subunit B (-5,8 Kcal/mol) et TopoIV Subunit B (-5,0Kcal/mol). Dans le cas de notre étude, l' $\alpha$ -cadinol a révélé un potentiel inhibiteur intéressant vis-à-vis de la cible PBPa1 avec un score égal à -4,7327Kcal/mol. Biswal *et al.* (2019), ont étudié le potentiel inhibiteur des constituants de l'huile essentielle de *Trachyaspermum ammi* contre l'enzyme Candidapepsin-1. Le Ligustilide a donné le meilleur score (-5,75 kcal/mol) suivi par le cedrane avec -5,20 kcal/mol.

Ils convient de noter que parmi les composés montrant une bonne affinité vis-à-vis des quatre protéines testées, ceux de l'huile de *Santolina africana* sont majoritaires. Ceci explique les résultats démontrés *in-vitro*. Parmi ces composés nous citons: l' $\alpha$ -curcumene, le cis- $\alpha$ -bisabolene, l' $\alpha$ -bisabolol, le camphor, le spathulenol, l'eudesm-7(11)-en-4-ol et le 1,8-cineole qui ont montré une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des protéines testées. D'autres constituants de l'HE de *Juniperus Thurifera* (le phellandral, le linalool, terpinene-4-ol) et celle de *Hertia cheirifolia* ((-)-drimenin, germacrene B, 3-Eicosyne) ont également démontré un potentiel inhibiteur très intéressant. Nous notons que ces principaux inhibiteurs sont des composés oxygénés.

L'analyse visuelle des interactions a montré que ces inhibiteurs forment des complexes avec les cibles protéiques stabilisés principalement par des liaisons hydrogène favorisée par la présence de groupements hydroxyles et des atomes d'oxygène. Auxquelles s'ajoutent des interactions hydrophobiques avec les résidus du site actif. Cette hydrophobicité leur permet de traverser la membrane bactérienne. Ce résultat concorde avec ceux de Sripathi et Ravi (2017), Singh *et al.* (2018) et Biswal *et al.* (2019) qui ont rapporté que les constituants des HEs interagissent avec les cibles protéiques par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobiques.

### III. Activité antioxydant des huiles essentielles

L'activité antioxydant des trois huiles essentielles étudiées a été évaluée *in vitro* par deux méthodes : le piégeage du radical DPPH et la méthode de FRAP.

#### III.1. Test de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydant des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* a été évaluée en testant leur capacité de piégeage du radical libre DPPH. Les pourcentages d'inhibition des trois huiles essentielles sont présentés dans les tableaux 24, 25 et 26.

**Tableau 24:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de *S. africana*.

Activité antioxydant de l'HE de <i>S. africana</i>		Activité antioxydant de l'A. ascorbique	
Concentration mg/ml	PI %	Concentration $\mu\text{g/ml}$	PI %
18	92,90 $\pm$ 0,60	100	97,48 $\pm$ 0,22
9	83,47 $\pm$ 3,71	50	97,26 $\pm$ 0,11
4,5	71,43 $\pm$ 4,96	25	87,38 $\pm$ 0,06
2,25	68,77 $\pm$ 2,61	12,5	61,45 $\pm$ 0,17
1,13	55,30 $\pm$ 2,65	6,25	25,71 $\pm$ 0,11
0,56	37,70 $\pm$ 2,63	3,12	12,55 $\pm$ 0,06
0,28	23,30 $\pm$ 0,70		

Les résultats obtenus nous permettent de constater que le pourcentage d'inhibition est dépendant de la concentration du substrat. L'augmentation de la concentration provoque l'augmentation du pourcentage d'inhibition qui se traduit par une activité antioxydant plus importante.

Les valeurs de l'activité antioxydant de l'HE de *S. africana*, varient entre 23,3% et 92,9% pour des concentrations allant de 0,28 à 18 mg/ml. Une réduction de 50% du radical DPPH a été obtenue à une concentration inférieure à 1,13 mg/ml (Tableau 24).

Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux rapportés par Derouiche *et al.* (2013) dans leur étude réalisée sur l'effet antioxydant des HEs des fleurs de *S. africana* récoltée de Constantine (Algérie). Ils ont montré que les HEs à la concentration  $10^{-1}$  réduisent 13,80% du radical DPPH.

Le potentiel antioxydant mis en évidence dans notre étude dépasse largement celui de *S. chamaecyparissus* collectée en Algérie par Nouasri *et al.* (2015) qui ont trouvé une faible activité antioxydant avec une  $CI_{50}$  égale à 43,010mg/ml contre 0,072 mg/ml pour le BHT et 0,004 mg/ml pour l'acide ascorbique.

**Tableau 25:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de *J. thurifera*.

Activité antioxydant de l'HE de <i>J. thurifera</i>		Activité antioxydant de l'A. ascorbique	
Concentration mg/ml	PI %	Concentration $\mu$ g/ml	PI %
34	86,87 $\pm$ 1,46	100	97,48 $\pm$ 0,22
17	69,35 $\pm$ 3,10	50	97,26 $\pm$ 0,11
8,5	52,58 $\pm$ 3,58	25	87,38 $\pm$ 0,06
4,25	16,49 $\pm$ 4,72	12,5	61,45 $\pm$ 0,17
2,125	05,57 $\pm$ 4,19	6,25	25,71 $\pm$ 0,11
		3,12	12,55 $\pm$ 0,06

Concernant l'essence des graines de *J. thurifera*, nous avons enregistré des pourcentages d'inhibition compris entre 5,57% et 86,87% pour des concentrations allant de 2,125mg/ml à 34mg/ml. La concentration 8,5 mg/ml de l'huile a provoqué l'inhibition de 52,58% du radical DPPH (Tableau 25).

Satrani *et al.* (2015) ont évalué le potentiel antioxydant des huiles essentielles de *Juniperus thurifera*, *J. Oxycedrus* et *J. phoenicea* du Maroc. Ils ont mis en évidence que le pouvoir antioxydant de *J. thurifera* est le plus important avec une  $CI_{50}$  de 4,75 $\mu$ g/ml contre 4,90 $\mu$ g/ml pour *J. oxycedrus* et 5,50 $\mu$ g/ml pour *J. phoenicea*. Ceci a été justifié par la richesse de l'huile du genévrier thurifère en terpènes oxygénés.

**Tableau 26:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH de l'HE de *H. cheirifolia*.

Activité antioxydant de l'HE de <i>H. cheirifolia</i>		Activité antioxydant de l'A. ascorbique	
Concentration mg/ml	PI %	Concentration $\mu$ g/ml	PI %
3,8	90,53 $\pm$ 0,55	100	97,48 $\pm$ 0,22
1,9	82,50 $\pm$ 0,26	50	97,26 $\pm$ 0,11
0,95	73,73 $\pm$ 1,12	25	87,38 $\pm$ 0,06
0,47	67,07 $\pm$ 2,75	12,5	61,45 $\pm$ 0,17
0,23	05,37 $\pm$ 0,81	6,25	25,71 $\pm$ 0,11
		3,12	12,55 $\pm$ 0,06

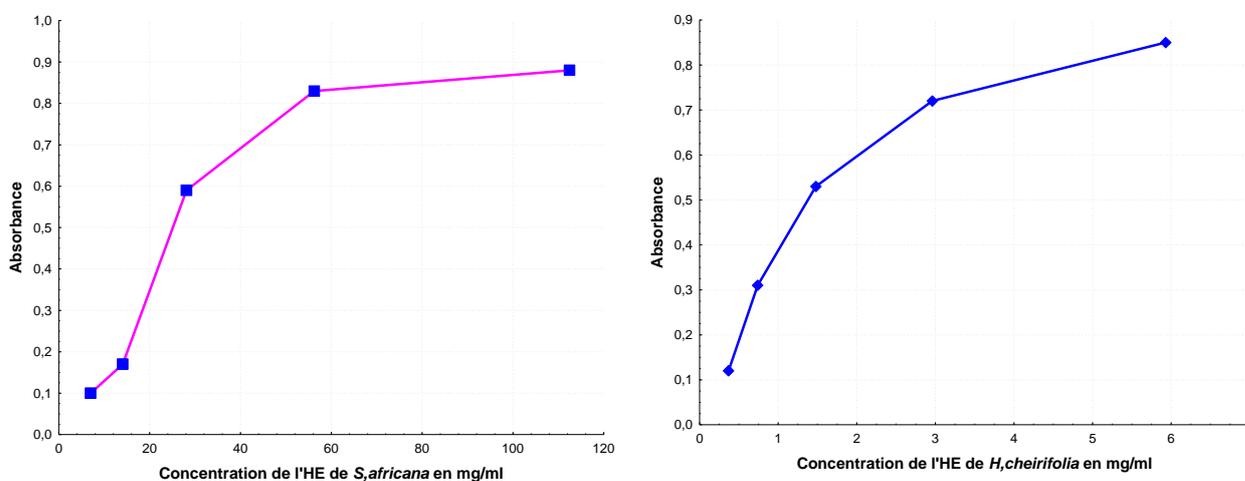
L'HE de *H. cheirifolia* semble être la plus active. Les résultats montrent que la concentration 0,47 mg/ml a pu inhiber 67,07% du radical DPPH alors que le pourcentage d'inhibition a atteint 90,53% à la concentration 3,8mg/ml. L'activité antioxydant importante de l'HE de *H. cheirifolia* a été démontrée dans des études antérieures. Majouli *et al.* (2016) ont rapporté des  $CI_{50}$  variant entre  $0,016 \pm 0,003$  mg/ml et  $0,024 \pm 0,001$  mg/ml pour les HEs extraites de différentes parties de *H. cheirifolia*. Ce qui est supérieur à nos résultats. De même, un potentiel antioxydant important dépassant celui de l'acide ascorbique de l'HE des feuilles de *H. cheirifolia* a été mis en évidence par Segueni *et al.* (2017).

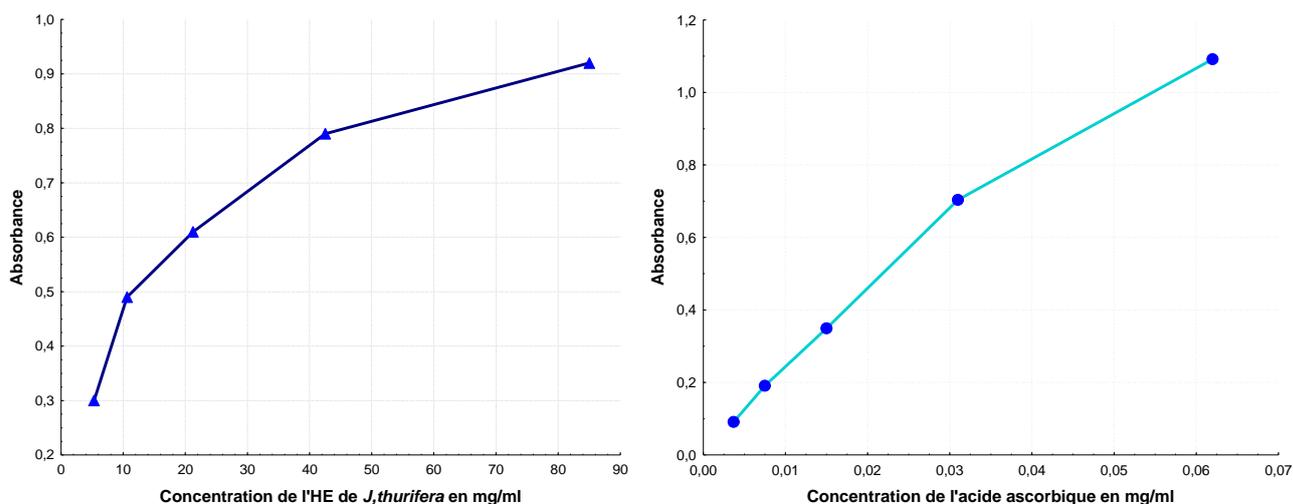
Il est à souligner que les activités antioxydant des trois huiles essentielles étudiées restent très faibles par rapport à celle du contrôle positif représenté par l'acide ascorbique dont l' $CI_{50} = 0,012$  mg/ml.

### III.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

L'activité antioxydant des HEs étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. C'est une méthode simple, très rapide, peu coûteuse et reproductible, qui peut être appliquée au dosage des antioxydants dans les plantes.

Le pouvoir réducteur des HEs testées se traduit par l'augmentation de la densité de la couleur bleu due à la réduction du fer ferrique  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe de ferricyanure de potassium au fer ferreux  $Fe^{2+}$ . Cette réduction mesurée par spectrophotométrie à 700nm nous a permis de tracer les courbes pour chaque huile (**Figure 41**).





**Fig. 41:** Pouvoir réducteur du Fer des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia*, *J. thurifera* et de l'acide ascorbique.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des HEs. Comme pour le test de DPPH, le pouvoir réducteur de l'HE de *H. cheirifolia* est largement supérieur à celui des deux HEs de *Juniperus* et *Santolina*. En effet une absorbance égale à 9 a été enregistrée à la concentration 6 mg/ml tandis que la même absorbance a été obtenue avec les concentrations 80mg/ml et 113mg/ml pour l'HE de *J. thurifera* et *S. africana* respectivement. En comparant la capacité de réduction du fer des huiles essentielles testées avec celle de la substance de référence (acide ascorbique), nous remarquons qu'elle est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique dont la concentration 0,060 mg/ml a provoqué une réduction presque totale.

Nous pouvons classer nos huiles par ordre d'activité décroissant selon la méthode de FRAP: HE de *H. cheirifolia* > *J. thurifera* > *S. africana* (Tableau 27). Le classement selon la méthode de DPPH est différent : *H. cheirifolia* > *S. africana* > *J. thurifera*.

**Tableau 27:** Pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées.

HE	Pouvoir réducteur (EAA/mg)
HE de <i>H. cheirifolia</i>	7,60 µg EAA/mg d'HE
HE de <i>J. thurifera</i>	0,98 µg EAA/mg d'HE
HE de <i>S. africana</i>	0,78µg EAA/mg d'HE

La différence de capacité antioxydant mesurée avec les deux tests entre les trois huiles pourraient être expliquée par les différents mécanismes impliqués dans chaque test; chaque HE a une composition différente avec par conséquent des capacités spécifiques à participer à ces mécanismes (Ballester-Costa *et al.*, 2017).

Il a été démontré que les huiles essentielles qui présentent des teneurs élevées en composés terpéniques possèdent des propriétés de piégeage de radical DPPH remarquables (Zouari *et al.*, 2011). La capacité inhibitrice des huiles essentielles est due à la présence de composés hydroxylés tels que les terpénoïdes. Parmi les composés terpéniques, les monoterpènes hydrocarbonés sont connus pour avoir des activités antioxydants notables (Elansary *et al.*, 2012). La richesse de nos huiles en ces composés (50,76% pour *H. cheirifolia*, 31,98% pour *J. thurifera* et 24,89% pour *S. africana*) pourrait justifier leur activité antioxydant.

En plus de sa richesse en monoterpènes hydrocarbonés, la bonne capacité antioxydant mise en évidence de l'HE de *H. cheirifolia* peut être justifiée par sa teneur en sesquiterpènes lactones (Drymane type et Drimenin). D'après Amoah *et al.* (2015), ces composés sont connus pour avoir des activités antioxydants et inhibitrices de nombreuses enzymes impliquées dans des maladies. En revanche, Il est difficile d'attribuer l'activité antioxydant d'une huile essentielle à un ou à un nombre de ces constituants car les composés majeurs et mineurs contribuent ensemble à cette activité (Wang *et al.*, 2008).

Le pouvoir antioxydant des HEs dépend non seulement de leur composition, mais aussi de nombreux autres facteurs tels que : la concentration, la température, la lumière, le type de substrat, l'état physique du système ainsi que les différents composants agissant comme prooxydants ou composants de synergie (Pokorný *et al.*, 2001).

## VI. Phytotoxicité des huiles essentielles

### VI.1. Paramètres de germination

La phytotoxicité des trois huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* a été évaluée en mesurant des paramètres de germination à savoir ; le pourcentage de germination et la vitesse de germination.

#### a- Pourcentage de germination

L'effet allélopathique des huiles essentielles de *Santolina africana*, *Hertia cheirifolia* et *Juniperus thurifera* sur la germination des graines de *T. durum* et *L. sativa* a été déterminé (Tableau 28).

**Tableau 28:** Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la germination des graines de *T. durum* et *L. sativa*.

C (µl/l)	<i>S. africana</i>		<i>H. cheirifolia</i>		<i>J. thurifera</i>	
	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>
0	96,67±5,77 <sup>a</sup>	94,44±0,58 <sup>a</sup>	96,67±5,77 <sup>a</sup>	94,44±0,58 <sup>a</sup>	96,67±5,77 <sup>a</sup>	94,44±0,58 <sup>a</sup>
100	73,33±11,54 <sup>b</sup>	76,66±6,67 <sup>b</sup>	93,33±3,05 <sup>a</sup>	75,55±1,92 <sup>b</sup>	60±00 <sup>b</sup>	81,11±6,94 <sup>b</sup>
200	23,33±11,54 <sup>c</sup>	73,33±3,33 <sup>bc</sup>	90±00 <sup>a</sup>	70±3,33 <sup>b,c</sup>	46,66±5,77 <sup>c,d</sup>	72,22±3,85 <sup>c</sup>
400	10±5,77 <sup>d</sup>	65,55±10,18 <sup>c</sup>	60±17,32 <sup>b</sup>	66,67±3,33 <sup>c</sup>	40±10 <sup>d</sup>	70,00±5,75 <sup>c</sup>
800	0 <sup>d</sup>	52,22±3,85 <sup>d</sup>	13,33±5,77 <sup>c</sup>	48,89±1,92 <sup>d</sup>	30±00 <sup>e</sup>	57,78±1,92 <sup>d</sup>
1600	0 <sup>d</sup>	41,11±0,58 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	43,33±2,65 <sup>d</sup>	16,66±5,77 <sup>f</sup>	57,77±3,85 <sup>d</sup>
Valeurs P	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,001***

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ).

L'analyse de la variance indique que le pourcentage de germination (PG) des grains de blé dur (*Triticum durum*) et la laitue pommée (*Lactuca sativa*) sont significativement affectés à  $P<0.001$  par les différentes concentrations des huiles essentielles étudiées.

Toutes les concentrations affectent le pourcentage de germination mais à des degrés d'inhibition différents ce qui reflète le potentiel allélopathique des espèces. L'effet sur la capacité germinative varie en fonction du type de l'huile essentielle utilisée, la dose appliquée et l'espèce testée.

Pour l'HE de *S. africana*, les plus fortes concentrations (800 $\mu$ l/l et 1600 $\mu$ l/l) ont causé une inhibition totale de la germination de blé dur alors qu'avec les mêmes concentrations cette inhibition n'a été que partielle pour *L. sativa* où on a enregistré 44,70% et 56,46% respectivement par rapport au témoin. Les concentrations 400 $\mu$ l/l et 200  $\mu$ l/l ont entraîné une diminution du pourcentage de germination de 89,65% et 75,86% respectivement de *T. durum* et 30,59% et 22,35% respectivement de *L. sativa*. Il est à signaler que l'inhibition de la germination est dépendante de la concentration. Le pourcentage de la germination de *T. durum* et *L. sativa* a été réduit de 24,14% et 18,82% respectivement par la plus faible concentration (100 $\mu$ l/l) par rapport au témoin.

Concernant l'HE de *H. cheirifolia*, la concentration 1600 $\mu$ l/l provoque une inhibition totale de la germination de blé dur contre 54,11% de la laitue. Le taux de germination de *T. durum* a été réduit de 86,21% par la concentration 800 $\mu$ l/l alors que le pourcentage d'inhibition n'a été que de 48,23% pour *L. sativa*. La germination de blé a été inhibée à 37,93%, 6,89% et 3,45% par les concentrations 400 $\mu$ l/l, 200 $\mu$ l/l et 100 $\mu$ l/l respectivement par rapport au témoin contre 29,40%, 25,87% et 20% pour *L. sativa* aux mêmes concentrations. Nous constatons que l'effet inhibiteur de l'huile de *H. cheirifolia* est plus intense sur le blé dur.

Il est à noter que les faibles doses de *H. cheirifolia* (100 $\mu$ l/l et 200 $\mu$ l/l) inhibent la germination de *T. durum* de manière non significative par rapport au témoin.

Pour ce qui est de l'HE de *J. thurifera*, les résultats indiquent que la capacité germinative des graines de blé dur mises en culture en présence de la dose maximale (1600 $\mu$ l/l) a été réduite de 82,76% contre 38,82% pour *Lactuca sativa*. Comme pour les deux huiles de *Santolina* et *Hertia*, le blé dur s'est montré plus sensible à l'huile de *Juniperus* par rapport à la laitue. Toutes les concentrations ont inhibé la germination de *T. durum* de façon significative. Par contre dans le cas de *L. sativa*, la concentration 800 $\mu$ l/l a provoqué le même degré d'inhibition que la concentration 1600 $\mu$ l/l. De même, le pourcentage de germination n'a pas changé significativement suite aux traitements par les concentrations 400 $\mu$ l/l et 200 $\mu$ l/l (Figure 42 et 43).

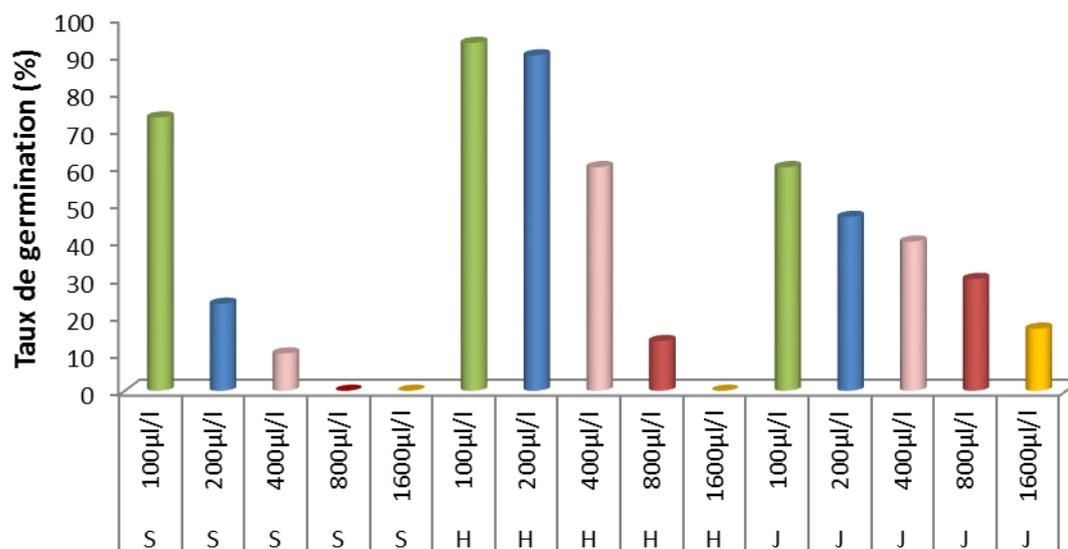


Fig. 42: Effets des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la capacité germinative de *T. durum*.

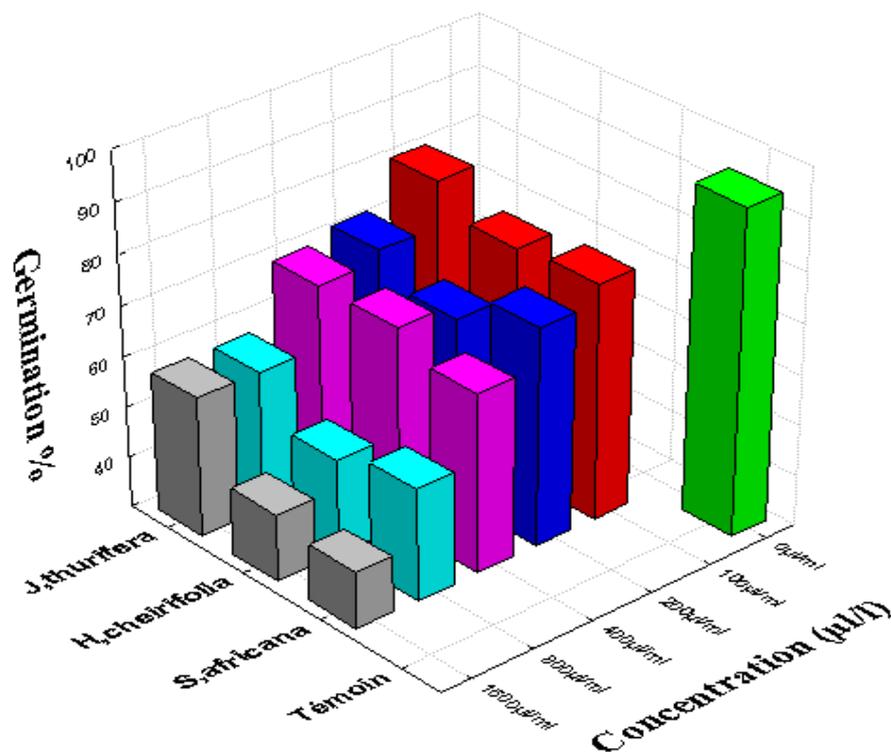


Fig. 43: Taux de germination des graines de *L. sativa* traitées avec différentes concentrations des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera*.

**b- Vitesse de germination**

Les résultats de l'effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la vitesse de germination du blé dur et de la laitue pommée sont présentés dans le tableau 29.

**Tableau 29.** Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la vitesse de germination de *T. durum* et *L. sativa*.

C (µl/l)	<i>S. africana</i>		<i>H. cheirifolia</i>		<i>J. thurifera</i>	
	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>	<i>T. durum</i>	<i>L. sativa</i>
0	4,47±0,12 <sup>a</sup>	17,09±1,16 <sup>a</sup>	4,47±0,12 <sup>a</sup>	17,09±1,16 <sup>a</sup>	4,47±0,12 <sup>a</sup>	17,09±1,16 <sup>a</sup>
100	2,97±0,22 <sup>b</sup>	12,46±1,26 <sup>b</sup>	3,29±0,39 <sup>b</sup>	12,59±0,65 <sup>b</sup>	1,82±0,29 <sup>b</sup>	12,12±1,07 <sup>b</sup>
200	0,60±0,23 <sup>c</sup>	11,10±0,41 <sup>b</sup>	2,80±0,34 <sup>b</sup>	12,37±1,13 <sup>b</sup>	1,61±0,08 <sup>b</sup>	11,96±0,41 <sup>b</sup>
400	0,39±0,25 <sup>c</sup>	8,45±1,07 <sup>c</sup>	1,40±0,38 <sup>c</sup>	8,89±0,81 <sup>c</sup>	1,19±0,29 <sup>c</sup>	11,09±1,57 <sup>b</sup>
800	0 <sup>c</sup>	5,95±0,53 <sup>d</sup>	0,32±0,07 <sup>d</sup>	6,16±1,05 <sup>d</sup>	1,08±0,30 <sup>c</sup>	6,74±1,58 <sup>c</sup>
1600	0 <sup>c</sup>	4,18±0,90 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>	5,00±0,86 <sup>d</sup>	0,44±0,21 <sup>d</sup>	6,39±0,31 <sup>c</sup>
Valeurs P	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ).

Les trois huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* affectent significativement la vitesse de germination des graines de blé dur de manière dose-dépendante. L'action des huiles sur la vitesse de germination est similaire à celle observée pour la capacité germinative. En effet, nous avons enregistré une diminution graduelle de la vitesse de germination suite à l'augmentation de la concentration des trois huiles. Comme était le cas avec le pourcentage de germination, l'huile de *S. africana* se montre la plus active, particulièrement vis-à-vis du blé dur.

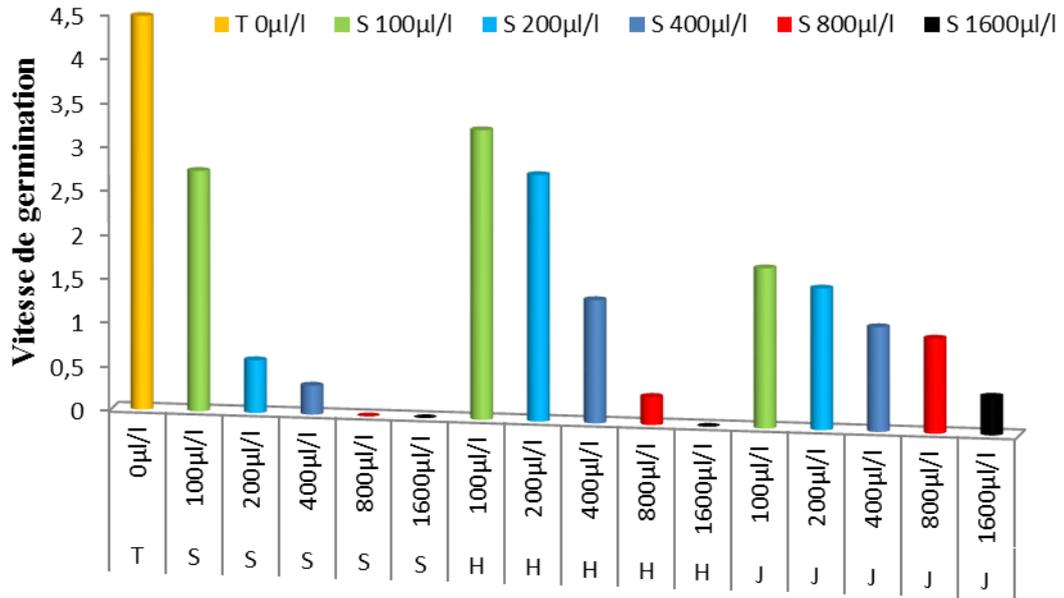


Fig. 44: Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la vitesse de germination des graines de *T. durum*.

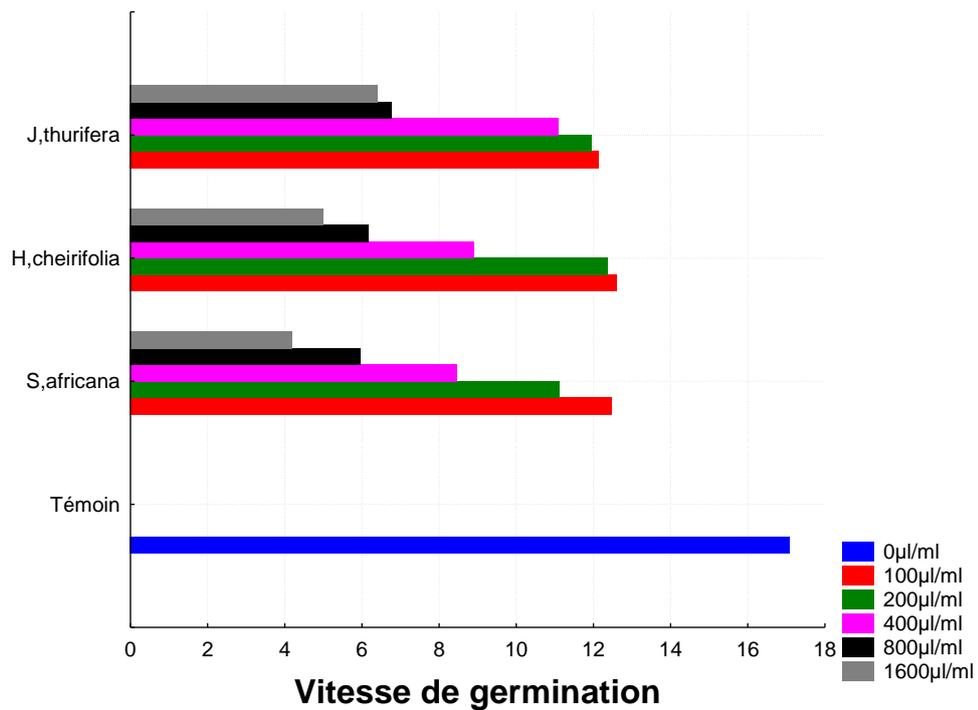


Fig. 45: Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la vitesse de la germination de *L. sativa*.

## VI.2. Test de croissance

L'effet allélopathique des huiles essentielles de *Santolina africana*, *Hertia cheirifolia* et *Juniperus thurifera* sur la croissance racinaire et aérienne de *T. durum* a révélé une inhibition très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) (Tableau 30).

**Tableau 30** : Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la croissance de la tige et la racine de *T. durum*.

C (µl/l)	<i>S. africana</i>		<i>H. cheirifolia</i>		<i>J. thurifera</i>	
	LT	LR	LT	LR	LT	LR
0	5,31±3,5 <sup>a</sup>	7,13±2,0 <sup>a</sup>	5,31±3,5 <sup>a</sup>	7,13±2,0 <sup>a</sup>	5,31±3,5 <sup>a</sup>	7,13±2,0 <sup>a</sup>
100	2,39±0,51 <sup>b</sup>	4,6±0,34 <sup>b</sup>	4,26±0,64 <sup>b</sup>	4,16±0,76 <sup>b</sup>	4,43±1,53 <sup>b</sup>	6,50±0,87 <sup>b</sup>
200	1,84±0,41 <sup>bc</sup>	3,71±0,43 <sup>b</sup>	3,55±0,29 <sup>b</sup>	2,47±0,29 <sup>c</sup>	4,27±2,00 <sup>bc</sup>	5,83±1,67 <sup>c</sup>
400	1,08±0,07 <sup>cd</sup>	1,89±0,45 <sup>c</sup>	3,52±2,01 <sup>b</sup>	2,36±0,58 <sup>c</sup>	3,53±0,50 <sup>cd</sup>	4,33±2,31 <sup>d</sup>
800	1,04±0,13 <sup>cd</sup>	1,17±0,34 <sup>c</sup>	1,58±0,76 <sup>c</sup>	1,81±0,29 <sup>cd</sup>	3,04±0,58 <sup>d</sup>	2,50±0,87 <sup>e</sup>
1600	0,29±0,02 <sup>d</sup>	0,31±0,01 <sup>c</sup>	1,47±0,58 <sup>c</sup>	1,16±0,58 <sup>d</sup>	1,22±0,50 <sup>e</sup>	0,40±1,17 <sup>f</sup>
Valeurs P	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	<0,001 ***

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).

D'après le tableau 30, les huiles essentielles exercent un effet inhibiteur sur la croissance, qui s'est traduit par la diminution de la longueur de la partie aérienne et racinaire. Nous notons que cet effet inhibiteur est positivement proportionnel à la concentration des huiles. En effet, la longueur de la tige ainsi que celle de la racine des graines soumises aux traitements diminue avec l'augmentation de la concentration des huiles.

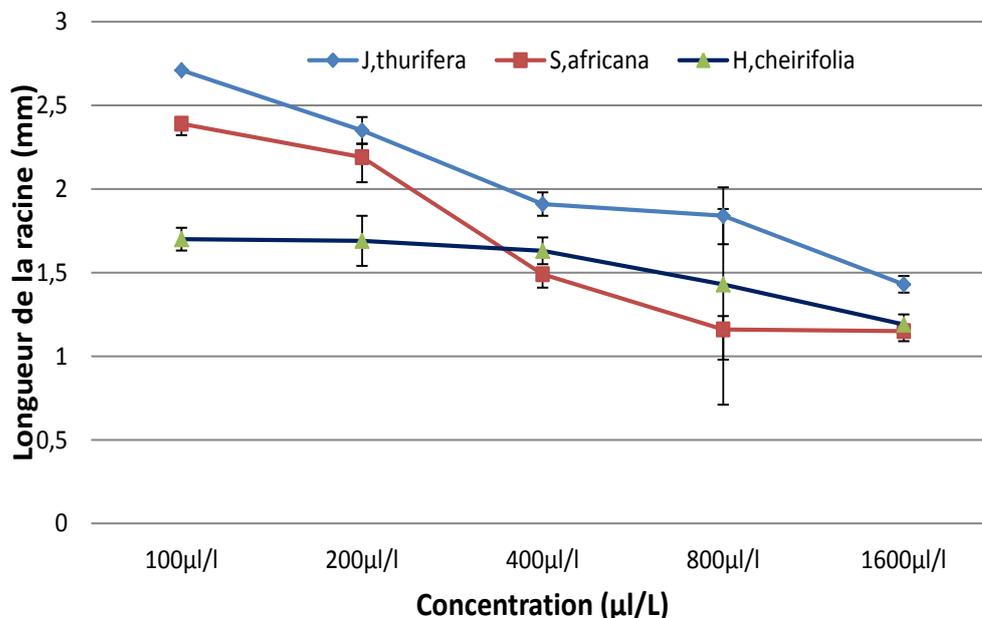
A la plus forte concentration (1600 µl/l) de l'huile de *S. africana*, la répression est telle que la croissance de la tige de *T. durum* est inhibée à 94,53%. L'effet inhibiteur de la croissance racinaire est aussi important (95,65%). A la même concentration, les HES de *Hertia* et *Juniperus* inhibent la croissance de la tige de blé dur à 72,31% et 77,02% respectivement. Alors que la croissance racinaire diminue à 83,73% et 94,38% par les deux huiles respectivement.

**Tableau 31.** Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la croissance racinaire de *L. sativa*.

C (µl/l)	<i>S. africana</i>	<i>H. cheirifolia</i>	<i>J. thurifera</i>
0	2,75±0,08 <sup>a</sup>	2,75±0,08 <sup>a</sup>	2,75±0,08 <sup>a</sup>
100	2,39±0,03 <sup>b</sup>	1,7±0,07 <sup>b</sup>	2,71±00 <sup>a</sup>
200	2,19±0,08 <sup>b</sup>	1,69±0,15 <sup>b</sup>	2,35±0,08 <sup>b</sup>
400	1,49±0,02 <sup>c</sup>	1,63±0,08 <sup>b</sup>	1,91±0,07 <sup>c</sup>
800	1,16±0,08 <sup>c d</sup>	1,43±0,45 <sup>b c</sup>	1,84±0,17 <sup>c</sup>
1600	1,15±0,03 <sup>d</sup>	1,19±0,06 <sup>c</sup>	1,43±0,05 <sup>d</sup>
Valeurs P	<0,001***	<0,001***	<0,001***

Les valeurs des moyennes de la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ).

Tous les traitements réduisent significativement la croissance racinaire de la laitue et cet effet est plus remarquable avec les fortes concentrations (800µl/l et 1600µl/l). Cependant la réduction reste modérée et ne dépassant pas 60%. Une différence significative a été trouvée entre le témoin et les autres doses des trois HEs, à l'exception de la plus faible dose (100µl/l) de l'HE de genévrier qui a causé une réduction non significative (1,45%) de la croissance racinaire par rapport au témoin (Figure 46).



**Fig. 46:** Effet des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* sur la croissance de la partie racinaire de *L. sativa*.

Les résultats présentés dans cette partie, relatifs à l'évaluation du potentiel phytotoxique des trois huiles ont permis de mettre en valeur des propriétés phytotoxiques intéressantes vis-à-vis de l'espèce *Triticum durum* et à moindre degré *Lactuca sativa*. Le blé dur a démontré une plus grande sensibilité aux trois huiles étudiées. D'autre part, l'huile de *Santolina africana* s'est révélée la plus active.

L'activité phytotoxique de nos huiles essentielles est principalement due à leurs compositions chimiques riches en composés oxygénés et hydrocarbonés. Généralement, l'effet allélopathique des huiles essentielles a été attribué à leur composition chimique et aux espèces sur lesquelles elles sont appliquées (Verdeguer *et al.*, 2009). Les effets allélopathiques mis en évidence dans la présente étude sont en accord avec ce qui a été rapporté par Tworkoski (2002) et Kaur *et al.* (2010) que les huiles essentielles et leurs terpènes constitutifs empêchent la germination et la croissance des plantes.

Les HEs riches en composés oxygénés ont été rapportées pour avoir une activité phytotoxique plus importante que celle des HEs riches en dérivés d'hydrocarbures (Lopez *et al.*, 2008). Dans le cas de notre étude, la fraction oxygénée dans l'HE de *Santolina* est de 41,89% contre 40,65% dans l'HE de *Juniperus* alors que *H. cheirifolia* en contient 5,36%. Cette richesse en composé oxygénés pourrait justifier le potentiel allélopathique important de l'HE de *Santolina africana*.

Salamci *et al.* (2007) ont attiré l'attention que les propriétés phytotoxiques des HEs sont généralement attribuées aux composés majeurs sans exclure la possibilité d'interactions avec d'autres composés (cas d'antagonisme, de synergisme et d'addition des effets). Certains composés majeurs des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* ont été déjà rapportés pour avoir un effet phytotoxique, parmi lesquels; l' $\alpha$  pinène (De Feo *et al.*, 2002; Abraham *et al.*, 2003; De Martino *et al.*, 2010), le  $\beta$ -pinène (De Almeida *et al.*, 2011), le 1,8-cinéole (Abraham *et al.*, 2003; De Almeida *et al.*, 2011), le germacrene D (Wyse *et al.*, 2013), le linalool et le comphor (Jassbi *et al.*, 2010).

Les composés terpénoïdes, peuvent inhiber la germination en modifiant la perméabilité membranaire, la respiration, les activités enzymatiques, la transcription de l'ADN et la traduction de l'ARN (El-Shora et Abd El-Gawad, 2014). Il a été rapporté que les monoterpènes possèdent des effets phytotoxiques qui peuvent causer des changements anatomiques et physiologiques dans le développement des plantes. Il en résulte

l'accumulation des lipides dans le cytoplasme et la réduction du nombre de certains organites comme les mitochondries (Nishida *et al.*, 2005).

L'inhibition de la croissance peut être le résultats de l'inhibition de la prolifération des cellules méristématiques des apex racinaires entraînée par les huiles essentielles et leurs constituants terpénoïdes (Kaur *et al.*, 2010).

---

# *Conclusion*

---

## Conclusion

Grace à leur diversité et leur complexité, les produits naturels issus des plantes aromatiques ont fait et demeurent l'objet de nombreux travaux de recherche, lors desquels des propriétés biologiques très intéressantes ont été mises en évidence. L'étude de telles propriétés biologiques dans le but de trouver de nouveaux agents naturels doués de potentiel antibactérien, antioxydant et phytotoxique est une piste de recherche très utile et intéressante.

Nous avons entrepris le présent travail dans le but de contribuer à valoriser et enrichir le catalogue de la flore algérienne par l'étude de la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles extraites de trois espèces végétales à savoir *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* (L.) O.K, et *Juniperus thurifera* L. var. *aurasiaca*

L'analyse de la composition chimique des essences extraites déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a révélé que les huiles étudiées sont constituées principalement de monoterpènes et de sesquiterpènes. L'HE de *S. africana* est dominée par le  $\beta$ -pinène, le germacrène-D, le 1,8-cinéole et le sabinène. Les principaux constituants de l'HE de *H. cheirifolia* sont l' $\alpha$ -pinène, le Germacrene D et le Derminen, alors que l'HE de *J. thurifera* comprend comme constituants majeurs le m-mentha-6,8-diène, le  $\beta$ -pinène, l'élémol et le terpinène-4-ol.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disques. Les résultats obtenus ont montré une grande sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis des trois HEs testées. Une bonne activité a été également enregistrée à l'égard d'*E. coli* mais à moindre degré. Quant à *B. subtilis* et *P. aeruginosa*, elles se sont révélées modérément sensibles à l'action de l'huile de *S. africana* et résistantes aux huiles de *H. cheirifolia* et *J. thurifera*.

L'effet inhibiteur le plus prononcé a été exercé par l'huile de *S. africana*, qui a produit les diamètres d'inhibition les plus importants. De plus, cette essence a montré une activité inhibitrice à l'égard de *P. aeruginosa* caractérisée par sa résistance aux huiles essentielles.

Nous nous sommes également intéressés à tester l'activité antibactérienne des HEs étudiées associées aux antibiotiques. Les combinaisons HEs/gentamicine ont produit un effet synergique. D'autre part, leur association avec la céfazoline et l'amoxicilline a donné

des effets additifs et/ou antagonistes. Ceci laisse supposer que les huiles testées agissent sur les mêmes cibles que la céfazoline et l'amoxicilline et différentes de celles de la gentamicine. Il a été démontré que les huiles exercent leur effet au niveau de la paroi bactérienne en augmentant la perméabilité de la membrane permettant ainsi la pénétration de la gentamicine qui agit à l'intérieur de la cellule bactérienne. Ces résultats révèlent que les huiles essentielles pourraient jouer un rôle de synergie avec les antibiotiques pour augmenter leur efficacité et pallier au problème de la résistance bactérienne.

Dans le but de rechercher les constituants des HEs doués de potentiel inhibiteur et de comprendre leur mode d'interaction, nous avons entrepris une étude *in silico* de leurs constituants vis-à-vis de quatre cibles des antibiotiques  $\beta$ -lactames. Les composés oxygénés ont montré plus d'affinité pour les protéines testées traduisant un fort potentiel inhibiteur. La stabilité des complexes formés est assurée principalement par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobiques. Parmi ces composés les constituants de l'HE de *S. africana* sont majoritaires: l' $\alpha$ -Bisabolol, le camphor, le spathulenol, l'eudesm-7(11)-en-4-ol et le 1,8-cineole. Ces résultats confirment ceux de l'étude *in vitro* qui ont montré que l'HE de *S. africana* est douée d'un fort potentiel antibactérien. Ce potentiel est donc lié à la richesse de l'HE en composés oxygénés.

L'activité antioxydant des huiles essentielles de *S. africana*, *H. cheirifolia* et *J. thurifera* a été également évaluée en testant leur capacité de piégeage du radical libre DPPH et leur pouvoir réducteur du fer (FRAP). Des potentiels antioxydants intéressants ont été mis en évidence. Les résultats des deux tests ont montré que l'huile de *H. cheirifolia* est la plus active. Cette capacité antioxydante est attribuée à la richesse de cette huile en sesquiterpènes lactones dont le pouvoir antioxydant a été rapporté dans la littérature.

Enfin, l'évaluation de l'effet inhibiteur de la germination et de la croissance des trois huiles a permis de mettre en valeur des propriétés phytotoxiques très intéressantes vis-à-vis de l'espèce *Triticum durum* et à moindre degré *Lactuca sativa*. L'effet le plus prononcé a été exercé par l'huile de *S. africana*. Cette activité semble être due à la fraction oxygénée bien représentée dans le profil chimique de cette huile, en plus de ses composés majoritaires doués de potentiel phytotoxique déjà connu dont le  $\beta$ -pinène, le germacrène-D, le 1,8-cinéole et le camphor. Ces résultats sont prometteurs pour le développement de nouveaux herbicides à base de produits naturels.

Enfin, ces résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine de la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- L'évaluation des activités biologiques et la toxicité de ces huiles essentielles sur des modèles animaux (*in vivo*) afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales.
- Etude de l'efficacité de ces HEs dans le domaine alimentaire afin d'établir leur utilité comme agents antioxydants naturels dans la sécurité alimentaire.
- Il serait judicieux de tester l'effet de ces huiles essentielles sur des mauvaises herbes problématiques de nos cultures.
- Il serait également intéressant d'appliquer le criblage par docking moléculaire sur des banques de molécules disponibles afin de découvrir des molécules potentiellement intéressantes dans le processus de l'inhibition des protéines cibles des antibiotiques, des antioxydants et des pesticides.

---

*Références  
Bibliographiques*

---

## Références bibliographiques

- Abraham, D., Braguini, W. L., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2000).** Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of chemical ecology*, 26(3), 611-624.
- Abraham, D., Takahashi, L., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2003).** Effects of phenolic acids and monoterpenes on the mitochondrial respiration of soybean hypocotyl axes. *Allelopathy Journal*, 11(1), 21-30.
- Achak, N., Romane, A., Alifriqui, M., & Adams, R. P. (2008).** Effect of the Leaf Drying and Geographic Sources on the Essential Oil Composition of *Juniperus thurifera* L. var. *africana* Maire from the Tensift—Al Haouz, Marrakech Region. *Journal of Essential Oil Research*, 20(3), 200-204.
- Achak, N., Romane, A., Alifriqui, M., & Adams, R. P. (2009).** Chemical studies of leaf essential oils of three species of *Juniperus* from Tensift Al Haouz-Marrakech Region (Morocco). *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 337-341.
- Adams, R. P. (1998).** The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochemical Systematics and ecology*, 26(6), 637-645.
- Adams, R. P. (1999).** Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(7), 709-725.
- Adams, R. P., Mumba, L. E., James, S. A., Pandey, R. N., Gauquelin, T., & Badri, W. (2003).** Geographic variation in the leaf oils and DNA fingerprints (RAPDs) of *Juniperus thurifera* L. from Morocco and Europe. *Journal of Essential Oil Research*, 15(3), 148-154.
- Adams, R. P., Bartel, J. A., & Price, R. A. (2009).** A new genus, *Hesperocypris*, for the cypresses of the Western Hemisphere (Cupressaceae). *Phytologia*, 91(1), 160-185.
- Adams, R. P. (2014).** *Junipers of the world: the genus Juniperus*. Trafford Publishing.

- Afoulous, S., Ferhout, H., Raelison, E. G., Valentin, A., Moukarzel, B., Couderc, F., & Bouajila, J. (2013).** Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. *Food and chemical toxicology*, 56, 352-362.
- Akhgar, M. R., Shariatifar, M., Akhgar, A. R., Moradalizadeh, M., & Faghihi-Zarandi, A. (2012).** Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil from *Hertia intermedia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(2), 329-331.
- Ali, A. M., & Jumma, H. J. A. (2019).** Yield, Quality and Composition of Cumin Essential Oil as affected by storage Period. *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, 7(1), 9-17.
- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., & Kisinza, W. (2018).** Effect of geographical location on yield and chemical composition of essential oils from three *Eucalyptus* species growing in Tanzania, 14(1), 1-12.
- Ammar, S., Edziri, H., Mahjoub, M. A., Chatter, R., Bouraoui, A., & Mighri, Z. (2009).** spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, 16(12), 1156-1161.
- Amoah, S. K., Dalla Vecchia, M. T., Pedrini, B., Carnhelutti, G. L., Gonçalves, A. E., dos Santos, D. A., ... & de Souza, M. M. (2015).** Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 $\beta$ , 10 $\alpha$ -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *European journal of pharmacology*, 769, 195-202.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013).** Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847.
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., & Jamoussi, B. (2013).** Reviews on phytotoxic effects of essential oils and their individual components: news approach for weeds management. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 4(1), 96-114.
- Andrade, L. N., Dos Reis Barreto de Oliveira, R., & De Sousa, D. P. (2014).** A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules*, 19(2), 1459-1480.

- Angelini, L. G., Carpanese, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Macchia, M., & Flamini, G. (2003).** Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6158-6164.
- APG II (2003).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141(4): 399-436.
- Arneth, A., Schurgers, G., Hickler, T., & Miller, P. A. (2007).** Effects of species composition, land surface cover, CO<sub>2</sub> concentration and climate on isoprene emissions from European forests. *Plant Biology*, 9(S 01), e87-e98.
- Asili, J., Emami, S. A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S., & Hassanzadeh, M. K. (2008).** Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* and *Juniperus excelsa* subsp. *polycarpus* essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(3), 292-302.
- Asili, J., Emami, S. A., Rahimizadeh, M., Fazly-Bazzaz, B. S., & Hassanzadeh, M. K. (2010).** Chemical and antimicrobial studies of *Juniperus sabina* L. and *Juniperus foetidissima* Willd. essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(1), 25-36.
- Attia, S., Grissa, K. L., Ghrabi, Z. G., Maillieux, A. C., Lognay, G., & Hance, T. (2012b).** Acaricidal activity of 31 essential oils extracted from plants collected in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 24(3), 279-288.
- Attia, S., Grissa, K. L., Maillieux, A. C., Heuskin, S., Lognay, G., & Hance, T. (2012a).** Acaricidal activities of *Santolina africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Pest management science*, 68(7), 1069-1076.
- Azhdarzadeh, F., & Hojjati, M. (2016).** Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43-50.
- Badawy, E. S. M., Khalid, K. A., Heikal, A. A. E. M., & Nagdy, M. M. (2018).** Effect of Salinity Stress and Soil Types on Growth, Photosynthetic Pigments and Essential Oil of *Artemisia annua* L. *Asian Journal of Crop Science*, 10(1), 40-47.

- Bahri, F., Harrak, R., Achak, N., & Romane, A. (2013).** Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from *Juniperus thurifera* L. var. *africana*. *Natural product research*, 27(19), 1789-1794.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., & Viuda-Martos, M. (2017).** Assessment of Antioxidant and antibacterial properties on meat homogenates of essential oils obtained from four *Thymus* species achieved from organic growth. *Foods*, 6(8), 59.
- Barbosa, L. C. A., Demuner, A. J., Clemente, A. D., Paula, V. F. D., & Ismail, F. (2007).** Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova*, 30(8), 1959-1965.
- Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A., & Flamini, G. (2018).** Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L.(Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 201.
- Barrero, A. F., del Moral, J. F. Q., Lara, A., & Herrador, M. M. (2005).** Antimicrobial activity of sesquiterpenes from the essential oil of *Juniperus thurifera* wood. *Planta medica*, 71(01), 67-71.
- Barreto, H. M., Silva Filho, E. C., Lima, E. D. O., Coutinho, H. D., Morais-Braga, M. F., Tavares, C. C., ... & Oliveira, R. W. G. (2014).** Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59, 290-294.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2015).** *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- Basri, D. F., Xian, L. W., Abdul Shukor, N. I., & Latip, J. (2014).** Bacteriostatic antimicrobial combination: antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 8p.

- Batson, S., de Chiara, C., Majce, V., Lloyd, A. J., Gobec, S., Rea, D., ... & Fishwick, C. W. (2017).** Inhibition of D-Ala: D-Ala ligase through a phosphorylated form of the antibiotic D-cycloserine. *Nature communications*, 8(1), 1939.
- Beghami, Y. (2013).** Ecologie et dynamique de la végétation de l'Aurès: Analyse spatiotemporelle et étude de la flore forestière et montagnard. Thèse Doc., Univ. Biskra. 255P.
- Bellili, S., Aouadhi, C., Dhifi, W., Ghazghazi, H., Jlassi, C., Sadaka, C., ... & Mnif, W. (2018).** The Influence of Organs on Biochemical Properties of Tunisian *Thuja occidentalis* Essential Oils. *Symmetry*, 10(11), 649.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... & Bourne, P. E. (2000).** The protein data bank. *Nucleic Acids Res*, 28, 235-242.
- Bertaudière, V. (1999).** Dendroécologie du genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans la haute montagne méditerranéenne (Haut Atlas, Maroc) et dans une station xérothermique des Pyrénées centrales (France). Thèse Doc., Univ. Paul Sabatier, Toulouse. 234 p.
- Bich, T. T. N., & Kato-Noguchi, H. (2012).** Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species. *Aquatic botany*, 103, 30-36.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Biswal, A. R., Mirunalini, K., Jayshree, P., & Pazhamalai, V. (2019).** Molecular Docking Analysis of Bioactive Compounds of *Acacia Concinna* against Fungal Protein. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(4), 1216-1222.
- Boerlin, P., & White, D. G. (2013).** Antimicrobial resistance and its epidemiology. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 4, 27-43.
- Borel, A., & Polidori, J. L. (1983).** Le Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans le Parc National du Mercantour (Alpes-Maritimes). *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 130(3), 227-242.

- Boullard, B. (2001).** Plantes médicinales du monde: réalités & croyances. Paris, ESTEM, 636P.
- Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Calvo, J., & Martinez-Martinez, L. (2009).** Antimicrobial mechanisms of action. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
- Cantón, R., & Morosini, M. I. (2011).** Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 977-991.
- 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Gonçalves, M. J., & Salgueiro, L. (2006).** Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1333-1338.
- Cha, J. D., Jeong, M. R., Jeong, S. I., Moon, S. E., Kil, B. S., Yun, S. I., ... & Song, Y. H. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytotherapy research*, 21(3), 295-299.
- Chambers, H. F., & De Leo, F. R. (2009).** Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641.
- Chibani, S., Amira, L., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Aburjai, T., & Kabouche, Z. (2013).** Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L.(Asteraceae) from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5(2), 238-241.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017).** Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.

- Cox, S. D., Mann, C. M., & Markham, J. L. (2001).** Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 492-497.
- Da Silva, J. A. T. (2004).** Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of biotechnology*, 3(12), 706-720.
- De Almeida, L. F. R., Frei, F., Mancini, E., De Martino, L., & De Feo, V. (2010).** Phytotoxic activities of Mediterranean essential oils. *Molecules*, 15(6), 4309-4323.
- De Feo, V., De Simone, F., & Senatore, F. (2002).** Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61(5), 573-578.
- De Martino, L., Roscigno, G., Mancini, E., De Falco, E., & De Feo, V. (2010).** Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. *Molecules*, 15(2), 735-746.
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 149, No. 1, pp. 1-9). *Annales Medecine Veterinaire*.
- De Pascual-T, J., Vicente, S., Gonzalez, M. S., & Bellido, I. S. (1983).** Nerolidol-5, 8-oxides from the essential oil of *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry*, 22(10), 2235-2238.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101-109.
- Derbesy, M., Touche, J., & Zola, A. (1989).** The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 1(6), 269-275.
- Derouiche, K., Zellagui, A., Gherraf, N., Boussetla, A., Dehimat, L., & Rhouati, S. (2013).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Santolina africana* flowers, endemic in Algeria. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2(3).

- Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009).** Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.
- Desjobert, J. M., Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., & Bernardini, A. F. (1997).** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analisis*, 6(25), M13-M16.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007).** Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Dias, C., Aires, A., N Bennett, R., AS Rosa, E., & J Saavedra, M. (2012).** First study on antimicrobial activity and synergy between isothiocyanates and antibiotics against selected gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria from clinical and animal source. *Medicinal chemistry*, 8(3), 474-480.
- Djeddi, S., Djebile, K., Hadjbourega, G., Achour, Z., Argyropoulou, C., & Skaltsa, H. (2012).** In vitro antimicrobial properties and chemical composition of *Santolina chamaecyparissus* essential oil from Algeria. *Natural product communications*, 7(7), 937-940.
- Djilani, A., & Dicko, A. (2012).** The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179.
- Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Benseradj, F., Aberrane, S., Aitmousa, S., ... & Baaliouamer, A. (2014).** In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Industrial Crops and Products*, 56, 60-66.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., & Dasgupta, D. (2007).** Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical pharmacology*, 74(6), 831-840.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.

- Doshi, P., Adsule, P., Banerjee, K., & Oulkar, D. (2015).** Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. *Journal of food science and technology*, 52(1), 181-190.
- Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007).** *Botanique: systématique moléculaire*. Elsevier Health Sciences.
- Edris, A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 308-323.
- El-Alam, I., Zgheib, R., Iriti, M., El Beyrouthy, M., Hattouny, P., Verdin, A., ... & Makhoul, H. (2019).** *Origanum syriacum* Essential Oil Chemical Polymorphism According to Soil Type. *Foods*, 8(3), 90.
- Elansary, H. O., Salem, M. Z., Ashmawy, N. A., & Yacout, M. M. (2012).** Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. *Journal of Agricultural science*, 4(10), 144.
- El-Shora, H. M., & Abd El-Gawad, A. M. (2014).** Evaluation of allelopathic potential of *Rumex dentatus* root extract and allelochemicals on *Cicer arietinum*. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(1), 167-180.
- Emami, S. A., Abedindo, B. F., & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2011).** Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpus* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 799.
- Ens, E. J., Bremner, J. B., French, K., & Korth, J. (2009).** Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, bitou bush (*Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*), and their inhibition of native seedling growth. *Biological invasions*, 11(2), 275-287.
- Erdemli, S. B., Gupta, R., Bishai, W. R., Lamichhane, G., Amzel, L. M., & Bianchet, M. A. (2012).** Targeting the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: structure and mechanism of L, D-transpeptidase 2. *Structure*, 20(12), 2103-2115.

- Farjon, A. (2010).** A Handbook of the World's Conifers (2 vols.) (Vol. 1). Brill.
- Fatnassi, S.K. B. H., Hassayoun, F., Cheraif, I., Khan, S., Jannet, H. B., Hammami, M., ... & Harzallah-Skhiri, F. (2017).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. Saudi journal of biological sciences, 24(4), 875-882.
- Fdil, R., Lmachraa, I., Naima, F. D. I. L., Ezoubeiri, A., & Gadhi, C. A. (2011).** Huile essentielle des parties aériennes de *Santolina africana*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 150(1-4), 47-60.
- Fitter, A. (2003).** Making allelopathy respectable. Science, 301(5638), 1337-1338.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Narbad, A. (2004).** Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. Journal of applied microbiology, 97(1), 104-113.
- Flamini, G., Bertoli, A., Taglioli, V., Cioni, P. L., Morelli, I., & Spinelli, G. (1999).** Composition of the essential oil of *Santolina ligustica*. Journal of Essential Oil Research, 11(1), 6-8.
- Gallet, C., & Pellissier, F. (2002).** Interactions allélopathiques en milieu forestier. Revue forestière française, 54(6), 567-576.
- Gauquelin, T., Bertaudière, V., Cambecedes, J., & Largier, G. (2003).** Le genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans les Pyrénées: état de conservation et perspectives. Acta Bot Barc, 49, 83-94.
- Gibbons, S. (2008).** Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. Planta medica, 74(06), 594-602.
- Giner, R., Ríos, J. L., & Villar, A. (1986).** Pharmacological study of *Santolina chamaecyparissus*. I. Acute toxicity, antiinflammatory and antiulcer activity. Planta medica, 52(06), 540-541.
- Godzaridis, É. (2012).** Modélisation bio-informatique du mécanisme d'action d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Mém grade de Maître en sciences (M.Sc.). Université Laval. 84p.

- Goffin, C., & Ghuysen, J. M. (1998).** Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4), 1079-1093.
- Graña, E., Sotelo, T., Díaz-Tielas, C., Araniti, F., Krasuska, U., Bogatek, R., ... & Sánchez-Moreiras, A. M. (2013).** Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of chemical ecology*, 39(2), 271-282.
- Grosso, C., Figueiredo, A. C., Burillo, J., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., ... & Palavra, A. M. (2009).** Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus*. *Journal of separation science*, 32(18), 3215-3222.
- Guardabassi, L., & Courvalin, P. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 1-18). American Society of Microbiology.
- Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S. L., & Kaushik, D. (2010).** Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*; 2(1), 12-16.
- Guschin, A., Ryzhikh, P., Rummyantseva, T., Gomberg, M., & Unemo, M. (2015).** Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with josamycin. *BMC infectious diseases*, 15(1), 40.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., & Usman, L. A. (2011).** Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *Int J Cur Res*, 33(2), 86-98.
- Hernandez, GE., Martinez, LM., & Villanova, R. G. (1987).** Determination by gas chromatography of terpenes in the berries of the species *Juniperus oxycedrus* L., *J. thurifera* L. and *J. sabina* L. *Journal of chromatography*, 396, 416-420.
- Hill, T., & Lewicki, P. (2007).** *Statistics methods and applications*. statsoft, tula, USA.

- Hilmer, S. N., Tran, K., Rubie, P., Wright, J., Gnjidic, D., Mitchell, S. J., ... & Carroll, P. R. (2011).** Gentamicin pharmacokinetics in old age and frailty. *British journal of clinical pharmacology*, 71(2), 224-231.
- Holopainen, J. K. (2004).** Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in plant science*, 9(11), 529-533.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012).** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
- Ibáñez, M., & Blázquez, M. (2018).** Phytotoxicity of essential oils on selected weeds: Potential hazard on food crops. *Plants*, 7(4), 79.
- Institut National de la Recherche Forestière (INRF), 2012.** Etat des ressources génétiques forestières mondiales : Etat actuel des ressources génétiques forestières en Algérie. Disponible sur : <http://www.fao.org/documents>.
- Iserin, P. (2001).** Encyclopedie des plantes medicinales. Paris-France: Larousse-Bordas, 14.
- Isman, M. B. (2000).** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10), 603-608.
- Jalaei, Z., Fattahi, M., & Aramideh, S. (2015).** Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran: A new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Industrial Crops and Products*, 73, 109-117.
- Jassbi, A. R., Zamanizadehnajari, S., & Baldwin, I. T. (2010).** Phytotoxic volatiles in the roots and shoots of *Artemisia tridentata* as detected by headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometry analysis. *Journal of chemical ecology*, 36(12), 1398-1407.
- Job, V., Carapito, R., Vernet, T., Dessen, A., & Zapun, A. (2008).** Common alterations in PBP1a from resistant *Streptococcus pneumoniae* decrease its reactivity toward  $\beta$ -lactams structural insights. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4886-4894.
- Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.

- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., & Ilcim, A. (2001).** Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 183-186.
- Kaur, S., Singh, H. P., Mittal, S., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2010).** Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 54-61.
- Khan, Z. R., Amudavi, D. M., Midega, C. A., Wanyama, J. M., & Pickett, J. A. (2008).** Farmers' perceptions of a 'push-pull' technology for control of cereal stemborers and *Striga* weed in western Kenya. *Crop protection*, 27(6), 976-987.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., ... & Donini, O. (2000).** Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research*, 33(12), 889-897.
- Kortemme, T., Morozov, A. V., & Baker, D. (2003).** An orientation-dependent hydrogen bonding potential improves prediction of specificity and structure for proteins and protein-protein complexes. *Journal of molecular biology*, 326(4), 1239-1259.
- Kumar, P., Kaushik, A., Lloyd, E. P., Li, S. G., Mattoo, R., Ammerman, N. C., ... & Ginell, S. L. (2017).** Non-classical transpeptidases yield insight into new antibacterials. *Nature chemical biology*, 13(1), 54.
- Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14(5), 278-292.
- Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
- Legler, G., & Jülich, E. (1984).** Synthesis of 5-amino-5-deoxy-d-mannopyranose and 1, 5-di-deoxy-1, 5-imino-d-mannitol, and inhibition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -d-mannosidases. *Carbohydrate research*, 128(1), 61-72.

- Leverve, X. (2006).** Stress oxydant et régulation de la glycémie: implications pour le syndrome métabolique. *Obésité*, 1(1), 11-15.
- Li, J., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Li, Y., Shan, W., & Zheng, Y. (2011).** Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on wheat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 56-63.
- Liu, K., Rossi, P. G., Ferrari, B., Berti, L., Casanova, J., & Tomi, F. (2007).** Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry*, 68(12), 1698-1705.
- Lmachraa, I., Fdil, R., Fdil, N., & Mouzdahir, A. (2014).** Huile essentielle de *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) du Maroc: Composition chimique et isolement des deux principaux constituants. *J Mater Environ Sci*, 5(1), 67-72.
- López, M. L., Bonzani, N. E., & Zygadlo, J. A. (2008).** Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(12), 882-890.
- Lopez, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J., Caverro, R., & Calvo, M. (2008).** Screening of Spanish medicinal plants for antioxidant and antifungal activities. *Pharmaceutical Biology*, 46(9), 602-609.
- Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015).** Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Ma, J., Xing, G., Yang, W., Ma, L., Gao, M., Wang, Y., & Han, Y. (2012).** Inhibitory effects of leachate from *Eupatorium adenophorum* on germination and growth of *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium glaucum*. *Acta Ecologica Sinica*, 32(1), 50-56.
- Macias, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M., & Galindo, J. C. (2007).** Allelopathy—a natural alternative for weed control. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(4), 327-348.

- Mahdavia, F., & Saharkhiz, M. J. (2015).** Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha× piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 146-153.
- Majouli, K., Besbes Hlila, M., Flamini, G., Ben Jannet, H., & Kenani, A. (2016a).** In vitro antibacterial activity of the *Hertia cheirifolia* L. essential oils. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(11), 865-7.
- Majouli, K., Hlila, M. B., Hamdi, A., Flamini, G., Jannet, H. B., & Kenani, A. (2016b).** Antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). *Industrial crops and products*, 82, 23-28.
- Majouli, k., and Kenani, A. (2017).** Bioactivity of essential oil from *Hertia cheirifolia* L. flowers in the control of bacteria. *Trends Phytochem. Res.* 1(1) 23-26.
- Maire, R. (1952-1987).** Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara).
- Mambri, A. P., Andriolo, J. L., Manfron, M. P., Pinheiro, S. M., Cardoso, F. L., & Neves, M. G. (2018).** Yield and composition of lavender essential oil grown in substrate. *Horticultura Brasileira*, 36(2), 259-264.
- Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., & Farah, A. (2010).** Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*, 8(3), 166-170.
- Mao, K., Hao, G., Liu, J., Adams, R. P., & Milne, R. I. (2010).** Diversification and biogeography of *Juniperus* (Cupressaceae): variable diversification rates and multiple intercontinental dispersals. *New Phytologist*, 188(1), 254-272.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Sanna, G., Murreddu, M., & Loddo, R. (2006).** Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. nana Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 148-154.
- Martino, L. D., Mancini, E., Almeida, L. F. R. D., & Feo, V. D. (2010).** The antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. *Molecules*, 15(9), 6630-6637.

- Massiot, G., Nuzillard, J. M., Le Men-Olivier, L., Aclinou, P., Benkouider, A., & Khelifa, A. (1990).** Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, 29(7), 2207-2210.
- 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. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 167-173.
- Médail, F., & Quezel, P. (1999).** Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: setting global conservation priorities. *Conservation biology*, 13(6), 1510-1513.
- Miara, M. D., Hammou, M. A., & Rebbas, K. (2018).** Flore endémique, rare et menacées de l'Atlas Tellien Occidental de Tiaret (Algérie). *Acta Botanica Malacitana*, 42(2), 269-283.
- Milos, M., & Radonic, A. (2000).** Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food chemistry*, 68(3), 333-338.
- MOE (The Molecular Operating Environment).** software available from Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke Street West, Suite 910, Montreal, Canada H3A 2R7. <http://www.chemcomp.com>.
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017).** Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft chemistry and food fermentation* (pp. 379-419). Academic Press.
- Moisa, C., Lupitu, A., Pop, G., Chambre, D. R., Copolovici, L., Cioca, G., ... & Copolovici, D. M. (2019).** Variation of the Chemical Composition of *Thymus Vulgaris* Essential Oils by Phenological Stages. *REVISTA DE CHIMIE*, 70(2), 633-637.
- Montès, N. (1999).** Potentialités, dynamique et gestion d'une formation arborée à Genévrier Thurifère (*Juniperus Thurifera* L.) des Atlas marocains: le cas de la vallée de l'Azzaden (Doctoral dissertation). Thèse, Doc., Univ. Paul Sabatier, Toulouse. 203 p.

- Mourey, A., & Canillac, N. (2002).** Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13(4-5), 289-292.
- Moussaoui, F., & Alaoui, T. (2016).** Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 32-37.
- Mubita, C., Syakalima, M., Chisenga, C., Munyeme, M., Bwalya, M., Chifumpa, G., ... & Isogai, H. (2008).** Antibigrams of faecal *Escherichia coli* and *Enterococci* species isolated from pastoralist cattle in the interface areas of the Kafue basin in Zambia. *Veterinarski arhiv*, 78(2), 179.
- Mutlu, S., Atici, Ö., Esim, N., & Mete, E. (2011).** Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 943-951.
- Muylaert, A., & Mainil, J. (2013).** Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité". In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 156, pp. 109-123). Université de Liège.
- Nagalakshmi, M. A. H., Thangadurai, D., Anuradha, T., & Pullaiah, T. (2001).** Essential oil constituents of *Melia dubia*, a wild relative of *Azadirachta indica* growing in the Eastern Ghats of Peninsular India. *Flavour and fragrance journal*, 16(4), 241-244.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013).** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Neuhaus, F. C. (1962).** Enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. 2. Kinetic studies on D-alanyl-D-alanine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 3128-3125.
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C., & Sakai, A. (2005).** Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31(5), 1187-1203.
- Nouasri, A., Dob, T., Krimats, S., Dahmane, D., Toumi, M., Lynda, L., ... & Rachehe, F. (2015).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the

essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. of Algeria. J. Coast. Life Med, 3, 220-227.

**Ormeno, E., Fernandez, C., & Mévy, J. P. (2007).** Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*, 68(6), 840-852.

**Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessennd, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008).** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.

**Oussou, K. R. (2009).** Étude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

**Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Ramos-Vázquez, P., Gómez-Contreras, F., & Sanz, J. (1999).** Essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*: first isolation of capillene, a diacetylene derivative. *Flavour and fragrance journal*, 14(2), 131-134.

**Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúl, R., Sanz, J., & Conejero, F. (2001).** Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical systematics and ecology*, 29(7), 663-672.

**Patel, R., Dodia, M., & Singh, S. P. (2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3569-3575.

**Paul, S. (2017).** Morphological and Anatomical Features among the Two Cypselae of the Family Compositae. *Journal of Plant Sciences and Agricultural Research*, 1(2), 1-4.

**Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L. (2007).** Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 6(1), 29.

- Penuelas, J., Llusia, J., & Estiarte, M. (1995).** Terpenoids: a plant language. *Trends in ecology & evolution*, 10(7), 289.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. & Defraigne J. O. 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.
- Pokorný, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (Eds.). (2001).** Antioxidants in food: practical applications. Elsevier. Woodhead: Cambridge, UK, 22.
- Poli, F., Bonsignore, L., Loy, G., Sacchetti, G., & Ballero, M. (1997).** Comparison between the essential oils of *Santolina insularis* (Genn. ex Fiori) Arrigoni and *Santolina corsica* Jord. et Fourr. from the island of Sardinia (Italy). *Journal of ethnopharmacology*, 56(3), 201-208.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- Pottier-Alapetite, G. (1979-1981):** Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones: apétales - dialypétales - gamopétales. Première et deuxième partie. - Ouvrage publié par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture. Tunisie, 1190 p.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions CNRS: Paris.
- Rahali, N., Mehdi, S., Younsi, F., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2017).** Antioxydant,  $\alpha$ -amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation. *International journal of food properties*, 20(sup2), 1637-1651.
- Ramdani, M., Lograda, T., Silini, H., Zeraib, A., Chalard, P., Figueredo, G., Bouchaala M., Zerrar, S. (2013).** Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(11), 22.
- Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008).** Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne (Vol. 3). Forêt privée française.

- Ravula, G., Goluguri, S. R., & Konanki, K. (2012).** Evaluation of antibacterial effect of *Vernonia anthelmintica* seed extract and its synergistic effect with antibiotics on resistant bacterial strains. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 4(3), 79-81.
- Rester, U. (2006).** Dock around the clock—current status of small molecule docking and scoring. *QSAR & Combinatorial Science*, 25(7), 605-615.
- Rguez, S., Msaada, K., Daami-Remadi, M., Chayeb, I., Bettaieb Rebey, I., Hammami, M., ... & Hamrouni-Sellami, I. (2019).** Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(2), 264-272.
- Rodrigues, F. F., Costa, J. G., & Coutinho, H. D. (2009).** Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16(11), 1052-1055.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007).** Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727-732.
- Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., & Vitali, C. (2010).** In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current medicinal chemistry*, 17(28), 3289-3295.
- Saharkhiz, M. J., Smaeili, S., & Merikhi, M. (2010).** Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. growing in Iran. *Natural Product Research*, 24(17), 1598-1609.
- Saharkhiz, M. J., Zadnour, P., & Kakouei, F. (2016).** Essential oil analysis and phytotoxic activity of catnip (*Nepeta cataria* L.). *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(1), 40-45.
- Salamci, E., Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., & Kaya, Y. (2007).** Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(9), 569-581.

- Satrani, B., Ghanmi, M., Mansouri, N., & Amusant, N. (2015).** Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of moroccan junipers. *Environmental Science: An Indian Journal*, 2015, 11 (7), 239-247.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008).** The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 234-258.
- Schnitzler, J. P., Louis, S., Behnke, K., & Loivamäki, M. (2010).** Poplar volatiles—biosynthesis, regulation and (eco) physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. *Plant Biology*, 12(2), 302-316.
- Scrivanti, L. R. (2010).** Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(5), 302-305.
- Segueni, N., Zellagui, A., Boulechfar, S., Derouiche, K., & Rhouati, S. (2017).** Essential oil of *Hertia cheirifolia* leaves: chemical composition, antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(2), 551-556.
- Shahbazi, Y. (2016).** Variation in chemical composition of essential oil of *Ferulago angulata* collected from west parts of Iran. *Pharmaceut Sci*, 22(1), 16-21.
- Shaw, J. P., Petsko, G. A., & Ringe, D. (1997).** Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, 36(6), 1329-1342.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Cieciewicz, J., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2011).** Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Medicinal Chemistry*, 7(6), 674-689.
- Simic, N., Palic, R., Vajs, V., Milosavljevic, S., & Djokovic, D. (2002).** Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 14(1), 76-78.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, S., Arora, K., & Kohli, R. K. (2006).**  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, 98(6), 1261-1269.

- Singh, D., Bhardwaj, S. V., Kumar, A., Kaushik, V., Mahajan, S., & Satija, S. (2018).** Antimicrobial Activity and Molecular Docking Studies of a Sesquiterpenoid Alcohol from Leaf Solvent Extracts of *Juniperus communis* L. International Journal of Green Pharmacy. LPU Conference Apr-Jun 2018. 22-28.
- Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biology and Medicine, 33(5), 575-586.
- Sova, M., Čadež, G., Turk, S., Majce, V., Polanc, S., Batson, S., Lloyd, A. J., Roper, I. D., Fishwick, W. G. C., & Gobec, S. (2009).** Design and synthesis of new hydroxyethylamines as inhibitors of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA) and D-alanyl-D-alanine ligase (DdlB). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19, 1376–1379.
- Sripathi, R., & Ravi, S. (2017).** Molecular Docking Studies of the Constituents Present in the Essential Oil of *Plectranthus hadiensis* against Bacterial Proteins. Int. J. Chem. Sci, 15, 185.
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013).** Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. Food control, 34(2), 539-546.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006).** Secondary metabolites and plant defense. Plant physiology, 4, 315-344.
- Tenover, F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine, 119(6), S3-S10.
- Terrab, A., Schönswetter, P., Talavera, S., Vela, E., & Stuessy, T. F. (2008).** Range-wide phylogeography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. Molecular Phylogenetics and Evolution, 48(1), 94-102.
- Tran, T. H., Ha, L. K., Nguyen, D. C., Dao, T. P., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., ... & Bach, L. G. (2019).** The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam. Processes, 7(2), 56.

- Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G., Menichini, F., & Loizzo, M. R. (2013).** Antioxidant and hypoglycaemic activities and their relationship to phytochemicals in *Capsicum annuum* cultivars during fruit development. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 370-377.
- Tworokski, T. (2002).** Herbicide effects of essential oils. *Weed science*, 50(4), 425-431.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van Vuuren, D. P., Edmonds, J., Kainuma, M., Riahi, K., Thomson, A., Hibbard, K., ... & Masui, T. (2011).** The representative concentration pathways: an overview. *Climatic change*, 109(1-2), 5.
- Vela, E., & Benhouhou, S. (2005).** Enjeux de conservation de la flore méditerranéenne en Algérie. In International Symposium "Mediterranean plant conservation in a changing world". Hyères (France) (Vol. 29).
- Vela, E., & Schäfer, P. A. (2013).** Typification de *Juniperus thurifera* var. *africana* Maire, délimitation taxonomique et conséquences nomenclaturales sur le Genévrier thurifère d'Algérie. *Ecologia Mediterranea*, 39(1), 69-80.
- Verdeguer, M., Blázquez, M. A., & Boira, H. (2009).** Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 362-369.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015).** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Vieth, M., Hirst, J. D., Kolinski, A., & Brooks III, C. L. (1998).** Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1612-1622.

- Vuerich, M., Ferfuia, C., Zuliani, F., Piani, B., Sepulcri, A., & Baldini, M. (2019).** Yield and Quality of Essential Oils in Hemp Varieties in Different Environments. *Agronomy*, 9(7), 356.
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2008).** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food chemistry*, 108(3), 1019-1022.
- Watson, A. A., Fleet, G. W., Asano, N., Molyneux, R. J., & Nash, R. J. (2001).** Polyhydroxylated alkaloids—natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*, 56(3), 265-295.
- Weidenhamer, J. D., & Callaway, R. M. (2010).** Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. *Journal of chemical ecology*, 36(1), 59-69.
- Wodak, S. J., & Janin, J. (1978).** Computer analysis of protein-protein interaction. *Journal of molecular biology*, 124(2), 323-342.
- Wu, Q. F., Wang, W., Dai, X. Y., Wang, Z. Y., Shen, Z. H., Ying, H. Z., & Yu, C. H. (2012).** Chemical compositions and anti-influenza activities of essential oils from *Mosla dianthera*. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 668-671.
- Wyse, S. V., & Burns, B. R. (2013).** Effects of *Agathis australis* (New Zealand kauri) leaf litter on germination and seedling growth differs among plant species. *New Zealand Journal of Ecology*, 37(2), 178.
- Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., & Guolin, Z. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100(4), 1312-1315.
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. (2012).** Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide biochemistry and physiology*, 103(1), 74-80.

- Yagupsky, P. (2006).** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *The Pediatric infectious disease journal*, 25(10), 974-976.
- Yahi, N., & Benhouhou, S. (2011).** Country reports and case studies (Algeria) in: Important Plant Areas of the south and east Mediterranean region. Priority sites for conservation, Editors: EA Radford, G. Catullo and B. de Montmollin, UICN, Switzerland and Spain, 107.
- Yahi, N., Vela, E., Benhouhou, S., De Belair, G., & Gharzouli, R. (2012).** Identifying important plants areas (key biodiversity areas for plants) in northern Algeria. *Journal of threatened taxa*, 2753-2765.
- Younis, A., Khan, M. A., Khan, A. A., Riaz, A., & Pervez, M. A. (2007).** Effect of different extraction methods on yield and quality of essential oil from four *Rosa* species. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(1), 73-76.
- Yuan, Y., Huang, M., Pang, Y. X., Yu, F. L., Chen, C., Liu, L. W., ... & Hu, X. (2016).** Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, 21(8), 1024.
- Zaiter, L., Benayache, F., Beghidja, N., Figueredo, G., Chalard, P., Chalchat, J. C., ... & Benayache, S. (2015).** Essential oils of *Santolina africana* Jord. & Fourr. and *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1338-1342.
- Zellagui, A., Gherraf, N., & Lahouel, M. (2012).** Drimenin-rich essential oils from *Hertia cheirifolia* growing in Algeria. *Journal of New Technology and Materials*, 2(01), 38-40.
- Zeraib, A., Ramdani, M., Boudjedjou, L., Chalard, P., & Figueredo, G. (2014a).** Characterization and chemosystematics of Algerian thuriferous juniper (*Juniperus thurifera* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.
- Zeraib, A., Ramdani, M., Boudjedjou, L., Chalard, P., & Figueredo, G. (2014b).** Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 3(2).

- Zeraib A., (2016).** Etude phytochimique et chimiosystématique de *Juniperus thurifera* en Algérie. Thèse de Doctorat en Sc. Université Ferhat Abbès, Sétif 1. 144 p.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., & Ayadi, M. A. (2011).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.(Lamiaceae). Food and Bioproducts Processing, 89(4), 257-265.
- Zsoldos, Z., Reid, D., Simon, A., Sadjad, B. S., & Peter Johnson, A. (2006).** eHiTS: an innovative approach to the docking and scoring function problems. Current Protein and Peptide Science, 7(5), 421-435.

---

# *Annexes*

---

**Annexe 1.** Identifiants des constituants des huiles essentielles téléchargés à partir de la base des données PubChem.

<b>code PubChem</b>	<b>composants</b>	<b>code PubChem</b>	<b>composants</b>
CID-519872	Santolina Triene	CID-6431187	2R,4R-p-Mentha-1(7),8-diene-2-hydroperoxide
CID-17868	$\alpha$ -thujene	CID-5363426	Nerolidylacetate
CID-6654	$\alpha$ -pinene	CID-6918391	$\beta$ -Elemene
CID-6616	camphene	CID-5281515	$\beta$ -Caryophyllene
CID-6427476	verbenene	CID-6508206	$\alpha$ -humulene
CID-18818	sabinene	CID-519960	Cyclosativene
CID-14896	$\beta$ -Pinene	CID-6431897	Eremophila-1(10),11-diene
CID-46782411	$\beta$ -Myrcene	CID-5281519	Germacrene B
CID-7462	$\alpha$ -Terpinen	CID-520826	Guaia-10(14),11-diene
CID-10703	<i>o</i> -Cymene	CID-441005	$\delta$ -Cadinene
CID-440917	Limonene	CID-92231	Spathulenol
CID-102625	m-Mentha-6,8-diene	CID-1742210	Caryophyllene oxide
CID-2758	1,8-Cineole	CID-10398656	$\alpha$ -cadinol
CID-7461	$\gamma$ -Terpinen	CID-6428535	$\gamma$ -Himachalene
CID-101629835	cis-Sabinene hydrate	CID-608117	Anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9,10-dimethyl
CID-11463	terpinolene	CID-442202	(-)-Drimenin
CID-526657	(z)-p-menth-2-en-1-ol	CID-549159	3-Eicosyne
CID-6549	Linalool	CID-532515	Phenylthioacetic acid, 4-methoxyphenyl ester
CID-1252759	$\alpha$ -Campholenal	CID-5317844	$\alpha$ -Guaiene
CID-442463	Chrysanthenone	CID-92139	$\alpha$ -Curcumene
CID-122484	cis-p-Menth-2-en-1-ol	CID-5317570	Germacrene D
CID-6857487	cis-Limoneneoxide	CID-3314	Eugenol
CID-12315160	4(10)Thujen-3-ol	CID-12309449	$\delta$ -Elemene
CID-87839	cis-Verbenol	CID-19725	$\alpha$ -Copaene
CID-2537	Camphor	CID-6429301	(Z) Caryophyllene
CID-92784	Sabina ketone	CID-6429303	cis- $\alpha$ -Bergamotene
CID-8748	cis- $\beta$ -terpineol	CID-12313020	$\gamma$ -Muurolene
CID-64685	Borneol	CID-5352653	cis- $\alpha$ -Bisabolene
CID-11230	terpinene-4-ol	CID-6432240	Hedycaryol
CID-443162	$\alpha$ -terpineol	CID-534398	Isoaromadendrene epoxide
CID-10582	Myrtenol	CID-101716	globulol
CID-14529	p-Cymen-8-ol	CID-160799	$\alpha$ -epi-Cadinol
CID-29025	Verbenone	CID-11770062	Cubenol
CID-94221	trans-carveol	CID-91457	$\beta$ -Eudesmol
CID-15068	Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	CID-6432454	Eudesm-7(11)-en-4-ol
CID-7439	Carvone	CID-1549992	$\alpha$ -Bisabolol
CID-89488	Phellandral	CID-12306046	$\alpha$ -Amorphene

CID-61262	Myrtenylacetate	CID-92138	Elemol
CID-111037	$\alpha$ -terpinylacetate	CID-5284507	E-Nerolidol
CID-6450812	$\beta$ -Gurjunene	CID-521030	$\alpha$ -Copaen-11-ol
CID-3084331	t-Muurolol	CID-3467	Gentamicine
CID-5318734	Juniper camphor	CID-33255	Céfazoline
CID-6431124	8- $\alpha$ -Acetoxyelemol	CID-33613	Amoxicilline



Research Article

## Chemical Composition and Antibacterial Activity of Berries Essential Oil of Algerian *Juniperus thurifera* (Var. *aurasiaca*)

Lamia Boudjedjou<sup>1,2</sup>, Messaoud Ramdani<sup>1</sup>, Azzeddine Zeraib<sup>3,4\*</sup>, Tarek Benmeddour<sup>2,3</sup>, Azzeddine Fercha<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Natural Resources Valorization, Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

<sup>2</sup>Department of Life and Natural Sciences, Mohamed Khider University, 7000 Biskra, Algeria.

<sup>3</sup>Laboratory of Genetics, Biotechnology and Valorization of Bio-resources, Mohamed Khider University, 7000 Biskra, Algeria.

<sup>4</sup>Department of Biology, Abbes Laghrour University, 40000 Khenchela, Algeria.

### Article Info

#### Article History:

Received: 13 April 2018  
Revised: 25 May 2018  
Accepted: 30 May 2018  
ePublished: 23 September 2018

#### Keywords:

-Juniper  
-Essential oil  
-Antibiotics  
-Combination  
-Antibacterial activity

### ABSTRACT

**Background:** Over the past decade, most antibiotic research programs have focused on finding new compounds with antimicrobial activity. This study aims to investigate the chemical composition and antibacterial activity of the essential oil (EO) extracted from ripe berries of Algerian *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*.

**Methods:** The chemical composition of *J. thurifera* EO extracted by hydrodistillation was analyzed by using the GC-MS technique. Antibacterial activity of EO alone and in combination with three conventional antibiotics was assessed by using disc diffusion method against four bacterial strains.

**Results:** Thirty-five components were identified, representing ~87 % of the oil. The main components were m-mentha-6,8-diene (15.43 %),  $\beta$ -pinene (10.59 %), elemol (8.31 %) and terpinene-4-ol (7.44 %). The essential oil showed strong antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*, but no activity against *P. aeruginosa* and *B. subtilis*. Synergistic effects were observed because of the combined application of EO with gentamicin against all strains tested, and with amoxicillin against *B. subtilis*. Furthermore, the combination of EO/cefazolin demonstrated an additive effect against *B. subtilis*. In contrast, the combination of EO with amoxicillin and cefazoline revealed antagonistic effects against *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*.

**Conclusion:** This is the first report on the chemical composition and antibacterial activity of Algerian juniper berries' essential oil. The results indicate that the studied EO may be a promising source of antibacterial compounds that could be useful for pharmaceutical applications especially in combination with conventional antibiotics.

### Introduction

Nowadays, the rise of bacterial resistance to antibiotics has become a serious public health concern, highlighting the urgent need for new and readily available drugs for novel therapeutic options in both human and veterinary medicines.<sup>1</sup> The use of medicinal and aromatic plants as a source of antimicrobial drugs (e.g., essential oils) is appropriate because plants naturally produce a wide variety of secondary metabolites that can serve an important defensive role against bacteria, viruses, and other microbes. Therefore, the ineffectiveness of conventional therapy may be avoided by combining essential oils (EOs) with antibiotics (ABs).<sup>2</sup> In recent years, interest in the application of EOs in the treatment of infectious diseases has increased,<sup>3</sup> because they appear to exert synergistic interactions with ABs,<sup>4-8</sup> which reduces the minimum effective dose of ABs and prevents their side effects.<sup>9</sup>

*Juniperus thurifera* L. (*Cupressaceae*) is a medicinal plant used in folk medicine in Algeria and many countries

for the treatment of a variety of diseases.<sup>10,11</sup> This species is a dioecious tree or shrub endemic to the south-western Europe and Northern Africa.<sup>11,12</sup> The Algerian population of juniper (var. *aurasiaca*) is genetically closely related to the European population (subsp. *thurifera*), but is phytochemically and morphologically related to the Moroccan population (var. *africana*).<sup>10,13</sup> Although the chemical composition and biological properties of *J. thurifera* EOs are well documented,<sup>10-22</sup> the chemical composition of EO extracted from *J. thurifera* berries var. *hispanica* has been reported in only one study.<sup>14</sup> Furthermore, among the few studies that have dealt with the Algerian *J. thurifera* var. *aurasiaca*, none were conducted on berries EOs neither for their chemical composition nor their biological activities. Therefore, this study, for the first time, investigated the chemical composition and antibacterial activity of the EO extracted from berries of Algerian *J. thurifera* var. *aurasiaca*. Moreover, since the interaction of EOs with ABs is one of the new ways to overcome bacterial resistance,<sup>4-7</sup> it was

\*Corresponding Author: Zeraib Azzeddine, E-mail: azzeraib@yahoo.fr

©2018 The Authors. This is an open access article and applies the Creative Commons Attribution (CC BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

also decided to test the potential interactions between essential oil of Algerian *J. thurifera* berries and conventional antibiotics.

## Materials and Methods

### Plant material and essential oil extraction

Samples of ripe berries were collected randomly from individual trees (~ 100 m apart from each other) in late Autumn (2015) in Ain El-baidha's mountain (1500 m of altitude) province of Batna, at 35.632°N of latitude and 6.213°E of longitude. The samples were then crushed and homogenized with a mortar and pestle. The species was identified by Dr. Zeraib A. Lecturer at Abbes Laghrour University. A voucher specimen has been deposited to the Herbarium of Laboratory of Natural Resources Valorization, Setif 1 University.

The essential oil of *J. thurifera* berries (100 g) was extracted by hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus for 3 h.<sup>10</sup> The yield of EO was averaged over three experiments and calculated according to the dry weight of the plant material. The extracted oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in sealed glass vials at 4-5°C prior to analysis.

### Chemical analysis of the essential oil

Chemical analysis was carried out using a GC apparatus (Thermo) equipped with a Bruker BR5-MS column (5 % phenyl methyl siloxane, 30 m long and 0.32 mm i.d., with 0.25 µm film thickness), coupled to a mass spectrometer (MS) type DSQII (Thermo) with a detector impact of electrons 70 eV. The carrier gas was helium at a rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>; the injection volume was 0.1 µL; injector split mode 1:100. The initial temperature of the column was kept at 70 °C for 1 min, and programmed up to 300 °C at a rate of 10 °C.min<sup>-1</sup> and then kept constant at 300 °C (column cleaning step) for 5 min. The mass spectra of each compound were recorded across an m/z range of 40 to 500 m/z.

Identification of compounds was achieved by comparison of their mass spectra and retention times with those of standards (NIST 2008 v2.0/Xcalibur data system) and those in the literature.<sup>23</sup> Retention indices (RI) were calculated by estimating the retention times of the eluting peaks with those of a mixture of n-alkanes.

### Antibacterial activity

#### Antibiotics and strains

The three antibiotics, GEN: gentamicin (10µg/disc), AMX: amoxicillin (25µg/disc) and CFZ: cefazolin (30µg/disc), and the four bacterial strains, two Gram positive bacteria: [*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 21332], and two Gram negative bacteria: [*Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853], used in this experiment were obtained from Bacteriology Laboratory of Hakim Saâdan Hospital, Biskra-Algeria.

### Disc diffusion assay

The antibacterial activity of the *J. thurifera* EO alone (using several concentrations: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 and 1/16 in methanol) and in combination with antibiotics was assessed by disc diffusion method.<sup>24</sup>

The isolated colonies were picked from overnight grown cultures (18-24 h) in nutrient agar, inoculated in sterile saline solution by adjusting the turbidity to match 0.5 McFarland standards. Petri dishes (90 mm of diameter) were prepared with 20 mL of Mueller-Hinton Agar and seeded with 100 µL of the test bacteria (log phase cultures).

In the first experiment, sterile filter paper discs (6 mm in diameter) soaked with 10 µL of different EO concentrations were placed in the center of agar plate seeded with the respective bacteria. In the second experiment, the standard antibiotic discs (gentamicin, amoxicillin, cefazolin) soaked with 10 µL of selected concentrations of the essential oil were placed in the center of the respective plates of the test organisms. Plates were placed at 4 °C for 2 h and then incubated at 37 °C for 24 h. Standard discs of antibiotics (without EO) were used as positive control while discs soaked with methanol were used as negative control. Each experiment was carried out in triplicate and the mean diameter of the inhibition zone was recorded.

The sensitivity to the different antibacterial solutions was classified by the diameter of the inhibition zone as: not sensitive for diameters less than 8 mm, sensitive for diameters of 9-14 mm, very sensitive for diameters of 15-19 mm and extremely sensitive, for diameters larger than 20 mm.<sup>25</sup>

### Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. Data are expressed as mean ± SD. Differences were evaluated by one-way ANOVA test (0.5 %) using Statistica 8.0 software, StatSoft Inc., USA.<sup>26</sup> The combination of EO with ABs can provide synergistic, additive, or antagonistic interactions. If the value of combined EO/ABs is significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the sum of individual values (after removing the disc diameters), it is considered to be a synergistic effect; and if it is equal ( $P \geq 0.05$ ), it is an additive effect. However, the antagonistic effect occurs when the value of one or both EO/ABs is significantly higher than the value of their mixture.<sup>27</sup>

## Results

### Chemical composition of the essential oil

Hydrodistillation of the ripe berries gave a faint green color essential oil with a mean yield of 1.38 % (v/w). Off the fifty components detected, thirty-five were successfully identified representing 86.93 % of the oil (Table 1). Six constituents were monoterpene hydrocarbons accounting for 31.89 % of the EO, fifteen constituents were oxygenated monoterpenes (26.5 %), four constituents were sesquiterpene hydrocarbons (3.4 %), and ten constituents were oxygenated sesquiterpenes (25.05 %). The major constituents identified in the oil

were m-mentha-6,8-diene (15.43 %),  $\beta$ -pinene (10.59 %), elemol (8.31 %), terpinene-4-ol (7.44 %),  $\alpha$ -cadinol (6.63 %) and linalool (4.64 %).

**Table 1.** Chemical composition of essential oil isolated from ripe berries of *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*.

RT	KI	Components	%
4.16	940	$\alpha$ -pinene	0.41
4.83	977	Sabinene	0.98
4.93	983	<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<b>10.59</b>
5.12	994	$\beta$ -Myrcene	1.29
5.73	1028	O-Cymene	3.28
5.81	1033	<b>m-Mentha-6,8-diene</b>	<b>15.43</b>
6.48	1071	cis-Sabinene hydrate	1.96
7.04	1104	<b>Linalool</b>	<b>4.64</b>
7.4	1125	cis-p-Menth-2-en-1-ol	0.79
7.61	1138	cis-Limoneneoxide	0.58
7.72	1145	Camphor	0.74
8.01	1163	Sabina ketone	0.8
<b>8.33</b>	<b>1182</b>	<b>terpinene-4-ol</b>	<b>7.44</b>
8.45	1190	p-Cymen-8-ol	1.1
8.55	1196	$\alpha$ -terpeneol	1.15
9.35	1249	Carvone	0.79
<b>9.5</b>	<b>1259</b>	<b>Phellandral</b>	<b>2.37</b>
10.2	1305	Myrtenylacetate	0.42
10.8	1354	$\alpha$ -terpinylacetate	1.57
11.1	1369	2R,4R-p-Mentha-1(7), 8-diene-2-hydroperoxide	0.71
<b>11.3</b>	<b>1386</b>	<b>Nerolidylacetate</b>	<b>1.44</b>
11.5	1399	$\beta$ -Elemene	0.75
12.8	1505	$\alpha$ -Amorphene	0.55
13.1	1525	$\gamma$ -muurolène	1.24
13.5	1559	<b>Elemol</b>	<b>8.31</b>
13.6	1567	E-Nerolidol	0.48
13.9	1598	Caryophylleneoxide	1.37
14.5	1643	(-)-Spathulenol	0.74
14.5	1646	$\beta$ -Gurjunene	0.86
14.6	1654	t-Muurolol	1.84
14.7	1668	<b><math>\alpha</math>-cadinol</b>	<b>6.63</b>
15.4	1727	Junipercamphor	1.3
16.2	1801	8- $\alpha$ -Acetoxyelemol	1.19
16.8	1855	Isoaromadendreneepoxide	<b>2.44</b>
17.3	1908	$\alpha$ -Copaen-11-ol	0.75
<b>Total identified</b>			<b>86.93</b>
<b>Yield (g/100 g dry weight)</b>			<b>1.38</b>
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>			<b>31.98</b>
<b>Oxygenated monoterpenes</b>			<b>26.5</b>
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>			<b>3.4</b>
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>			<b>14.15</b>

RT, retention time; KI, Kovats index. The major constituents and the chemical groups of identified compounds with corresponding portion in analyzed essential oil are presented in bold.

### Antibacterial activity

As shown in Table 2, the oil tested alone showed notable antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* at concentrations of 1/1, 1/2, 1/4 and 1/8 (v/v in methanol), with inhibition zone diameters ranging from 8 to 27 mm,

while *P. aeruginosa* and *B. subtilis* exhibited resistance to all tested EO concentrations.

The antibiotics sensitivity test revealed that *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* were sensitive to all the tested antibiotics, while *P. aeruginosa* was resistant to Amoxicillin and Cefazolin discs (Table 3). The same table also indicates that the combination of *J. thurifera* EO with antibiotics demonstrated synergistic, additive and antagonistic interactions, depending on the combination of EO and ABs. The combination of EO/GEN exhibited a synergistic effect against all bacterial strains tested as evidenced by the significant increase of the inhibition zone diameters. In contrast, the combination of berries EO with the other antibiotics displayed antagonistic interactions on *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. However, the combined application of EO/AMX and EO/CFZ demonstrated synergistic and additive effects against *B. subtilis* respectively.

### Discussion

Plants have always been a source of inspiration for novel therapeutic drugs, as plant-derived medicines have made a significant contribution to human health.<sup>28,29</sup> The focus of this study was to characterize and evaluate the putative antibacterial and synergistic activities of the EO extracted from the berries of Algerian *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*.

Considering the yield and chemical composition of the obtained EO, our results differ from those reported by Hernandez et al<sup>14</sup> in that they found lower proportion of berries essential oil 0.13 % (v/w), with as main components limonene (84.32 %),  $\beta$ -myrcene (3.82 %),  $\alpha$ -pinene (3.48 %) and  $\alpha$ -terpinolene (1.39 %). They also differ from those of Zeraib et al,<sup>10,11</sup> who, by analyzing the essential oils extracted from the leaves of the same subspecies (var. *aurasiaca*) obtained respectively 0.40 % to 0.53 % (v/w) of yield with sabinene as the major component. However, our results were consistent with the fact that it is widely accepted that juniper berries contain a higher proportion of essential oils than leaves and wood.<sup>30,31</sup> Generally, the yield and composition of the plant essential oils are influenced by several factors such as the method of extraction, plant part used for sampling, plant age, genetic makeup and environmental condition.<sup>21</sup> Therefore, the disagreement of our results with those previously reported on *J. thurifera* berries,<sup>14</sup> or leaves<sup>10,11</sup> could be explained by any of these factors.<sup>10,18,21</sup>

**Table 2.** Antibacterial activity expressed as mean  $\pm$  SD of growth inhibition zone diameters (mm) of *J. thurifera* berries essential oil.

Strains tested	EO concentration (diluted in methanol)					
	Pure	1/2	1/4	1/8	1/16	ME
<i>E. coli</i>	24.33 $\pm$ 0.58	12.67 $\pm$ 0.58	<b>10.33<math>\pm</math>0.58</b>	8.0 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0
<i>S. aureus</i>	27.0 $\pm$ 1.0	24.67 $\pm$ 0.58	15.0 $\pm$ 1.0	<b>12.67<math>\pm</math>0.58</b>	7.0 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 0.0
<i>P. aeruginosa</i>	<b>7.33<math>\pm</math>0.58*</b>	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0
<i>B. subtilis</i>	<b>6.0<math>\pm</math>0.0</b>	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0

\*The results illustrated in bold correspond to the concentrations selected for the test of the combination of *J. thurifera* berries EO with the ABs. ME, Methanol. When inhibition zone diameters = 6 mm, no inhibition.

**Table 3.** Antibacterial activity expressed as mean  $\pm$  SD of growth inhibition zone diameters (mm) of conventional antibiotics alone and in combination with *J. thurifera* berries essential oil.

Test substance	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
GEN	28 $\pm$ 1.0	32 $\pm$ 1.0	19.67 $\pm$ 0.58	22.83 $\pm$ 0.29
AMX	26 $\pm$ 1.0	29.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	15.33 $\pm$ 0.58
CFZ	42 $\pm$ 1.0	40.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	28 $\pm$ 1.0
GEN + EO	34.67 $\pm$ 0.58	46 $\pm$ 1.0	24.33 $\pm$ 0.58	27 $\pm$ 1.0
AMX + EO	14.67 $\pm$ 0.58	28 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 0.0	20.33 $\pm$ 0.58
CFZ + EO	38.67 $\pm$ 0.58	32.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	28.33 $\pm$ 0.58
<b>P values</b>				
EO/GEN	0.007**	3.8 $\times$ 10 <sup>-4</sup> ***	0.0074 **	0.0022 **
EO/AMX	5 $\times$ 10 <sup>-6</sup> ***	2.3 $\times$ 10 <sup>-4</sup> ***	0.016*	4.4 $\times$ 10 <sup>-4</sup> ***
EO/CFZ	8.4 $\times$ 10 <sup>-5</sup> ***	3 $\times$ 10 <sup>-5</sup> ***	0.016*	0.643 ns
<b>Combination Effect</b>				
EO/GEN	Synergistic	Synergistic	Synergistic	Synergistic
EO/AMX	Antagonistic	Antagonistic	Antagonistic	Synergistic
EO/CFZ	Antagonistic	Antagonistic	Antagonistic	Additive

ns, no significant; \*, significant (P<0.05); \*\*, highly significant (P<0.01); \*\*\*, very highly significant (P<0.001). GEN, gentamicin; AMX, amoxicillin; CFZ, cefazolin; EO, essential oil.

Because of their complex bioactive composition, EOs interacts with several targets at the same time, thus preventing pathogens from acquiring resistance.<sup>8</sup> Therefore, the interaction between EO and antibiotics can produce three types of effects, namely: synergistic, additive or antagonistic effects. Interestingly, the combined application of *J. thurifera* EO with gentamicin demonstrated synergistic effects against all tested bacteria. A synergistic effect can be produced if the constituents of a mixture affect different targets.<sup>36</sup> This could be explained by the fact that EO penetrates the microbial cell, presumably because of its hydrophobic character, alters the cellular functions,<sup>37</sup> increases membrane permeability,<sup>38</sup> which facilitates the penetration of gentamicin.<sup>39</sup> Once inside, gentamicin interrupts protein synthesis by blocking the 30S subunit of the bacterial ribosome. Also, EOs are often more effective against Gram-positive than Gram-negative bacteria due to the fact that the outer lipopolysaccharide layer of gram-negative bacteria limits the diffusion of hydrophobic compounds.<sup>32</sup> Our results are in agreement with these findings in that the combined addition of EO/GEN had greater effects on Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *B. subtilis*). In contrast, the combination of products acting on the same target of the microorganism leads to antagonistic or additive effects.<sup>36</sup> Consistent with this, the antagonistic and additive interactions observed respectively between EO/amoxicillin, and EO/cefazolin could be explained by the fact that EO and these two antibiotics act on the same target of the bacterial cells (e.g., cell membrane). Nevertheless, the interpretation of such results requires some caution since growth media and culture conditions can influence the observed effects. In conclusion, this study provides, for the first time, important data on the chemical composition and biological activity of the essential oil of *J. thurefira* var. *aurasiaca* berries. The studied essential oil (alone or in combination with antibiotics) showed significant activity against almost all the tested bacterial strains. However, further studies should be carried out on its antibacterial activity using other bacterial groups and on its antifungal, antioxidant, cytotoxic and phytotoxic properties as well.

### Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic.

### Conflict of Interests

The authors claim that there is no conflict of interest.

### References

- Sienkiewicz M, Łysakowska M, Kowalczyk E, Szymańska G, Kochan E, Krukowska J, et al. The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*. 2017;43(2):310-7. doi:10.1016/j.burns.2016.08.032
- Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin DS. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem Rev*. 2016;116(16):9162-236. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00184
- Kwiatkowski P, Mnichowska-Polanowska M, Pruss A, Masiuk H, Dziecioł M, Giedrys-Kalemba S, et al. The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers. *Burns*. 2017;43(7):1544-51. doi:10.1016/j.burns.2017.04.014
- Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind Crop Prod*. 2014;52:1-7. doi:10.1016/j.indcrop.2013.09.032
- Moussaoui F, Alaoui T. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2016;6(1):32-7. doi:10.1016/j.apjt.2015.09.024
- Alaoui Jamali C, Kasrati A, Fadli M, Hassani L, Leach D, Abbad A. Synergistic effects of three Moroccan thyme essential oils with antibiotic cefixime. *Phytothérapie*. 2017. doi:10.1007/s10298-017-1107-2

7. Boonyanugomol W, Krairiwattana K, Rukseree K, Boonsam K, Narachai P. *In vitro* synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *J Infect Public Health*. 2017;10(5):586-92. doi:10.1016/j.jiph.2017.01.008
8. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*. 2017;4(3):58. doi:10.3390/medicines4030058
9. Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J*. 2014;8(1):6-14. doi:10.2174/1874285801408010006
10. Zeraib A, Ramdani M, Boudjedjou L, Chalard P, Figuredo G. Characterization and chemosystematics of Algerian thuriferous juniper (*Juniperus thurifera* L.). *J Appl Bot Food Qual*. 2014;87:249-55.
11. Zeraib A, Ramdani M, Boudjedjou L, Chalard P, Figuredo G. Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *J BioSci Biotech*. 2014;3(2):147-54.
12. Gauquelin T, Bertaudière V, Cambededes C, Largier G. Le Jeneverier thurifere (*Juniperus thurifera* L.) dans les pyrenees: état de conservation et perspectives. *Acta Botanica Barcinonensia*. 2003;49:83-94.
13. Vela E, Schäfer PA. Typification de *Juniperus thuriferavar. africana* Maire, délimitation taxonomique et conséquences nomenclaturales sur le Genévrier thurifère d'Algérie. *Ecologia Mediterranea*. 2013;39(1):69-80.
14. Hernandez EG, Martinez CL, Villanova R. Determination by gas chromatography of terpenes in the berries of the species *Juniperus oxycedrus* L., *J. thurifera* L. and *J. Sabina* L. *J Chromatogr A*. 1987;396:416-20. doi:10.1016/s00219673(01)94085-3
15. Adams RP. Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essentials and RAPD DNA fingerprinting. *Biochem Syst Ecol*. 1999;27(7):709-25. doi:10.1016/s0305-1978(99)00016-2
16. Adams RP, Mumba LE, James SA, Pandey RN, Gauquelin T, Badri W. Geographic variation in the leaf oils and DNA Fingerprints (RAPDs) of *Juniperus thurifera* L. from Morocco and Europe. *J Essent Oil Res*. 2003;15(3):148-54. doi:10.1080/10412905.2003.9712098
17. Barrero AF, Quilez del Moral JF, Herrador MM, Akssira M, Bennamara A, Akkad S, et al. Oxygenated diterpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *africana*. *Phytochemistry*. 2004; 65(17):2507-15. doi:10.1016/j.phytochem.2004.07.021
18. Achak N, Roman A, Alifriqi M, Adams PR. Effect of the leaf drying and sources on the essential oil composition of *Juniperus thurifera* L. var. *africana* (Maire.) from Tensift Alhouz Marrekch (Morocco). *J Essent Oil Res*. 2008;20(3):200-4. doi:10.1080/10412905.2008.9699990
19. Achak N, Roman A, Alifriqi M, Adams PR. Chemical studies of leaf essential oils of three species of *Juniperus* from Tensift Al Haouz-Marrakech Region (Morocco). *J Essent Oil Res*. 2009;21(4):337-41. doi:10.1080/10412905.2009.9700185
20. Mansouri N, Satrani B, Ghanmi M, El ghadraoui L, Aafi A, Farah A. Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*. 2010;8(3):166-70. doi:10.1007/s10298-010-0550-4
21. Bahri F, Harrak R, Achak N, Romane A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from *Juniperus thurifera* L. var. *africana*. *Nat Prod Res*. 2013;27(19):1789-94. doi:10.1080/14786419.2012.755678
22. Satrani B, Ghanmi M, Mansouri N, Amusant N. Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of moroccan junipers. *Environmental Science: An Indian Journal*. 2015;11(7):239-47.
23. Adams RP. Identification of essential oil components by Gas chromatography/Mass spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation; 2001.
24. Dias C, Aires A, Bennett RN, Rosa EAS, Saavedra MJ. First study on antimicrobial activity and synergy between isothiocyanates and antibiotics against selected Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria from clinical and animal source. *Med Chem*. 2012;8(3):474-80. doi:10.2174/1573406411208030474
25. Ponce AG, Fritz R, del Valle C, Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Sci Technol*. 2003;36(7):679-84. doi:10.1016/s0023-6438(03)00088-4
26. Hill T, Lewicki P. Statistics: Methods Applications, Statsoft, Tulsa, OK. Electronic version is available at: [www.statsoft.com/textbook/k-nearest-neighbors/](http://www.statsoft.com/textbook/k-nearest-neighbors/).
27. Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. Antibacterial activity and interactions of plantessential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Food Drug Anal*. 2017;25(2):403-8. doi:10.1016/j.jfda.2016.06.002
28. Sacca-Sidi IYM, Alowanou GG, Olounladé PA, Nadège-Dedehou VFG, Hounzangbé-Adoté SM. *In vitro* combined effects of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* methanolic extracts on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Health and Production*. 2016;4(4):128-33. doi:10.14737/journal.ljahp/2016/4.4.128.133
29. Roslindawani MN, Syafiqah AS, Jesse FFA, Effendy AW, Zamri-Saad M. Recombinant *Caseous lymphadenitis* vaccine with palm oil as adjuvant enhances the humoral and cell-mediated immune responses in rat model. *Journal of Animal Health and Production*. 2016;4(1):22-5. doi:10.14737/journal.jahp/2016/4.1.22.25

30. Ennajjar M, Bouajil J, Lebrihi A, Mathieu F, Savagnac A, Abderraba M, et al. The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *J Sci Food Agric*. 2010;90(3):462-70. doi:10.1002/jsfa.3840
31. Shanjani PS, Mirza M, Calagari M, Adams RP. Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excels*. *Ind Crop Prod*. 2010;32(2):83-7. doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.003
32. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-53. doi:10.1016/j.ijfodmicro.2004.03.022
33. Majouli K, Besbes Hlila M, Flamini G, Ben Jannet H, Kenani A. *In vitro* antibacterial activity of the *Hertia cheirifolia* L. essential oils. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2016;4(11):865-7. doi:10.12980/jclm.4.2016j6-172
34. Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J Ethnopharmacol*. 2005;96(1-2):151-8. doi:10.1016/j.jep.2004.08.031
35. Rahman MM, Sultana T, Yousuf Ali M, Rahman MM, Al-Reza SM, Rahman A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and various extracts from *Cassiasophera* L. against *Bacillus* sp. from soil. *Arab J Chem*. 2017;10(2):S2132-7. doi:10.1016/j.arabjc.2013.07.045
36. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009;16(2-3):97-110. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018
37. Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 795435. doi:10.1155/2015/795435
38. Nazzaro F, Fratianni, F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1451-74. doi:10.3390/ph6121451
39. Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali ME, et al. *In Vitro* synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential Oils. *Curr Med Chem*. 2010;17(28):3289-95. doi:10.2174/092986710792231996



## Chemical composition and biological activities of Algerian *Santolina africana* essential oil

Lamia Boudjedjou<sup>a,b</sup>, Messaoud Ramdani<sup>a</sup>, Azzeddine Zeraib<sup>c,d</sup>,  
Tarek Benmeddour<sup>b,c</sup>, Azzeddine Fercha<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Natural Resources Valorization, Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria

<sup>b</sup>Department of Life and Natural Sciences, Mohamed Khider University, 7000 Biskra, Algeria

<sup>c</sup>Laboratory of Genetics, Biotechnology and Valorization of Bio-resources, Mohamed Khider University, 7000 Biskra, Algeria

<sup>d</sup>Department of Biology, Abbas Laghrou University, 40000 Khenchela, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 March 2019

Revised 13 May 2019

Accepted 20 May 2019

#### Keywords:

*Santolina africana*

Essential oil

GC-MS

Antioxidant activity

Antibacterial activity

### ABSTRACT

The chemical composition and the biological activities of the essential oil (EO) extracted by hydrodistillation from the aerial parts of Algerian population of *Santolina africana* have been studied. *S. africana* EO was chemically characterized by means of GC-MS. Forty-six compounds were identified representing ~92% of the total oil.  $\beta$ -pinene (11.65%), germacrene (10.33%), 1,8-Cineole (9.46%) and sabinene (7.18%) were the major components. The EO antioxidant activity was evaluated by DPPH assay. All EO concentrations showed considerable scavenging ability on DPPH radicals ( $IC_{50} < 1.13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The antibacterial screening of EO alone and in combination with three conventional antibiotics (ABs) was made by way of disc diffusion against four standard strains. The interactive effects between EO and ABs were evaluated using the One-way ANOVA analysis. The results showed a remarkable antibacterial activity of *S. africana* EO against *Staphylococcus aureus* (29 mm), *Escherichia coli* (29.27 mm) and *Bacillus subtilis* (15 mm). Excluding the antagonistic effect observed with cefazolin, the combined application of *S. africana* EO with the other two antibiotics led to synergistic and additive effects. These findings show the potential use of *S. africana* EO as an interesting source of potent antioxidant and antibiotic components useful for medicine.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of African Institute of Mathematical Sciences / Next Einstein Initiative.

This is an open access article under the CC BY license.  
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

### Introduction

The search for new natural products with promising biological activities continues to draw attention. Medicinal plants have long been a source of molecules with therapeutic potential, and nowadays still represent an important pool for the identification of new innovative drugs [3,37].

**Abbreviations:** EO, essential oil; AB, antibiotic; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; AsA, ascorbic acid; ANOVA, analysis of variance; RI, retention index; MHI, Mueller Hinton medium; ROS, reactive oxygen species; GEN, gentamicin; AMX, amoxicillin; CFZ, cefazolin.

\* Corresponding author.

E-mail address: [ferchazzed@yahoo.fr](mailto:ferchazzed@yahoo.fr) (A. Fercha).

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00090>

2468-2276/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of African Institute of Mathematical Sciences / Next Einstein Initiative. This is an open access article under the CC BY license. (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Oxidative stress refers to the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the organism's ability to counteract the harmful effects of these species by antioxidants [32]. ROS may bind to vital components of cells, causing extensive damage to various cellular components including proteins, lipids, and DNA. ROS are involved in the pathogenesis of many diseases including cancer, Parkinson, Alzheimer, atherosclerosis, heart failure, myocardial infarction, vitiligo, and chronic fatigue syndrome (for review, see [14]). In recent years, several epidemiological studies have confirmed that intake of exogenous antioxidants is effective in preventing or suppressing such diseases [33], therefore, there is a growing interest in natural molecules with antioxidant activity that might help preventing or decreasing oxidative damages without exerting harmful side effects [26].

The increase of microbial resistance to antibiotics threatens public health worldwide as it reduces the effectiveness of treatments and increases morbidity, mortality, and costs for healthcare systems. Therefore, there is a pressing need to develop new and innovative antimicrobial agents [22]. Among the potential sources of new agents, plants have long been investigated. A major group of plant antimicrobial compounds is represented by essential oils (EOs), which are complex mixtures of volatile secondary metabolites [22]. Since the biological activities of EOs are composition-dependent [5], no particular resistance or adaptation to EOs has been described to date. Besides antimicrobial activity, EOs and their components can act in synergy with some antibiotics, enhancing their antimicrobial activity [23,26].

The genus *Santolina* (Asteraceae), widely represented in the Mediterranean and North Africa flora, is a taxonomically complex group of species used in traditional medicine (<https://en.wikipedia.org/wiki/Santolina>). Flowers and leaves of different *Santolina* species have been used in the treatment of liver and digestive disorders [34]. *Santolina africana* is an endemic shrub of North Africa (Algeria, Tunisia, and Morocco) that naturally grows in steppe or forest-steppe areas [28]. In folk medicine, *S. africana* has been used for its hypoglycemic effect as well as for the treatment of stomacal pain [7]. Traditionally the inflorescences of *S. africana* are mixed with honey and used for the treatment of the cardialgia ulcer and stomacal pains [8]. Although the various members of this genus have been widely studied [11,25,34], *S. africana* has not been hitherto investigated in detail since only a few studies have been concerned with the chemical and biological properties of this species [4,12,13,19,38]. Therefore, the purpose of the present study was to determine the chemical composition and to evaluate the biological activities of *S. africana* EO as new potential source of natural antibiotic and antioxidant components.

## Materials and methods

### Plant material and essential oil extraction

Fresh aerial parts of *Santolina africana* Jord. and Fourr., were collected at the flowering stage in May 2014 from Ichemoul (1365 m of altitude), province of Batna, located 350 km South-East of Algiers, with a supra-Mediterranean climate and precipitations superior to 450 mm. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Natural Resources Valorization Laboratory, Setif 1 University.

The EO of *S. africana* was obtained by hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus for 3 h [39]. The yield of EO was averaged over three experiments and reported as yield of dry weight of the plant material. The extracted oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4 °C until used for the analysis.

### Essential oil analysis

The analysis of the *S. africana* EO was performed with a GC-MS system using a BR-5 ms (5% phenyl methyl siloxane) capillary column (30 m length × 0.32 mm column id, 0.25 µm film thickness) coupled with a Thermo DSQ II quadrupole mass spectrometer (EI of 70 eV). The carrier gas was helium at a flow rate of 1.2 mL.min<sup>-1</sup>; the injection volume was 0.1 µL; injector split mode 1:100. The initial temperature of the column was kept at 70 °C for 1 min and then increased at 10 °C.min<sup>-1</sup> up to 300 °C. The mass spectrum of each compound was recorded between 40 and 500 Da (*m/z*<sup>-1</sup> equivalent unit). Data acquisition and processing were carried out using Xcalibur data system ver. 2.0 [1]. Retention indices (RI) were calculated for all volatile components using the homologous series of n-alkanes (C6-C18).

### DPPH radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging assay was performed as described by Blois [9] with slight modifications. An aliquot (100 µL) of an extract or ascorbic acid at the different concentration was mixed with 1.9 mL of MeOH DPPH solution (4%). The mixture was left in the dark for 30 min before reading the absorbance at 517 nm with MeOH DPPH solution as blank. The percent DPPH scavenging effect was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

where  $A_0$  is the absorbance of the control,  $A_1$  is the absorbance of the sample. The IC<sub>50</sub> values were calculated using the equation obtained from the linear regression analysis.

### Antibacterial activity assessment

Antibacterial studies have been evaluated by the method of disc-diffusion. Four bacterial strains were tested in this study, two Gram-positive bacteria namely, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 21332, and two Gram-negative bacteria namely, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

The bacterial strains were first grown on Mueller Hinton medium (MHI) at 37 °C for 24 h prior to seeding on to the nutrient agar. The inoculums of the respective bacteria were streaked onto MHI agar plates using a sterile swab. While a serial dilution of EO (pure, 1/2, 1/4, 1/8 and 1/16) was performed to obtain the smallest inhibition zone, the selected EO concentrations for each strain were used in combination with conventional antibiotics (ABs).

Under aseptic conditions, 10  $\mu$ L of diluted EOs were applied to sterilized Whatman filter paper discs N° 3 (6 mm diameter) and placed on the agar surface. Before incubating at 37 °C, plates were refrigerated at 4 °C for 2–3 h to allow diffusion of the oil. After incubation period, the diameters of the growth inhibition zones were measured to the nearest mm. All the tests were performed in triplicate and the means were calculated as final results. The sensitivity to the EO was classified by the diameter of the inhibition halos as follows: not sensitive (-) for diameter less than 8 mm; sensitive (+) for diameter 9–14 mm; very sensitive (++) for diameter 15–19 mm and extremely sensitive (+++) for diameter larger than 20 mm [27].

### Combination test of EO and ABs

Combined antibacterial action in vitro of EO and gentamicin (10  $\mu$ g.disc<sup>-1</sup>), amoxicillin (25  $\mu$ g.disc<sup>-1</sup>) and cefazolin (30  $\mu$ g.disc<sup>-1</sup>) was assessed following the method of disc-diffusion as described by Moussaoui and Alaoui [23]. First, we evaluated the antibacterial activity of the three antibiotics, which are in the form of ready to use discs; therefore, the antibacterial activity of antibiotics added by 10  $\mu$ L of selected dilution of *S. africana* EO was evaluated. The interaction between the EO and ABs can produce a synergistic, additive, or antagonistic effect. If the value of the EO/AB combination is significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the sum of the individual values, it is a synergistic effect; but an additive effect if it is equal ( $P \geq 0.05$ ). The antagonistic effect, in contrast, occurs when the value of each of the two treatments separately EO/AB is significantly greater than the value of their mixture [31].

### Statistical analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . Statistical significance was analyzed by the one-way ANOVA and post-hoc tests by using the statistical software package STATISTICA 8.0 [15]. Differences with  $P < 0.05$  were considered significant.

## Results and discussion

### Essential oil composition

On hydrodistillation, the aerial parts of *S. africana* yielded 0.76% (v/w) of yellowish essential oil. Our results are in good agreement with those of Lmachraa et al. [19] and Zaiter et al. [38], which by analyzing the same species they obtained yield of 0.86% and 0.8% (v/w) respectively. GC-MS analysis of the essential oil resulted in the identification of forty-six compounds constituting about 91.98% of the total oil (Table 1).

The results indicated that the *S. africana* EO was a complex mixture of sesquiterpene hydrocarbons (25.2%), monoterpene hydrocarbons (24.89%), oxygenated sesquiterpenes (22.01%) and oxygenated monoterpenes (19.8%). In agreement, previous studies have confirmed the prevalence of hydrocarbon fraction compared to the oxygenated components in EOs isolated from many species of the genus *Santolina* [12,18,38].

The major constituents identified in our sample were  $\beta$ -pinene (11.65%), germacrene D (10.33%), 1,8-cineole (9.46%), sabinene (7.18%), hedycaryol (5.79%),  $\alpha$ -bisabolol (5.63%) and  $\alpha$ -curcumene (4.5%). Compared to previous reports, there are fewer similarities with the oil of the same species collected in Algeria, which characterized by prevalence of  $\beta$ -pinene (12.78%), 1,8-cineol (10.02%), curcumene (7.96%), and myrcene (6.94%) [38], and to the oil of *S. rosmarinifolia* from Algeria, in which the main components are: germacrene-D (30.2%),  $\beta$ -myrcene (12%), tricosane (10.6%),  $\beta$ -pinene (10.1%), sabinene (7.0%) and pentacosane (6.7%) [11]. However, our results are different from those obtained for oils extracted from the same species collected from different areas of North Africa [4,12,19]. For instance, the main compounds identified in Tunisian *S. africana* were terpinen-4-ol (54.96%),  $\alpha$ -terpineol (14.06%), borneol (8.37%), *rans*-chrysanthanol (3.65%), camphor (3.61%), and 1,8-cineole (3.59%) [4]. While the essential oil of Moroccan sample was dominated by camphor (54.30%), borneol (17.24%), bornyl acetate (8.61%) and 1,8-Cineole (5.27%) [19]; the main constituents of the essential oil of Algerian *S. africana* flowers were acenaphthane (25.23%), calarene (21.54%), ocimene (17.44%) [12]. These findings support the suggestion that studying the EOs composition of a larger number of populations of this species (as others species of the genus *Santolina*) can be helpful in chemiotaxonomy [30].

### Antioxidant activity

As displayed in Table 2, the antioxidant activity values for the investigated EO concentrations (from 0.28 to 18 mg.mL<sup>-1</sup>) varied between 23.3% to 92.9% with IC<sub>50</sub> inferior to 1.13 mg.mL<sup>-1</sup>, but it has performed a lower potent to scavenging the

**Table 1**  
Chemical composition of essential oil from Algerian *S. africana*.

Peak no.	Compound name	Retention index (RI)	Percentage (%)
1	(Z)-Hex-3-en-1-ol	857	0.08
2	Santolinatriene	908	0.11
3	$\alpha$ -thujene	924	0.11
4	$\alpha$ -Pinene	932	1.23
5	Camphene	946	0.42
6	Verbinene	948	2.23
7	<b>Sabinene</b>	968	<b>7.18</b>
8	<b><math>\beta</math>-pinene</b>	978	<b>11.65</b>
9	$\alpha$ -Terpinene	1021	0.2
10	<i>o</i> -Cymene	1022	0.28
11	<b>1,8-Cineole</b>	1031	<b>9.46</b>
12	$\gamma$ -Terpinene	1062	0.32
13	Terpinolene	1086	1.16
14	(z)-p-menth-2-en-1-ol	1092	0.76
15	Chrysanthenone	1124	0.48
16	Camphor	1140	2.17
17	cis- $\beta$ -terpineol	1140	0.49
18	cis-Verbenol	1140	1.97
19	Borneol	1147	0.9
20	Terpinene-4-ol	1151	1.35
21	$\alpha$ -terpineol	1161	1.33
22	Myrtenol	1198	0.27
23	Myrtenyl acetate	1324	0.1
24	p-Mentha-1,4-dien-7-ol	1325	0.13
25	$\delta$ -Elemene	1335	3.68
26	Eugenol	1360	0.39
27	$\alpha$ -Copaene	1374	0.5
28	(Z) Caryophyllene	1408	0.64
29	cis- $\alpha$ -Bergamotene	1411	0.56
30	$\alpha$ -Caryophyllene	1415	0.2
31	$\alpha$ -Guaiene	1437	0.25
32	$\alpha$ -Curcumene	1470	4.5
33	<b>Germacrene D</b>	1480	<b>10.33</b>
34	$\gamma$ -Muurolene	1478	0.18
35	$\delta$ -cadinene	1523	0.49
36	cis- $\alpha$ -Bisabolene	1527	3.87
37	<b>Hedycaryol</b>	1540	<b>5.79</b>
38	Spathulenol	1578	3.65
39	Caryophyllene oxide	1582	0.78
40	Isoaromadendrene epoxide	1579	0.31
41	Globulol	1590	0.32
42	$\alpha$ -epi-Cadinol	1640	0.32
43	Cubanol	1645	0.28
44	$\beta$ -Eudesmol	1665	1.3
45	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1672	3.63
46	<b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b>	1685	<b>5.63</b>
<b>Total identified</b>			<b>91.98</b>
<b>Yield (g/100 g dry weight)</b>			<b>0.76</b>
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>			<b>24.89</b>
<b>Oxygenated monoterpenes</b>			<b>19.8</b>
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>			<b>25.2</b>
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>			<b>22.01</b>

The chemical groups of identified compounds with corresponding portion in analyzed essential oil are presented in bold.

**Table 2**  
Antioxidant activity of *S. africana* essential oil and ascorbic acid using DPPH radical.

Conc. of EO (mg.mL <sup>-1</sup> )	Antioxidant activity of EO		Conc. of AsA ( $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> )	Antioxidant activity of AsA	
	P. inhibition (%)			P. inhibition (%)	
18	92.90 $\pm$ 0.60	100	97.48 $\pm$ 0.22		
9	83.47 $\pm$ 3.71	50	97.26 $\pm$ 0.11		
4.5	71.43 $\pm$ 4.96	25	87.38 $\pm$ 0.06		
2.25	68.77 $\pm$ 2.61	12.5	61.45 $\pm$ 0.17		
1.13	55.30 $\pm$ 2.65	6.25	25.71 $\pm$ 0.11		
0.56	37.70 $\pm$ 2.63	3.12	12.55 $\pm$ 0.06		
0.28	23.30 $\pm$ 0.70				

EO, essential oil, P., percentage; Conc., concentration; AsA, ascorbic acid.

**Table 3**

Antibacterial activity of *S. africana* essential oil. Values were expressed as mean  $\pm$  SD of growth inhibition zone diameters (mm).

Strains tested	EO concentration				
	pure	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>E. coli</i>	29.67 $\pm$ 0.58	25 $\pm$ 1.0	21.67 $\pm$ 0.58	<b>11.67 <math>\pm</math> 1.52<sup>a</sup></b>	10 $\pm$ 1.0
<i>S. aureus</i>	29 $\pm$ 1.0	24.33 $\pm$ 0.58	15 $\pm$ 1.0	<b>12.33 <math>\pm</math> 0.58<sup>a</sup></b>	8.67 $\pm$ 0.57
<i>P. aeruginosa</i>	13.33 $\pm$ 0.58	<b>7.67 <math>\pm</math> 0.58<sup>a</sup></b>	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0
<i>B. subtilis</i>	15 $\pm$ 1.0	14 $\pm$ 1.0	11.67 $\pm$ 0.58	<b>8.0 <math>\pm</math> 1.0<sup>a</sup></b>	6.0 $\pm$ 0.0

<sup>a</sup> The results illustrated in bold correspond to the concentrations selected for the test of the combination of *S. africana* EO with the ABs.

**Table 4**

Antibacterial activity of conventional antibiotics alone and in combination with *S. africana* essential oil. Values were expressed as mean  $\pm$  SD of growth inhibition zone diameters (mm).

Test substance	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
GEN	28 $\pm$ 1.0	32 $\pm$ 1.0	19.67 $\pm$ 0.58	22.83 $\pm$ 0.29
AMX	26 $\pm$ 1.0	29.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	15.33 $\pm$ 0.58
CFZ	42 $\pm$ 1.0	40.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	28 $\pm$ 1.0
GEN + EO	34.67 $\pm$ 0.58	49.33 $\pm$ 0.58	24.67 $\pm$ 0.58	28.33 $\pm$ 0.58
AMX + EO	31.67 $\pm$ 0.58	36.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	15.33 $\pm$ 0.58
CFZ + EO	38.33 $\pm$ 0.58	38.67 $\pm$ 0.58	6.0 $\pm$ 0.0	25.67 $\pm$ 0.58
<b>P values</b>				
EO/GEN	0.46 ns	0.027*	0.002**	0.0118*
EO/AMX	1.0 ns	0.39 ns	0.007**	0.013*
EO/CFZ	0.0006***	0.0002***	0.007**	0.025*
<b>Combination effect</b>				
EO/Gen	Additive	Synergistic	Synergistic	Synergistic
EO/AMX	Additive	Additive	Antagonistic	Antagonistic
EO/CFZ	Antagonistic	Antagonistic	Antagonistic	Antagonistic

GEN, gentamicin; AMX, amoxicillin; CFZ, cefazolin; EO, essential oil.

ns, no significant.

\* Significant ( $P < 0.05$ ).

\*\* Highly significant ( $P < 0.01$ ).

\*\*\* Very highly significant ( $P < 0.001$ ).

DPPH as compared to the AsA ( $IC_{50} < 12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Similar results were reported in studies of antioxidant effect of EOs from *S. africana* flowers [12], *S. canescens* [34], and *S. chamaecyparissus* aerial parts [25]. Nevertheless, the antioxidant effect of the tested EO is very important when comparing it with the results of the aforementioned reports. Generally, the antioxidant activity of essential oils is related to their major compounds [6], and their high hydrogen-donating capacity [21]. In line with this, the main components of the evaluated EO, such as  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, sabinene, 1,8-cineole, germacrene D, hedyaryol, spathulenol, terpinene-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, camphor, appear to play an important role as antioxidant agents [2,36].

### Antibacterial activity

The antibacterial activity of *S. africana* EO against the tested microorganisms was qualitatively assessed by the inhibition zone diameters. Interestingly, our results indicate that the tested oil exhibited a significant antibacterial activity against all the tested bacteria, but in a concentration dependent-manner (Table 3). Of all the tested concentrations, the pure oil exhibited the strongest effect. The highest inhibition zone diameters were recorded against *E. coli* (29.27 mm) and *S. aureus* (29 mm) respectively, while the lowest inhibition zone diameter was recorded against *P. aeruginosa* (13.33 mm).

According to the literature survey on the antibacterial activity of *S. africana* EOs, only one study has been published [12]. Despite the difference observed in the chemical composition of our EOs, the authors reported that the inhibition zone diameters produced by highest EO ( $8000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) are 20.15 mm for *B. subtilis*, 19.50 mm *S. aureus*, 7.20 mm for *E. coli* and 6.50 mm for *P. aeruginosa*. Similarly, Liu et al. [18] have reported that *S. corsica* EO exhibit a strong activity against *S. aureus*, but remain inactive against *E. coli* and *P. aeruginosa*. However, the EOs of *S. rosmarinifolia* [11] and *S. chamaecyparissus* [30] inhibited the growth of *E. coli* by producing inhibition zone diameters of 25 mm and 15 mm, respectively. This good antibacterial activity is possibly due to the synergistic effect of the main components of *S. africana* EO such as  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -pinene and sabinene [11].

The test of antibiotics susceptibility showed that the activities of conventional antibiotics varied among the strains (Table 4), and most of them were efficient against *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis*, while *P. aeruginosa* exhibited a resistance to Amoxicillin and Cefazolin discs.

In agreement, *P. aeruginosa* displays high intrinsic resistance to a wide variety of antibiotics. This is largely due to the reduced penetration of antibiotics across the outer membrane of *P. aeruginosa*, which enables secondary adaptive resistance mechanisms to work more efficiently, including increased efflux and enzymatic antibiotic modifications (e.g.  $\beta$ -lactamase) [10].

#### Combination effect of EO and ABs

The antibacterial efficacy of *S. africana* EO in combination with the selected ABs was investigated for the first time (Table 4). The combined effects were evaluated in terms of increased or decreased inhibition zone diameters induced by ABs and EO when compared with each alone. Combined addition of EO/GEN against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis* induced synergistic effects. In contrast, the combined additions of EO/CFZ against all tested strains, and EO/AMX against *P. aeruginosa* and *B. subtilis*, have induced antagonistic effects. According to the results, *E. coli* was not affected by the combined addition of both EO/GEN and EO/AMX, while the latter gave the same result by applying it to *S. aureus*, which means that the tested combinations have induced an additive effect. In other words, the combination of *S. africana* EO with  $\beta$ -lactam antibiotics showed antagonistic and additive effects, while their combination with aminoglycosides antibiotics showed additive and synergistic effect.

Synergistic effects can be produced if the constituents of an extract affect different targets or interact with one another in order to improve the solubility and bioavailability of one or more substances of an extract. A particular synergistic effect can occur when antibiotics are combined with an agent that antagonizes bacterial resistance mechanisms [35]. Consistent with this, the hydrophobic nature of *S. africana* EO allows it to penetrate microbial cells and presumably cause rupture of the outer membrane and disruption cellular functions [20]. This can increase the permeability of bacterial cell membranes [24], and facilitates the penetration of gentamicin into the cell [29]. Moreover, interaction between different compounds may lead to changes in structural conformation, resulting in the reduction of the inhibitory activity [17], which can explain the additive effect observed with the combination of EO/GEN against *E. coli*. These findings are in agreement with the results of Rosato et al. [29], on synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils.

The antagonistic and additive effects result from the use of compounds acting on the same target of the microorganism [35], which explains our results regarding the interaction between *S. africana* EO and beta-lactam antibiotics, which seem to act both on the cell membrane.

In the present study, the choice of Gram-negative or Gram-positive bacterial strains seem to be not decisively significant for the research of the combined effect of EOs with antibiotics, which means that the proper EO/AB association act as equally stronger or weaker against all Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. This presumed that the outer membrane of the Gram-negative bacteria is not a predominant factor of their resistance [16].

#### Conclusion

This paper presents an interesting analysis of the chemical composition of aerial part essential oil of *Santolina africana* growing wild in Algeria. Among the forty-six components identified,  $\beta$ -pinene, germacrene D and 1,8-cineole were the main components. *S. africana* EO showed a higher antioxidant activity compared to the oils of species from the same genus. The antibacterial activity of *S. africana* oil displayed significant effect among the different bacterial strains, but remained lower than the activities of the standard antibiotics. The combination of this oil with conventional antibiotics has significant potential to improve the antimicrobial activity and to reduce the antibiotic concentration. The oil acts in synergy with antibiotics probably by binding to targets different from those of the antibiotics.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### References

- [1] R.P. Adams, Identification of Essential oil Components by Gas chromatography/Mass Spectroscopy, fourth ed., Allured Publishing Corporation, USA, 2007.
- [2] F. Ahmadi, S. Sadeghi, M. Modarresi, R. Abiri, A. Mikaeli, Chemical composition, in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran, Food Chem. Toxicol. 48 (5) (2010) 1137–1144.
- [3] A.G. Atanasov, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, ... J.M. Rollinger, Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review, Biotechnol. Adv. 33 (8) (2015) 1582–1614.
- [4] S. Attia, K.L. Grissa, A.C. Mailleux, S. Heuskin, G. Lognay, T. Hance, Acaricidal activities of *Santolina africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*), Pest. Manag. Sci. 68 (7) (2012) 1069–1076.
- [5] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils—a review, Food Chem. Toxicol. 46 (2) (2008) 446–475.
- [6] D. Beatović, D. Krstić-Milošević, S. Trifunović, J. Šiljegović, J. Glamočlija, M. Ristić, S. Jelačić, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia, Rec. Nat. Prod. 9 (1) (2015) 62–75.

- [7] J. Bellakhdar, in: *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle: Médecine Arabe et Savoirs Populaires*, Editions le Fennec., Ibis Press, Paris, 1997, p. 764.
- [8] R. Ben Mansour, B. Gargouri, M. Bouaziz, N. Elloumi, I. Belhadj Jilani, Z. Ghrabi, S. Lassoued, Antioxidant activity of ethanolic extract of inflorescence of *Ormenis africana* in vitro and in cell cultures, *Lipids Health Dis.* 10 (1) (2011) 78, doi:10.1186/1476-511X-10-78.
- [9] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (4617) (1958) 1199–1200.
- [10] E.B.M. Breidenstein, C. De la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance, *Trends Microbiol.* 19 (8) (2013) 419–426.
- [11] S. Chibani, A. Labeled, A. Kabouche, Z. Semra, F. Smati, T. Aburjai, Z. Kabouche, Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. (Asteraceae) from Algeria, *Pharm. Lett.* 5 (2) (2013) 238–241.
- [12] K. Derouiche, A. Zelligui, N. Gherraf, A. Boussetla, L. Dehimat, S. Rhouati, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Santolina africana* flowers, endemic in Algeria, *J. BioSci. Biotech.* 2 (3) (2013) 201–206.
- [13] R. Fdil, I. Lmachraa, N. Fdil, A. Ezoubeiri, C.A. Gadhi, Huile essentielle des parties aériennes de *Santolina africana*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 150 (1–4) (2011) 47–60.
- [14] S.J. Genuis, E. Kyrillos, The chemical disruption of human metabolism, *Toxicol. Mech. Methods* 27 (7) (2017) 477–500.
- [15] T. Hill, P. Lewicki, *Statistics: Methods Applications*, Statsoft, Tulsa, OK, 2007 (Electronic version is available at [www.statsoft.com/textbook/k-nearest-neighbors/](http://www.statsoft.com/textbook/k-nearest-neighbors/)).
- [16] B.S. Ilić, B.D. Kocić, V.M. Sirić, O.G. Cvetković, D.L. Miladinović, An in vitro synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol, *Sci. World J.* (2014) 12, doi:10.1155/2014/826219.
- [17] M. Lis-Balchim, S.G. Deans, Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*, *J. Appl. Microbiol.* 82 (6) (1997) 759–762.
- [18] K. Liu, P.G. Rossi, B. Ferrari, L. Berti, J. Casanova, F. Tomi, Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr, *Phytochemistry* 68 (12) (2007) 1698–1705.
- [19] I. Lmachraa, R. Fdil, N. Fdil, A. Mouzdhahir, Huile essentielle de *Santolina africana* (Jord. & Fourr.) du Maroc: composition chimique et isolement des deux principaux constituants, *J. Mater. Environ. Sci* 5 (1) (2014) 67–72.
- [20] J.C. Lopez-Romero, H. González-Ríos, A. Borges, M. Simões, Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2015) 9, doi:10.1155/2015/795435.
- [21] M. Lucarini, P. Pedrielli, G.F. Pedulli, L. Valginigli, D. Gimes, P. Tordo, Bond dissociation energies of the N–H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxy, and peroxy radicals of phenothiazines and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (49) (1999) 11546–11553.
- [22] G. Magi, E. Marini, B. Facinelli, Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant group A *Streptococci*, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 165, doi:10.3389/fmicb.2015.00165.
- [23] F. Moussaoui, T. Alaoui, Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6 (1) (2015) 32–37.
- [24] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola, V. De Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals* 6 (12) (2013) 1451–1474.
- [25] A. Nouasri, T. Dob, S. Krimats, D. Dahmane, M. Toumi, L. Lynda, Chelgoume Ch., F. Rache, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. of Algeria, *J. Coast Life Med* 3 (3) (2015) 220–227.
- [26] C.G. Pereira, L. Barreira, N. da Rosa Neng, J.M.F. Nogueira, C. Marques, T.F. Santos, ... L. Custódio, Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: in vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crothium maritimum* L., *Food Chem. Toxicol.* 107 (B) (2017) 581–589.
- [27] A.G. Ponce, R. Fritz, C. del Valle, S.I. Roura, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *LWT* 36 (7) (2003) 679–684.
- [28] P. Quézel, S. Santa, *Nouvelle Flore de l'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales*, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963.
- [29] A. Rosato, M. Piarulli, F. Corbo, M. Muraglia, A. Carone, M.E. Vitali, C. Vitali, In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils, *Curr. Med. Chem.* 17 (28) (2010) 3289–3295.
- [30] K.B.H. Salah-Fatnassi, F. Hassayoun, I. Cheraif, S. Khan, H. Ben Jannet, M. Hammami, M. Aouni, F. Harzallah-Skhiri, Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia, *Saudi J. Biol. Sci.* 24 (4) (2017) 875–882.
- [31] C.A. Semeniuc, C.R. Pop, A.M. Rotar, Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J. Food Drug. Anal.* 25 (2) (2017) 403–408.
- [32] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82 (2) (1997) 291–295.
- [33] A. Smida, S. Ncibi, J. Taleb, A.B. Saad, S. Ncib, L. Zourgui, Immuno-protective activity and antioxidant properties of cactus (*Opuntia ficus indica*) extract against chlorpyrifos toxicity in rats, *Biomed. Pharmacother.* 88 (2017) 844–851.
- [34] M.P. Utrilla, M.C. Navarro, J. Jimenez, M.P. Montilla, A. Martin, Santolindiacetylene, a polyacetylene derivative isolated from the essential oil of *Santolina canescens*, *J. Nat. Prod.* 58 (11) (1995) 1749–1752.
- [35] H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Phytomedicine* 16 (2–3) (2009) 97–110.
- [36] W. Wang, N. Wu, Y.G. Zu, Y.J. Fu, Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, *Food Chem* 108 (3) (2008) 1019–1022.
- [37] A. Welj, A. Al-Kaabi, J. Al-Sabahi, S. Said, M.A. Hossain, S. Al-Riyami, Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf, *J. King Saud Univ.-Sci.* (2018), doi:10.1016/j.jksus.2018.07.021.
- [38] L. Zaiter, F. Benayache, N. Beghidja, G. Figueredo, P. Chalard, J.-C. Chalchat, E. Marchioni, Benayache, Essential oils of *Santolina africana* Jord. & Fourr. and *Santolina chamaecyparissus* L., *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 18 (6) (2015) 1338–1342.
- [39] A. Zeraib, M. Ramdani, L. Boudjedjou, P. Chalard, G. Figueredo, Characterization and chemosystematics of Algerian thuriferous juniper (*Juniperus thurifera* L.), *J. Appl. Bot. Food Qual.* 87 (2014) 249–255.

**ملخص:** النباتات هي مصدر لا ينضب من الجزيئات النشطة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي وتقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة والسمية النباتية للزيوت الأساسية المستخلصة من ثلاثة أنواع مستوطنة *Santolina africana* L. و *Hertia cheirifolia* L. و *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*. تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق التقطير المائي وقد بين التحليل الكيميائي لهذه الزيوت بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة أن  $\beta$ -pinène ، germacrène ،  $\alpha$ -pinène ، 1,8-cinéole ، D m-mentha-6,8-diène هي المركبات الرئيسية للزيوت الأساسية الثلاثة. تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار على القرص ضد أربعة سلالات مرجعية. أظهرت *S. aureus* و *E. coli* حساسية قوية للزيوت التي تم اختبارها ، بينما ابدت السلالتان *P. aeruginosa* و *B. subtilis* مقاومة للزيوت الأساسية لكل *H. cheirifolia* و *J. thurifera*. كما تم اختبار التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية مضافة الى ثلاث مضادات حيوية: الجنتاميسين ، الأموكسيسيلين والسيفازولين. تم تسجيل التأثير التآزري مع الجنتاميسين ، بينما لوحظت التأثيرات المضافة والمضادة مع الأموكسيسيلين والسيفازولين. أظهر الإرساء الجزيئي docking moléculaire لمركبات الزيوت الأساسية على أربعة بروتينات مستهدفة ل  $\beta$ -Lactames أن مكونات الزيت الأساسي ل *S. africana* لديها تقارب أكبر لهذه البروتينات. المعقدات المتشكلة تحافظ على استقرارها أساسا بفضل الروابط الكارهة للماء. لقد أظهر اختبار فحص ازاحة الجذور DPPH واختبار FRAP أن الزيت الأساسي ل *Hertia cheirifolia* لديه اهم نشاط مضاد للأكسدة. تقييم تأثير السمية النباتية للزيوت الثلاثة على انتاش ونمو *Triticum durum* و *Lactuca sativa* أظهر خصائص مثيرة للاهتمام للسمية النباتية.

**الكلمات المفتاحية:** الأنواع المستوطنة ، الزيوت الأساسية ، النشاط البيولوجي.

**Résumé :** Les plantes constituent une source inépuisable des molécules actives. La présente étude se propose d'identifier la composition chimique et évaluer les activités antibactérienne, antioxydant et la phytotoxicité des huiles essentielles de trois espèces endémiques : *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* L. et *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*. L'analyse par CPG/SM des huiles extraites par hydrodistillation a mis en évidence leur composition chimique. Le  $\beta$ -pinène, le germacrène D, le 1,8-cinéole, l' $\alpha$ -pinène et le m-mentha-6,8-diène sont les composés majoritaires des trois huiles essentielles. L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis de quatre souches de référence. *S. aureus* et *E. coli* ont manifesté une forte sensibilité aux agents testés, tandis que *P. aeruginosa* et *B. subtilis* se sont révélées résistantes à l'action des HEs de *H. cheirifolia* et *J. thurifera*. L'effet antibactérien des HEs combinées avec la Gentamicine, Amoxicilline et Céfazoline a été également testé. L'effet synergique a été enregistré en combinant les HEs avec la gentamicine, alors que les effets additifs et antagonistes ont été observés avec l'amoxicilline et céfazoline. Le docking moléculaire des composés des HEs sur quatre cibles des  $\beta$ -Lactames a montré que les constituants de l'HE de *S. africana* ont plus d'affinité pour ces protéines. Les complexes formés sont stabilisés principalement par des interactions hydrophobiques. Le test de piégeage du radical DPPH et le test de FRAP ont mis en évidence que l'HE de *Hertia cheirifolia* présente le potentiel antiradicalaire et réducteur les plus importants. L'évaluation de l'effet phytotoxique des trois huiles sur la germination et la croissance de *Triticum durum* et *Lactuca sativa* ont permis de mettre en valeurs des propriétés phytotoxiques intéressantes.

**Mots clés :** Espèce endémique, huile essentielle, activité biologique.

**Abstract:** Plants are an inexhaustible source of active molecules. This study aims to identify the chemical composition and assess the antibacterial, antioxidant and phytotoxicity activities of essential oils from three endemic species: *Santolina africana* L., *Hertia cheirifolia* L. and *Juniperus thurifera* Var. *aurasiaca*. Analysis of oils extracted by hydrodistillation by GC/MS has highlighted their chemical composition. B-pinene, germacrene D, 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene and m-mentha-6,8-diene are the major compounds of the three essential oils. Antibacterial activity was tested by the disc diffusion method against four reference strains. *S. aureus* and *E. coli* showed strong sensitivity to the agents tested, while *P. aeruginosa* and *B. subtilis* were found to be resistant to the action of the EOs of *H. cheirifolia* and *J. thurifera*. The antibacterial effect of EOs combined with Gentamicin, Amoxicillin and Cefazolin was also tested. The synergistic effect was recorded by combining the EOs with gentamicin, while the additive and antagonistic effects were observed with amoxicillin and cefazolin. Molecular docking of the EOs compounds on four  $\beta$ -Lactam targets has shown that the EO constituents of *S. africana* have more affinity for these proteins. The complexes formed are stabilized by hydrophobic interactions. The DPPH radical trapping test and the FRAP test have shown that the EO of *Hertia cheirifolia* has the most significant anti-radical and reducing potential. Evaluation of the phytotoxic effect of the three oils on the germination and growth of *Triticum durum* and *Lactuca sativa* showed interesting phytotoxic properties.

**Key words:** Endemic species, essential oil, biological activity.