



Caractérisation phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*

Bouchenak O.^{1*}, Yahiaoui K.², Laoufi R.³, Benhabyles N.⁴, El Haddad D.⁴, Arab K.⁴

1. Laboratoire Bio-informatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

2. Laboratoire Technologie Alimentaire, Faculté de Technologie, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

3. Laboratoire de Technologies Douces, Valorisation, Physico-Chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

4. Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

Tél : 00 213 (0) 7 71 93 78 03.

E-mail : o.bouchenak@univ-boumerdes.dz

ARTICLE INFO

Article :

Reçu le : 02/03/2020

Accepté le : 03/07/2020

Mots clés : *Juniperus phoenicea*, Huile essentielle, aromagramme, micro atmosphère, CMI, CMB et CMF

Keywords: *Juniperus phoenicea*, Essential oil, aromatogram, micro atmosphere, MIC, MBC and MFC

RESUME

Cette étude vise la valorisation de l'intégration des huiles de *Juniperus phoenicea* en industrie pharmaceutique. L'extraction par hydrodistillation a permis d'avoir un rendement de $0,62 \pm 0,3$ % pour 100g de matière végétale. Le profil chromatographique analysé en phase gazeuse a fait ressortir une richesse en monoterpènes hydrocarbonés, avec comme composant majeur α -pinène (47,66%). L'activité antimicrobienne testée sur des souches de références, par la méthode de l'aromatogramme et celle de la micro atmosphère, a révélé une sensibilité de *Staphylococcus aureus*, d'*Enterococcus faecalis*, *Kelebsella pneumoniae* et *Candida albicans*. La valeur de la CMI, CMB et CMF notée varie en fonction des souches testées. Il est à signaler que toutes les souches sont inhibées à des concentrations comprises entre 0,06% et 0,25%. Ces résultats ont fait ressortir l'opportunité de l'utilisation de l'huile essentielle de genévrier de phénicie pour le traitement des infections microbiennes.

ABSTRACT

This study aims to promote the integration of *Juniperus phoenicea* oils in the pharmaceutical industry. The extraction by hydrodistillation provides a yield of $0.62 \pm 0.3\%$ per 100g of plant material. The chromatographic profile analyzed in the gas phase revealed a richness in hydrocarbon monoterpenes, with the major component α -pinene (47.66%). The antimicrobial activity tested on reference strains, by the aromatogram method and that of the micro atmosphere, revealed a sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Kelebsella pneumoniae* and *Candida albicans*. The value of the MIC, CMB and CMF noted varies according to the strains tested. It should be noted that all the strains are inhibited at concentrations of between 0.06% and 0.25%. These results highlighted the advisability of using phenicia juniper essential oil for the treatment of microbial infections.

1. Introduction

L'usage abusif et répété des antibiotiques dans la lutte contre les microorganismes a fait émerger de nouvelles souches microbiennes multi résistantes. Selon Chaudhary (2016), ces dernières sont rencontrées principalement chez les entérobactéries. Plusieurs travaux tentent de valoriser les substances bioactives d'origines végétales comme solution alternative pour une meilleure prise en charge médicale (Harikrishna *et al.*, 2004 ; Arab *et al.*, 2014 ; Bouchenak *et al.*, 2018). La prévalence des infections respiratoires d'une part, la richesse, la diversification de la flore médicinale de notre pays, et la phytothérapie comme tradition populaire d'autre part, plaident pour une approche industrielle d'exploitation des plantes médicinales. En Algérie, la médecine traditionnelle a toujours occupée une place importante dans les traditions de médication, en particulier pour les infections touchant l'appareil respiratoire. Cette étude consiste à évaluer l'activité inhibitrice des huiles essentielles d'une plantes médicinales, largement utilisée par la population locale, sur la croissance de certaines souches microbiennes de référence. Il s'agit de *Juniperus phoenicea*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Après une étude ethnobotanique et suite au nombre restreint d'études effectuées sur les plantes disponibles, notre choix s'est porté sur la plante aromatique *Juniperus phoenicea*, actuellement répondue de manière faible dans la région de Dellys mais parfaitement connue et utilisée dans la médecine traditionnelles par la population de la région. La partie utilisée de cette plante est les rameaux sur lesquels sont plaquées les petites feuilles. L'ensemble est utilisé après séchage.

2.2. Souches microbienne

Les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* sont testées sur les quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* et une levure *Candida albicans*, pour leurs fréquence élevée de contamination et de pathogénicité. Les souches sont des lots d'ATCC (Américain Type Culture Collection), elles sont entretenues par repiquage sur milieu nutritif gélosé favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C et 48h à 25°C pour *Candida*. Le tableau suivant présente les principales caractéristiques de ces bactéries.

Tableau 1. Caractéristiques des souches utilisées

Souches bactériennes	Couleur de Gram	Type de Gram	Références
<i>Staphylococcus aureus</i>	violette	G (+)	ATCC 6538
<i>Entérocooccus faecalis</i>	violette	G(+)	ATCC 6569
<i>Kelebseilla pnemoniae</i>	Rose	G(-)	ATCC 4352
<i>Pseudomonas aerugénosa</i>	Rose	G(-)	ATCC 9027
<i>Candida albicans</i>			ATCC 24433

Récolte et séchage de la matière végétale

Les feuilles et les rameaux sont récoltés dans la région d'étude à Dellys, en deux périodes différentes. La première récolte est réalisée au mois de Novembre alors que la deuxième s'est faite en Avril. Les feuilles et les rameaux sont lavés puis séchés à l'air libre et à l'ombre loin du soleil et de l'humidité. L'ensemble est disposé en couches minces sur du papier absorbant, propre et sec, renouvelé de façon systématique. Le séchage de cette plante a duré 15 jours.

Extraction et estimation du rendement en huiles essentielles

Les huiles essentielles de genévrier sont obtenues par hydrodistillation de 100g de matière végétale (rameaux et feuilles). La durée de l'extraction est de 4 heures et l'opération est répétée à plusieurs reprises. La décantation de l'HE est réalisée dans une ampoule de 250ml, puis l'huile obtenue est séparée de la matière non organique en ajoutant à l'ensemble l'éther di-éthylique.

Après évaporation du solvant organique, l'huile essentielle est conservée dans un flacon en verre à 4 °C. Le rendement est calculé par le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse végétale utilisée dans l'extraction.

Caractérisation chromatographique des huiles essentielles par CG/SM

L'identification des constituants de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* en se basant sur leurs temps de rétention est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplée à un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impacte électronique à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30m x 0,25mm), l'épaisseur du film est de 0,25µm. La température de la colonne est programmée de 60°C à 220°C pendant 10 min à raison de 3°C/min. Le gaz vecteur est l'Hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml/min. Le volume injecté est de 1 µl en mode Split (1/100). L'appareil est relié à un système informatique.

Étude de l'activité antimicrobienne

La méthode adoptée pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des huiles essentielles (HEs) de *J. phoenicea* est celle dictée dans les travaux de Celitkas *et al.* (2007). L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 – 24h pour les bactéries et de 48h pour la levure. L'analyse qualitative a pour objectif de vérifier l'activité de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur les différentes souches citées précédemment par la méthode de diffusion en milieu solide ou la méthode des disques. Cette étude est portée sur les deux phases de l'huile essentielle : la phase liquide « aromagramme » et la phase gazeuse « micro atmosphère ». Dans un premier temps, une première couche d'une épaisseur de 15 à 20 mm du milieu gélosé Mueller Hinton pour les bactéries étudiées et Sabouraud pour la levure *Candida albicans* est coulée dans les boîtes de Petri. Après solidification du milieu, une deuxième couche fine constituée d'un mélange de 100ml du milieu gélosé et 200µl de la suspension microbienne est coulée. Dans un deuxième temps, pour la méthode de l'aromagramme, les disques d'ATB stériles de 9 mm de diamètre, imbibés de 10µl d'huile essentielle, sont déposés sur la gélose préparée précédemment. Quant à l'étude micro-atmosphérique, cette dernière permet de mettre en évidence la diffusion des composés volatils des HE dans la boîte de Pétri. La technique consiste à déposer le disque imbibé d'une quantité déterminée d'HE au milieu du couvercle de la boîte de Pétri. La boîte est fermée avec le couvercle en bas. Le tout est laissé à température ambiante pendant 30 min pour permettre la diffusion de l'échantillon. Elles sont ensuite mises à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. L'analyse quantitative permet d'avoir une idée sur l'efficacité de l'huile essentielle testée en mesurant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF). Pour cela, Les huiles essentielles sont diluées avec un milieu composé de gélose (Mueller Hinton ou Sabouraud) et de Tween 80. Les concentrations en huiles essentielles testées sont 2% ; 1% ; 0,5% ; 0,25% ; 0,125% ; 0,06% ; 0,03%. Des boîtes témoins, constituées du milieu de culture additionnée de quelques gouttes de Tween 80 sont préparées.

3. Résultats

Rendement en huiles essentielles et caractérisation organoleptique

Après plusieurs séries d'extraction, un rendement de $0,62 \pm 0,3$ % est obtenu avec la récolte du mois d'avril, soit trois fois plus supérieur à celui noté avec la récolte du mois de novembre ($0,18 \pm 0,2$ %). Elle est de couleur transparente à faiblement jaunâtre, d'odeur caractéristique, forte et persistante.

Analyse de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse CG/SM

La composition chimique de l'HE de *Juniperus phoenicea* est déterminée par CG/SM en fonction du temps de rétention et de la teneur en composés volatils. Au total 53 composants volatils, représentant environ 98,65% sont identifiés. Les monoterpènes hydrocarbonés sont le groupe majeur. Les composants volatils les plus abondants dans la constitution de cette l'HE sont : α -pinène (47,66%) suivi par α -phyllyndrène (7,28%), ρ -cymène (6,05%), myrcène (5,43%), β -pinène (2,79%) et limonène-D (2,40%) (Tableau 2).

Tableau 2. Composition chimique relative de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*

Tr (min)	Composés	Teneur (%)	Tr (min)	Composés	Teneur (%)
5,02	Bornylène	0,02	17,68	Carvone	0,35
5,55	Tricyclène	1,87	19,47	Linalol	8,28
6,07	α -pinène	47,66	22,01	Composé C	0,85
6,33	D-limonène	2,40	23,02	α -cubébène	0,65
6,44	Composé A	0,83	23,40	β -bourbonène	0,07
6,97	Sabinène	0,27	23,77	β -elemene	0,21
7,08	comphène	0,86	24,15	α -elemene	1,08
7,52	β -pinène	2,79	24,58	α -cédrene	0,32
7,96	Composé B	0,16	24,90	β -caryophylène	1,72
8,10	3-carène	0,10	25,26	Bicyclo[4,4,0]dec-1-ene,2-isopropyl-5-methyl-9-méthylène	0,12
8,35	2-carène	0,17	26,06	α -Himachalene	0,05
8,96	α -phéllandrène	7,87	26,29	α -Caryophylène	0,51
10,97	4-carène	0,45	26,70	Thujopsene	0,12
11,16	Tau.terpène	0,27	27,07	Epizonarène	0,05
12,60	α -campholenal	0,43	27,24	Tau-Muuroène	0,08
13,54	ρ -cymène	6,05	27,44	β -Cubebene	0,39
13,77	Camphène hydrate	1,05	27,65	Aromadendrène	0,21
14,10	Pinocarvéol	0,60	27,99	Naphtalène	0,29
14,70	Myrcène	5,43	28,17	β -Himachalène	0,15
14,98	Terpinen-4-ol	1,13	28,62	Germacrène D	0,25
15,51	Myrténal	0,24	28,78	Tau-cadinène	0,26
15,65	α -terpénoil	0,52	29,11	Delta-cadinène	0,40
15,84	Myrténol	0,31	31,53	Caryophylène oxyde	0,86
16,15	Verbenone	0,47	33,32	Composé D	0,21
16,97	Trans-carvéol	0,36	33,46	α -cédrene	0,32
45,58	Composé C	0,13			

Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne réalisée sur les deux phases de l'HE de *J. phoenicea* obtenus par mesure des diamètres des zones d'inhibition sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau 3. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour différentes souches testées

Souches	Phase liquide (Aromatogramme)	Phase gazeuse (Micro atmosphère)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	23±0,4 mm	18,5±00 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6569	13±00 mm	10±0,3 mm
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 4352	21±0,6 mm	19±0,25 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Résistante	Résistante
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	18,5±00 mm	14±0,3 mm

L'huile essentielle de *J. phoenicea* a exercé une action antimicrobienne sur toutes les souches testées excepté *P. aeruginosa* qui s'avère résistante. Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne pour les deux phases de l'HE sont relativement proches. La bactérie la plus sensible envers les deux phases de l'HE, liquide et gazeuse, est *Staphylococcus aureus*, avec respectivement un diamètre d'inhibition de 23±0,4mm et 18,5±00 mm. Les autres bactéries à savoir *Enterococcus faecium* et *K. pneumonia* ont montré une sensibilité modérée. Le diamètre des halots varie selon la phase de l'HE de 10±0,3mm à 21±0,6 mm. La même constatation est relevée quant à l'effet de l'HE envers la levure *Candida albicans*, 18,5±00 mm pour la phase liquide et 14±0,3 mm pour la phase gazeuse. Les résultats de la CMI, CMB/ CMF relevées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 4. Valeurs des CMI, CMB et CMF pour les différentes souches testées

Souches	CMI	CMB/CMF
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25%	+ 2%
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06%	0,5%
<i>Klebseilla pneumonia</i>	0,25%	1%
<i>Candida albicans</i>	0,06%	1%

Les valeurs de la CMI, CMB et CMF varient en fonction des souches testées. Toutes les souches sont inhibées à des concentrations comprises entre 0,06% et 0,25%. La concentration minimale bactéricide envers *Staphylococcus aureus* est supérieure à 2%. La plus petite valeur de la CMI est enregistrée chez *Enterococcus faecalis* (0,5%). Pour *Candida albicans*, l'action fongicide enregistrée est de 1%.

4. Discussion

Le rendement maximal en huile essentielle extraite de 100g de rameaux et feuilles de *J. phoenicea* par Hydrodistillation est 0,62 ± 0,3 %. Cette valeur est supérieure à celle notée par Robert *et al.* (1996) au Portugal (0,41%) et en Grèce (0,58%), et Bouzouita *et al.* (2008) au sud de la Tunisie (0,5%). Elle est similaire aux valeurs révélées par Robert *et al.* (1996) en Espagne (0,66%) et Akrouit *et al.* (2007) en Tunisie (0,7%). En revanche, des valeurs nettement plus importantes sont obtenues au Maroc (1,62%) par Derwich *et al.* (2010) et en Egypte (1,96%) par Elsawi *et al.* (2007). Le Profile chromatographique de l'huile essentielle de *J. phoenicea* par CG/SM à fait ressortir plusieurs composés, dont 53 sont volatils, représentant 98,65% de la composition totale. L'élément volatil majeur est le α -pinène (47,66%), suivi de linalol (8,28%), α -phellandrène (7,87%), ρ -cymène (6,05%), myrcène (5,73%), β -pinène (2,97%) et limonène D (2,40%). C'est une composition très riche en composée mono terpénique avec des teneurs importantes forcément dues à la période de floraison. Des études réalisées sur la même espèce ont révélé une richesse et une teneur différente en composés volatiles. En effet, Robert (1993) en analysant l'HE des feuilles récoltées de Portugal, d'Espagne et de Grèce a noté une forte variation de la teneur en α -pinène (34,1% ; 53% ; 41,8%), β -phellandrène (19,2% ; 5,9% ; 3,5%) et β -caryophyllène (0,22% ; 1,0% ; 0,5%) respectivement. Cette constatation est aussi signalée dans les régions magrébines, notamment au Maroc et en Tunisie pour l' α -pinène (41,15%, et 59,11%), linalol (2,54% et 3,3%), ρ -cymène (1,10% et 0,34%) et β -pinène (3,53% et 0,60%) respectivement. Il ressort de cette comparaison que l'HE de *J. phoenicea* est formé principalement d' α -pinène.

Cette variation de point de vue qualitative et quantitative est due à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et à la période du cycle végétatif et même à des facteurs génétiques (Cavaleiro *et al.* 2001; Rezzi *et al.*, 2001 ; Thompson *et al.*, 2003 et Karousou *et al.*, 2005). L'effet antimicrobien exercé par l'HE de *J. phoenicea* est due à sa richesse en certaines substances réputées d'être des antimicrobiens puissants. L' α -pinène, composé majeur de l'HE, est connu pour son activité antibactérienne (Bourkhiss *et al.*, 2007). Le rapprochement monoterpénique bicyclique de α et β -pinène a montré une considérable activité biologique (Delaquis *et al.*, 2001 ; KIM *et al.*, 2003). De même, les énantiomères de α et β -pinène, linalol et limonène-D, sont connus aussi pour leur activité bactérienne (Magiatis *et al.*, 1999). L'action antimicrobienne des HEs se manifeste selon Martins *et al* (2000) et Aliannis *et al* (2001), en présence de terpène C₁₀ et C₁₅ capables de former des ponts d'hydrogène avec le site actif des enzymes. Les alcools terpéniques, molécules présentes aussi dans notre HE, sont aussi particulièrement actifs contre les cellules microbiennes, et peuvent provoquer d'importants dégâts sur la paroi cellulaire (Griffin *et al.*, 1999; Dorman *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002; Hammer *et al.*, 2003). Ils contribuent avec

les Aldéhydes et les Esters à l'ensemble des activités antimicrobiennes des HE (Belletti *et al.*, 2004). La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'action inhibitrice des composants des HEs est décrite par Fleurette *et al.* (1995), De Feo *et al.* (2003) et Pibiri (2006). Ces derniers l'attribuent à la capacité de cette bactérie à former un biofilm ou barrière polysaccharidique composée de strates reliées de l'intérieur à la membrane externe.

5. Conclusion

L'analyse qualitative par CG-SM de l'huile essentielle de *J. phoenicea* a montré un profil chromatographique très riche en composés mono terpénique, avec comme élément majeur α -pinène (47,66%). Le test antimicrobien a montré l'efficacité des composants volatiles de l'HE de *J. phoenicea* envers la majorité des microorganismes, à l'exception *P. aeruginosa* qui s'est révélée résistante. Pour l'ensemble des souches testées, la concentration minimale inhibitrice est comprise entre 0,06% et 0,25%. La concentration minimale bactéricide varie de 0,5% (*Enterococcus faecalis*) à une valeur supérieure à 2% (*Staphylococcus aureus*). En vue de ces résultats, l'HE de *J. phoenicea* peut être envisagé comme une solution alternative, seule ou associée à un antibiotique, pour faire face à la résistance des microorganismes aux antibiotiques de synthèse.

6. Références Bibliographiques

- [1] Akrouf, A., Chemli R., Chreif I. et Hammami M., 2001- Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. Flavour Fragr. J., 16: 337–339.
- [2] Aliannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. et Chinou IB., 2001- Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food. Chem., 49(9): 4168-4170.
- [3] Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K., 2014- Etude phytochimique et evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). Journal of Fundamental and Applied Sciences, 6(1) :79-93.
- [4] Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni ME., Lanciotti R et Gardini F., 2004 – Evaluation of the antimicrobial of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food chem., 52(23): 6932-6938.
- [5] Bouchenak O., Yahiaoui K., Benhabyles N., Laoufi R. et Arab K., 2018- Physico-chemical and chromatographic characterization of the essential oil of *Nigella sativa* L. and evaluation of its antioxidant, hypoglycemic and antidiabetic activities. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 10(55): 82-99.
- [6] Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., M. Ouhssine et Chaouch A., 2007 – Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. Afrique Scie., 03(2): 232-242.
- [7] Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M.M., 2008 – Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'HE de *J. phoenicea*. J. Société chimique de Tunisie, 10 : 119-125.
- [8] Carson *et al.*, 2002; Carson C.F., Hammer K.A. et Riley T.V., 2006- *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews, 19 (01): 50-62.
- [9] Chaudhary A.S., 2016- A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics discovery. Acta Pharm. Sin., 6 : 552-556.
- [10] Cavaleiro C., Rezzi S, Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Proenca da Cunha A., 2001- Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinate* from Portugal. Biochem. Syst. Ecol., 29, 1175-1183.
- [11] Celitkas O.Y., Bedir E. et Vardar Sukan F., 2007 - In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus binus* L. seed oil: a potential solvent-free and high antioxydative edible oil. Food Chemistry, 6:1291-1296.
- [12] Delaquis P.J., Stanich K., Girard B et Mazza G., 2001 – antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oil. Int. J. Food Microbiol., 74 :101-109.
- [13] Derwich E., Benziane Z., Boukir A., 2010- Chemical composition of leaf essential oil of *J. phoenicea* and evaluation of antimicrobial activity. Int. J. Agric. and Biol., 09 : 352 : 1814-9596.
- [14] De Feo V., Bruno M., Tahiri B., Napolitano F. et Senatore F., 2003- Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). J. Agric. Food Chem., 51(13): 3849-3853.
- [15] Dorman H.J.D. et Deans S.G., 2000 – Antimicrobial agent from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. J. Applied microbiology, 88(2): 308-316.
- [16] Elswawi S.A., Motawae H.M., et Amal M.A., 2007- Chemical Composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. Grown in Egypt. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., 4(4): 417- 426.
- [17] Fleurette J., Freney J., Reverdy M.E, 1995- Antisepsie et désinfection. Ed. ESKA, 639p.

- [18] Griffin S.G., Willy G, Markham J.L. et Leach D., 1999 – The role of structures and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.*, 44: 322-332.
- [19] Hammer K.A., Carson C.F. et Riley TV., 2003- Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Applied microbiology*, 95(4): 853-860.
- [20] Harikrishna D., Appa-Rao A.V.N. et Prabahakar M.C., 2004 - Pharmacological investigation of prunin-6-O-P-coumarate: A flavonoid glycoside. *Indian J. Pharmacol.*, 36 (4) : 244-250.
- [21] Karousou R., Koureas D.N. et Kokkini S., 2005- Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, 66: 2668-2673.
- [22] Kim KJ., Kim YH., Yu HH., Jeong SI., Cha JD., Kil BS. et You YO., 2003- Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Med.*, 96(3): 274-277.
- [23] Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis AL., Chinou IB, Mitaku S., 1999- Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus var. chia*. *Planta Med.*, 65(8): 749-752.
- [24] Martins A.P., Salgueiro L.R., Gonçalves M.J., Vila R., Tomi F., Adzet T., Proença da Cunha A., Cañigüeral S. et Casanova J., 2000- Antimicrobial activity and chemical composition of the Bark oil of *Croton stellulifer*, an Endemic Species from S. Tomé e Príncipe. *Planta Med.*, 66: 647-650.
- [25] Pibiri M.C., 2006- Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, France, 177p.
- [26] Rezzi S., Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Bighelli A., Casanova J. et Proença da Cunha A., 2001- Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea subsp . turbinata* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 179-188.
- [27] Robert P.A., Barrero A.F. et Lara A., 1996- Comparisons of the leaf essential oils of *J. phoenicea*. *J. Essent. Oil. Res.*, 8: 376-371.
- [28] Thompson J.D., Chalchat J-C., Michet A., Linhart Y.B. et Ehlers B., 2003- Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.*, 29(4), 859-880.